UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN MATERIAL DE REFERENCIA EN HOJA DE MAÍZ PARA EL ANÁLISIS DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

TANIA MONSERRAT MORALES SANTOS

JURADO DE EXAMEN
DIRECTORA: M. EN C. MARÍA GUADALUPE BARRERA ANDRADRE
ASESOR: DR. CARLOS CASTILLEJOS CRUZ
ASESORA: M. EN C. SONIA ROJAS CHÁVEZ
SINODAL: M EN C. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ
SINODAL: DRA. ANDREA CHAPARRO ORTEGA

CIUDAD DE MÉXICO **JUNIO, 2025**

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
CARRERA DE BIOLOGÍA
FORMATO F-5

OFICIO DE FECHA DE EXAMEN

QFB. GRACIELA ROJAS VÁZQUEZ
JEFA DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
Presente

Le comunico que al alumno: **MORALES SANTOS TANIA MONSERRAT** con número de cuenta **417013042** de la carrera **BIOLOGÍA** se le ha fijado el día **6 de Junio de 2025** a las **11:00 hrs.**, para presentar la réplica oral de su examen profesional, que tendrá lugar en esta facultad, ante el siguiente jurado:

CARGO	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DR. CASTILLEJOS CRUZ CARLOS	
VOCAL	M. EN C. BARRERA ANDRADE MARIA GUADALUPE	
SECRETARIO	M. EN C. ROJAS CHAVEZ SONIA	
SUPLENTE	M. EN C. ROLDAN PEREZ REYNALDA	
SUPLENTE	DR. CHAPARRO ORTEGA ANDREA	

El título del trabajo escrito que se presenta es:

Desarrollo y caracterización de un material de referencia en hoja de maíz para el análisis de organismos genéticamente modificados

En la modalidad de: **TESIS**

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
CDMX, a 28 de Abril de 2025

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Dedicatoria

A Dios, a mi familia, a la vida y a quienes siempre estuvieron.

Agradecimientos

A la UNAM, la máxima casa de estudios, que me acogió desde que tenía 18 años, me abrazó con mucha fuerza y me ha enseñado que todos mis sueños se pueden volver realidad con esfuerzo, dedicación y disciplina.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza que ha sido mi hogar durante los últimos años, un lugar donde veía el amanecer y el atardecer día a día. A la carrera de Biología que me ha permitido conocer personas maravillosas a las cuales ahora llamo "mejores amigos". Y gracias a ella, he transitado un camino lleno de magia, enseñándome a amar aún más la vida y a apreciar cada ser vivo en este vasto y maravilloso universo.

A mis padres, María Concepción y Alejandro Roberto que han sido el mayor pilar en mi vida, quienes me trajeron a este mundo con las manos llenas de amor infinito que me ha sostenido en cada momento, dos seres humanos que siempre han confiado en mi capacidad desde que era una niña. Por permitirme seguir mis sueños e impulsarme, avivando mi vuelo con resiliencia y generosidad y porque gracias a ellos yo soy la persona que se encuentra aquí a punto de convertirse en bióloga. Por enseñarme a ser un humano con buenas intenciones y siempre dispuesta a ayudar a quien se cruce en mi camino. Las palabras no son suficientes para expresar mi más sincera y genuina gratitud por siempre hacer todo lo posible por mi bienestar físico, emocional y mental. Gracias a ustedes ahora este sueño se vuelve realidad. Gracias por nunca limitarme, papás. Los amo.

A mi hermano Jos, mi compañero de vida, la persona que más fuerte ha sostenido mi mano, que me ha enseñado grandes lecciones; alguien que en cada momento encuentra la manera de reconfortar mi alma en momentos de crisis. Mi pequeño hermano con quien he vivido los días más felices de mi vida y con los abrazos más cálidos del mundo, a los cuales siempre quiero llegar. Gracias porque contigo puedo ser la persona que realmente soy tanto cuando me encuentro en mi mejor momento como cuando me he llegado a desvanecer.

A mi tía Laura Santos, quien ahora ya es un angelito, pero me abrió las puertas de su casa para que me fuese más llevadera la universidad y me cuidó como a su propia hija; cuando partiste de este mundo pensé que no me verías convirtiéndome en profesionista y ahora estamos aquí, deseo que estés donde estés puedas ver que por fin lo hemos logrado. Por fin estamos aquí, tía, gracias por enseñarme que la vida es

un ratito y me corresponde a mí aprender a valorarla. A mi papito Benjamín, quién también no se encuentra físicamente en este plano terrenal, pero has sido una de las personas que más ha marcado mi vida, a quien he amado profundamente y he admirado quizá desde que tengo memoria.

A mi perrita Ámbar, el ser vivo con la mayor resiliencia que he conocido, quien me ha enseñado tanto sin la necesidad de hablar, quien me ha acompañado en todas mis noches de desvelo no sólo durante esta tesis, sino en toda mi carrera universitaria. Quien llena de amor mi vida con su carita tan peculiar. A veces no comprendo cómo cabe tanto amor en un ser vivo tan chiquito.

A la M. en C. María Guadalupe Barrera Andrade, mi directora de tesis por permitirme la gran oportunidad de realizar mi proyecto de titulación en su laboratorio. Por su amabilidad y apoyo en esta etapa de mi vida. Por el tiempo destinado a la revisión de mi tesis y acercarme al mundo de los OGMs.

Al Dr. Carlos Castillejos Cruz quien ha sido el mejor maestro que he tenido a lo largo de toda mi trayectoria académica y uno de los mejores seres humanos que me ha presentado la vida, quien me ha demostrado que el amor por la Biología no tiene fronteras, que me ha apoyado desde el primer instante en que lo conocí y me ha hecho creer mil veces en la capacidad que existe dentro de mí. Quien me ha dicho que mi único límite es el cielo. Gracias por impulsar a tantas personas, dentro de ellas a mí.

Al Q.F.B. José Luis Juárez Vargas quien con mucha paciencia me enseñó todo lo que aprendí a hacer en el laboratorio del DAMNT, un ser humano con un cerebro impresionante y una empatía infinita. Quien me enseñó a aprender de mis errores sin ser tan dura conmigo misma y que sea lo que sea, siempre existe manera de resolverlo. Gracias porque sé que siempre das lo mejor de ti en cada actividad y que al final, este trabajo lleva impregnado la inteligencia de los dos.

A la M. en C. Sonia Rojas Chávez, extiendo mi más sincera gratitud por apoyarme de manera tan incondicional, porque siempre que me encuentro con ella me ofrece una sonrisa enorme y que siempre se encuentra en la disposición de ayudarme. Porque recuerdo con mucho cariño todos los proyectos que hemos transitado juntas.

A Dios porque únicamente en la espiritualidad y en la fe he encontrado la paz en mi corazón que durante tantos años estuve buscando en el exterior. Porque tal vez la vida es efímera y a la vez muy compleja, pero hasta ahora hay respuestas que sólo he obtenido cuando cierro los ojos y creo que existe algo mucho más grande que este plano terrenal que me dice que confíe en que todo siempre es como tiene que ser, cuando tiene que ser.

A Rayadan Reyes, Sharo Maciel y Daniel Mireles quienes han sido mis mejores amigos y en quienes encontré una segunda familia, que me sujetaron y apoyaron para concluir con este proyecto en los momentos en los cuales rendirme por completo era mi opción número uno. A cada miembro de mi familia y amigos quienes me escucharon hablar miles de veces de esta tesis porque me han hecho creer que la amistad es mucho más que una palabra de siete letras. Por quererme incondicionalmente y ayudarme a navegar en este mar de incertidumbre en el cual me sentí muy perdida y sin dirección. Gracias por mostrarme que el camino correcto siempre es el que decido tomar y por permitirme sentirme amada durante todo el proceso y no solo hasta que lo lograra.

A la M. en C. Reynalda Roldán y la Dra. Andrea Chaparro por aceptar ser mis sinodales y tomarse el tiempo de leer y aportar en mi escrito. Por permitir que este proyecto llegara a su conclusión, muchas gracias.

La vida es buena y me lo demuestra día a día, en las cosas más cotidianas y efímeras. La niña chiquita que vive dentro de mí está muy feliz y yo también, qué bueno que decidí nunca rendirme e impregnar en esta tesis lo mejor de mí porque no conozco otra manera de hacer todo con amor porque esa soy yo. Si siembras amor, amor cosecharas y esta tesis está cosechada con todo mi amor, disciplina, constancia, pasión y en muchos momentos paciencia por soltar todo lo que no estuvo en mi control. Hay muchas maneras de enseñarle al mundo quién eres y esta ha sido la mía.

Contenido

1.Introducción ..... - 1 -

2.Marco teórico ..... - 2 -

2.1.2. Clasificación botánica del maíz ..... - 3 -

2.1.3 Producción de maíz a nivel mundial ..... - 3 -

2.1.4 Producción de maíz en México ..... - 5 -

2.2 Organismos Genéticamente Modificados ..... - 7 -

2.2.1 Eventos transgénicos ..... - 8 -

2.2.2 Desarrollo de Maíz OGM ..... - 9 -

2.2.3 Evento DAS-Ø15Ø7-1 ..... - 9 -

2.2.5 Regulación de OGMs en México ..... - 10 -

2.3 Análisis de Organismos Genéticamente Modificados ..... - 11 -

2.3.1 Extracción de ADN ..... - 11 -

2.3.2. PCR en tiempo real para la detección de OGMs ..... - 13 -

2.3.3 Detección de Organismos Genéticamente Modificados ..... - 14 -

2.3.3.3. Límite de detección (LOD) ..... - 15 -

2.3.3.4. Límite de cuantificación (LOQ) ..... - 15 -

2.4. Uso de genes endógenos para la cuantificación de OGM en maíz ..... - 15 -

2.5 Materiales de referencia y Materiales de Referencia Certificados ..... - 18 -

2.5.1. Materiales de referencia Certificados (MRCs) para el análisis de OGMs - 18 -

2.4.2 MRCs de hoja de maíz para la detección de OGMs ..... - 20 -

3. Objetivo general ..... - 21 -

3.1 Objetivos particulares ..... - 21 -

4. Hipótesis ..... - 21 -

5. Metodología ..... - 22 -

5.1 Selección del método de extracción de ADN para maíz ..... - 22 -

5.1.1 Elaboración de disoluciones para los métodos de extracción de ADN .. - 23 -

5.1.2 Extracción de ADN con tres métodos de extracción en hoja y harina de maíz ..... - 25 -

5.1.3. Amplificación del gen de referencia del ADN de tres métodos de extracción ..... - 25 -

5.1.4. Selección de dos tratamientos de cada método de extracción ..... - 26 -

5.1.4.1. Método I: CTAB modificado ..... - 26 -

5.1.4.2 Método II: Fenol y β-mercaptoetanol ..... - 26 -

5.1.4.3. Método III: Urea modificado ..... - 26 -

5.1.4.4. Selección de un método de extracción de ADN en hoja y harina de maíz ..... - 27 -

5.1.5. Estandarización del método de urea modificado ..... - 27 -

5.2. Desarrollo del material de referencia interno ..... - 28 -

5.2.1. Extracción y cuantificación de ADN con el método de urea modificado ..... - 28 -

5.2.2. Evaluación de la especificidad en material de referencia negativo ..... - 28 -

5.2.3. Eficiencia de amplificación y evaluación de la presencia de inhibidores en material de referencia negativo ..... - 29 -

5.2.4. Eficiencia de amplificación en material de referencia negativo ..... - 29 -

5.2.5. Evaluación de la presencia de inhibidores en material de referencia negativo ..... - 30 -

5.2.5. Amplificación de genes de referencia en material de referencia negativo ..... - 30 -

5.2.5.1. Amplificación de gen de referencia empleando columna de purificación ..... - 31 -

5.3. Generación y extracción de ADN del material de referencia positivo - 32 -

5.3.1. Purificación de ADN de material de referencia negativo ..... - 34 -

5.4. Límite de Detección (LOD) del evento DAS-Ø15Ø7-1 del Material de eferencia ..... - 34 -

5.5. Límite de cuantificación (LOQ) del evento DAS-Ø15Ø7-1 del material de referencia ..... - 35 -

6. Resultados y análisis de resultados ..... - 35 -

6.1. Selección del método de extracción de ADN para maíz ..... - 35 -

6.1.2. Selección de dos tratamientos de cada método de extracción ..... - 36 -

6.1.3. Selección de un método de extracción de ADN en hoja y harina de maíz ..... - 37 -

6.1.3.1. Concentración ..... - 37 -

6.1.3.2. Relación de pureza ..... - 39 -

6.1.3.3. Ciclo de amplificación ..... - 40 -

6.1.3.4. Tiempo de proceso ..... - 42 -

6.1.3.5. Generación de residuos ..... - 42 -

6.1.4. Matriz de decisión cualitativa para la determinación del método óptimo de extracción ..... - 45 -

6.1.5. Estandarización del método de extracción de urea modificado ..... - 49 -

6.2. Desarrollo del material de referencia interno ..... - 50 -

6.2.1. Extracción de ADN con el método de urea modificado ..... - 50 -

6.2.1. 2. Rendimiento del material de referencia negativo ..... - 51 -

6.2.2. Evaluación de la especificidad en material de referencia negativo ……..- 52 -

6.2.3. Eficiencia de amplificación en material de referencia negativo ….- 53 -

6.2.5. Amplificación de genes de referencia en material de referencia negativo ……..- 57 -

6.2.5.1. Amplificación de gen de referencia empleando columna de purificación.....- 58 -

6.3. Generación y extracción de ADN del material de referencia positivo- 59 -

6.3.1. Purificación de ADN del material de referencia positivo.....- 61 -

6.4. Límite de detección .....- 62 -

6.4.1. Límite de Detección bajo condiciones de repetibilidad .....- 62 -

6.4.2. Límite de detección bajo condiciones de reproducibilidad intermedia ……- 63 -

6.4.3. Límite de detección bajo condiciones de robustez.....- 64 -

6.4.4. Análisis general del LOD.....- 66 -

6.5. Límite de cuantificación .....- 67 -

6.5.1. Límite de Detección bajo condiciones de repetibilidad.....- 67 -

6.5.2. Límite de cuantificación bajo condiciones de reproducibilidad intermedia .....- 68 -

6.5.3. Límite de cuantificación bajo condiciones de robustez.....- 68 -

6.5.4. Análisis general del Límite de cuantificación.....- 71 -

7. Conclusiones.....- 74 -

8. Literatura citada ……76

9. Anexos .....- 87 -

9.1.1. Método I: Glucosa y PVP .....- 88 -

9.1.2. Método II: Fenol y β-mercaptoetanol.....- 88 -

9.1.3. Método III: Urea modificado .....- 90 -

9.2. Certificado de Material de Referencia Certificado 1529.....92

Contenido de figuras

Figura 1. Mayores productores de maíz. Extraído del Informe semestral de sobre los mercados mundiales de alimentación. (FAO, 2022).....- 4 -
Figura 2. Volumen de la producción nacional de maíz grano durante el período 2014-2023. Imagen extraída del Panorama Agroalimentario de 2018-2024 del SIAP. .....- 6 -
Figura 3. Porcentaje del valor de la producción por entidad federativa durante el año 2023. Imagen recopilada del Panorama Agroalimentario 2018-2024 del SIAP .....- 6 -
Figura 4. Top 10 de los estados de mayor producción de maíz grano en México. Imagen recopilada del Panorama Agroalimentario 2018-2024 del SIAP.....- 7 -
Figura 5. Mapa de los mayores productores de transgénicos en el mundo. Imagen disponible en: https://fundacion-antama.org/la-superficie-mundial-de-cultivos-t/.....- 8 -
Figura 6. Constructo de elementos genéticos del evento DAS-Ø15Ø7-1. Imagen extraída de la base de datos del BiosafetyClearing House. Disponible en https://bch.cbd.int/es/database/LMO/BCH-LMO-SCBD-14841/13 .....- 9 -
Figura 7. Representación gráfica de la amplificación mediante PCR tiempo real. Disponible en https://www.google.com/search?q=pcr+en+tiempo+real.....- 14 -
Figura 8. Fragmento de cladograma que representa la identificación en todo el genoma de genes ADH. En la imagen se puede apreciar la presencia de estos genes en Zea mays. Imagen retomada de Su et al., 2020.....- 17 -
Figura 9. Anatomía del grano de maíz. En la imagen se muestran los principales componentes, se observa el endospermo, estructura donde se presenta la mayor cantidad de proteínas de zeina. Disponible en: https://www.inecol.mx/index.php/divulgacion/ciencia.....- 17 -
Figura 10. Diagrama de flujo del diseño experimental. .....- 33 -
Figura 11. Concentración de ADN por cada tratamiento en hoja de maíz.....- 38 -
Figura 12. Concentración de ADN por cada tratamiento en harina de maíz .....- 38 -
Figura 13. Ciclos de amplificación de los mejores tratamientos de extracción en hoja de maíz .....- 41 -
Figura 14. Ciclos de amplificación de los mejores tratamientos de extracción en harina de maíz .....- 41 -
Figura 15. Extracción de ADN con tratamiento F en hoja de maíz .....- 52 -
Figura 16. Curva estándar de presencia de inhibidores con la amplificación del gen de referencia HMG-A en una dilución 1:2. La curva cumple con todos los criterios de aceptación de pendiente, eficiencia y R2.....- 54 -
Figura 17. Curvas estándar de presencia de inhibidores con la amplificación del gen de referencia HMG-A en una dilución 1:2. Las curvas cumplen con todos los criterios de aceptación de pendiente, eficiencia y R2.....- 55 -
Figura 18. Amplificación de genes de referencia en hoja de maíz. En color rojo se presenta la amplificación de HMG-A, en color morado la amplificación de ADH1 y en azul se presenta la amplificación del gen Zeina .....- 58 -
Figura 19. Imagen de gráfico del espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c en muestras de ADN de hoja de maíz con la columna de purificación DNA Clean and Concentrator™, Zymo Research .....- 59 -
Figura 20. Imagen de gráfico en espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c donde se evaluó la concentración y pureza para establecer el LOD y el LOQ.....- 61 -

Contenido de cuadros

Cuadro 1. Descripción de tratamientos de tres métodos de extracción en hoja de maíz - ……- 22 -
Cuadro 2. Descripción de tratamientos de tres métodos de extracción en harina de maíz……- 23 -
Cuadro 3.. Programa de amplificación empleado para el termociclador QS6®……- 25 -
Cuadro 4. secuencias de cebadores y sonda para el gen de referencia HMG-A ……- 26 -
Cuadro 5. Estandarización del método de extracción de urea modificado en hoja de maíz ……- 28 -
Cuadro 6. Secuencias de cebadores y sondas para cada uno de los genes de referencia- 31 -
Cuadro 7. Volumen y concentración de los componentes de la mezcla de reacción utilizada en los ensayos de PCR. ……- 31 -
Cuadro 8. Masa de hoja de los materiales utilizados en la generación de las mezclas analíticas……- 32 -
Cuadro 9. Programa de amplificación empleado para el termociclador LC-480®. ……- 34 -
Cuadro 10. Resultados de concentración, pureza (A_{260}/A_{230} y A_{260}/A_{280}) ciclo de amplificación (Cq) de los tratamientos empleados en **hoja de maíz** ……- 35 -
Cuadro 11. Resultados de concentración, pureza y ciclo de amplificación de los tratamientos empleados en harina de maíz. ……- 36 -
Cuadro 12. Descripción de tratamientos empleados para la extracción de ADN a partir de hoja de maíz ……- 36 -
Cuadro 13. Descripción de tratamientos empleados para la extracción de ADN a partir de harina de maíz……- 37 -
Cuadro 14. Concentración de ADN en cada tratamiento de hoja y harina de maíz……- 37 -
Cuadro 15. Relación de pureza de mejores dos tratamientos en hoja y harina de maíz- 40 -
Cuadro 16. Ciclo de amplificación (Cq) de gen de referencia HMG-A en hoja y harina de maíz……- 40 -
Cuadro 17. Tiempo de proceso de cada uno de los tratamientos en **hoja de maíz** ……- 42 -
Cuadro 18. Criterios de evaluación para elección del método de extracción en hoja de maíz……- 44 -
Cuadro 19. Criterios de evaluación para elección del método de extracción en harina de maíz……- 45 -
Cuadro 20. Matriz cualitativa de decisión para tratamientos en hoja de maíz……- 46 -
Cuadro 21. Matriz cualitativa de decisión para tratamientos en harina de maíz ……- 46 -
Cuadro 22. Rendimiento y pureza de extracciones realizadas con el método de urea modificado del material ……- 51 -
Cuadro 23. Evaluación de la especificidad ……- 53 -
Cuadro 24. Eficiencia de amplificación del gen de referencia HMG-A en hoja de maíz.- 54 -
Cuadro 25. Prueba de presencia de inhibidores de qPCR ……- 56 -
Cuadro 26. Resultados de concentración, pureza y amplificación de gen HMG-A, ADH1 y zeina sin columna de purificación DNA Clean and Concentrator™, Zymo Research ……- 57 -
Cuadro 27. Muestras estandarizas de ADN de hoja de maíz purificadas mediante la columna DNA Clean and Concentrator™, Zymo Research ……- 59 -
Cuadro 28. Concentración y pureza de ADN extraído del material de referencia positivo. Porcentajes: 10, 1.0 y 0.10%. ……- 60 -

Cuadro 29. Concentración y pureza de ADN extraído del material de referencia positivo: 0.5, 0.025 y 0.010%. ..... - 60 -
Cuadro 30. Concentración y pureza del material de referencia positivo 10, 1 y 0.1% purificadas ..... - 61 -
Cuadro 31. Concentración y pureza del material de referencia positivo 0.05, 0.025 y 0.01% purificadas ..... - 62 -
Cuadro 32. Límite de detección bajo condiciones de repetibilidad ..... - 63 -
Cuadro 33. Límite de detección bajo condiciones de reproducibilidad intermedia..... - 64 -
Cuadro 34. Límite de detección bajo condiciones de robustez ..... - 65 -
Cuadro 35. Límite de Cuantificación bajo condiciones de repetibilidad ..... - 69 -
Cuadro 36. Límite de Cuantificación bajo condiciones de reproducibilidad intermedia. - 69 -
Cuadro 37. Límite de Cuantificación bajo condiciones de robustez ..... - 70 -

Glosario de abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

C^-: Control negativo

C^+: Control positivo

CENAM: Centro Nacional de Metrología

CNRIBA: Centro Nacional de Referencia de Inocuidad y Bioseguridad Agroalimentaria

Cp: *Cross point:* punto de cruce (producto del algoritmo de amplificación del termociclador Light Cycler 480®

Ct: *tresholdCycle*; ciclo umbral del termociclador QuantStudio 6 Pro (Applied Biosystem®)

Cq: Ciclo de amplificación

DAMNT: Departamento de Análisis Moleculares y Nuevas Tecnologías

ISAAA: *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications*

JRC: *Joint Research Centre*

LBOGM: Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados

LOD: *Limit of Detection* (Límite de Detección)

LOQ: *Limit of Quantification* (Límite de Cuantificación)

MR: Material de Referencia

MRC: Material de Referencia Certificado

µL: Microlitro

ng: Nanogramos

NTC: *Not Template Control*

OGM: Organismo Genéticamente Modificado

OGMs: Organismos Genéticamente Modificados

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

qPCR: Reacción en Cadenada de la Polimerasa tiempo real

SADER: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural

SENASICA: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria

ΔCp: Incremento de punto de cruce

Resumen

Se compararon tres métodos de extracción de ADN a partir de hoja y harina de maíz; mediante una matriz cualitativa de decisión se eligió el método con los valores más altos tomando en cuenta los siguientes criterios: 1) rendimiento, 2) relación de pureza, 3) menor ciclo de amplificación, 4) menor tiempo de procesamiento y 5) menor cantidad de residuos químico-peligrosos. Se optimizó el método de urea modificado para hoja de maíz. A partir de 10 muestras se desarrolló un material de referencia negativo de hoja de maíz interno del Departamento de Análisis Moleculares y Nuevas Tecnologías, con este material negativo se realizaron 250 extracciones con el método de urea modificado. Posteriormente, a estas extracciones se les realizó un ensayo de especificidad donde se verificó que los iniciadores y las sondas eran específicos de los genes de referencia a evaluar y de la especie. Se evaluó la presencia de inhibidores y la eficiencia de amplificación en las extracciones de ADN de hoja de maíz. Se evaluó mediante PCR tiempo real la amplificación de tres genes de referencia (HMG-A, ADH-1 y zeina) y se seleccionó el gen de referencia HMG-A como el gen de referencia que presentó el ciclo de amplificación más temprano para continuar con ensayos cualitativos y cuantitativos. Una vez que se comprobó que el método de extracción permitió obtener ADN de hoja de maíz con alto rendimiento y pureza sin la presencia de inhibidores se desarrolló un material de referencia positivo al evento transgénico DAS-Ø15Ø7-1 en hoja de maíz. Se extrajo ADN del material de referencia positivo con el método de urea modificado y se estableció el límite de detección y cuantificación práctico bajo condiciones de repetibilidad, reproducibilidad intermedia y robustez en dos equipos de termociclador tiempo real; QuantStudio 6 Pro (Applied Biosystem®) y Light Cycler 480® (Roche Diagnostics). Se estableció que tanto el límite de detección práctico como el límite de cuantificación práctico fue 0.010%. El método optimizado permitió el análisis cualitativo y cuantitativo de modificaciones genéticas en hoja de maíz.

1.Introducción

Los Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) fueron creados para revertir las limitaciones que se presentan en el campo y satisfacer las demandas de alimentación, especialmente en países en vía de desarrollo. El fitomejoramiento, por lo tanto, surgió como resultado al querer mejorar los caracteres deseados de la planta. Los OGMs, especialmente los cultivos de plantas han permanecido en el mercado por más de 25 años. A partir del mejoramiento genético se reducen los mayores enemigos de los cultivos de interés agroalimentario, tanto los que representan el estrés biótico y abiótico desde plagas y enfermedades; hasta la alta salinidad, los metales pesados y las altas temperaturas. De esta manera, los rendimientos aumentan en forma significativa (Uslu, 2021).

Existen diversas regulaciones de los OGM; en primera instancia, se presentó el protocolo de Cartagena, que "abarca el movimiento transfronterizo, 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, teniendo en cuenta los riesgos para la salud humana" (ISAAA, 2004). Cada país establece sus propias regulaciones sobre OGM, una de las más avanzadas es de la Unión Europea, donde el cultivo GM se encuentra regulado bajo la Directiva 2001/18/EC (2001) que se encarga de la liberación de OGMs al ambiente, la Regulación (EC) 1829/2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente, la Regulación (EC) 1830/2003 que regula la trazabilidad y el etiquetado de OGMs y de alimentos y piensos producidos a partir de ellos (Bohle *et al.,* 2024).

En México la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, su reglamento y las Normas Oficiales Mexicanas sobre el reporte de resultados de la o las liberaciones realizadas de organismos genéticamente modificados, y de etiquetado de organismos genéticamente modificados que sean semillas o material vegetativo destinados a siembra, cultivo y producción agrícola, constituyen el marco regulatorio aplicable. El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), ejecuta las actividades que competen a la Secretaría de Agricultura, entre las que se encuentran atender las solicitudes de liberación, y en su caso, emitir los permisos correspondientes en la etapa que corresponda: en programa piloto, experimental, o comercial, así como aplicar las medidas de seguridad y de urgente aplicación.

En el laboratorio, la técnica de PCR en tiempo real constituye la evidencia confiable y reconocida a nivel mundial para determinar si un producto contiene modificaciones genéticas. El Centro Nacional de Referencia de Inocuidad y Bioseguridad Agroalimentaria, a través del Departamento de Análisis Moleculares y Nuevas Tecnologías, realiza el análisis de productos agroalimentarios para la detección, identificación y cuantificación de OGM competencia de la Secretaría de Agricultura. Por lo que, para garantizar la confiabilidad de los resultados, se requieren materiales de referencia certificados (MRC), los cuales son materiales suficientemente homogéneos y estables con respecto a una o más propiedades y que han sido establecidos para su uso previsto en un proceso de medición (Carson *et al.,*

2024). La cuantificación de organismos genéticamente modificados se encuentra limitada al desarrollo de materiales de referencia certificados, en México el encargado de desarrollar estos materiales es el Centro Nacional de Metrología (CENAM). Sin embargo, hasta el momento, no se ofrece algún material de referencia certificado en hoja de maíz.

El primer paso para comenzar con el análisis de modificaciones genéticas consiste en aislar de manera exitosa ADN de alta calidad. De esta manera, uno de los objetivos del presente proyecto consistió en optimizar un método de extracción de ADN en hoja de maíz y desarrollar un material de referencia interno en hoja de maíz para los ensayos cualitativos y cuantitativos del evento DAS-Ø15Ø7-1 mediante qPCR.

2.Marco teórico

2.1. Historia del maíz e importancia en México

Aún no se han resuelto completamente los detalles que permiten explicar el origen y domesticación del maíz. Sin embargo, diversas investigaciones han demostrado que su centro de origen se encuentra en México y que su ancestro en común es el teocintle. Este hecho se encuentra fundamentado principalmente en tres evidencias: a) los restos arqueológicos más antiguos se han encontrado en México; específicamente en la cueva de Guilá Naquitz, Oaxaca con una antigüedad de aproximadamente 7 000 años (aunque los científicos remontan este cultivo a más de 10 000 años); b) el teocintle sólo se ha encontrado de manera silvestre en México y algunas regiones de América Central, c) la mayor cantidad de variedades criollas se presentan también en nuestro país (Vielle, 2007; Velázquez, 2018).

La mayoría de la literatura sugiere que México es el centro primario de origen del maíz y la zona Andina el secundario, donde ha tenido una rápida evolución. Existen diversos modelos probables del origen y evolución del maíz, como: a) evolución vertical del maíz moderno a partir del silvestre; b) progresión de teocintle a maíz; c) separación del maíz y del teocintle, originados ambos de un ancestro común, habiéndose separado durante el proceso evolutivo; d) la hibridación, habiéndose originado el maíz como un híbrido entre teocintle y una gramínea desconocida (Acosta, 2009).

El cultivo del maíz es de gran relevancia en México, en él se basa la alimentación del país; México tiene la responsabilidad ante el mundo de preservar el nicho sociocultural y biofísico. El proceso coevolutivo que ha presentado el maíz a través de la historia ha permitido su cultivo en distintos climas, tanto cálidos como templados (Guevara-Hernández, 2019). Sin embargo, su producción se encuentra limitada por diversos factores como las altas temperaturas y sequías que tienen un efecto directo en la fenología de este cultivo, afectando a los microorganismos de la rizosfera encargados del reciclaje de nutrimentos, reduciendo la efectividad de los fertilizantes que a su vez incrementa los costos de producción lo que representa grandes retos para los productores y a largo plazo, un factor de riesgo para la seguridad alimentaria (Gordón, 2021).

2.1.2. Clasificación botánica del maíz

El maíz es una planta monocotiledónea que pertenece a la familia Gramineae o Poaceae, una de las familias botánicas más importantes en la alimentación mundial, dentro de ella se encuentra además del maíz, cereales como: trigo, arroz, avena, centeno y triticale (Saavedra, 2014). El género *Zea* L. (Poaceae/Tribu Maydeae) es uno de los más importantes en la alimentación humana y animal, el maíz (*Zea mays* ssp. *mays*), perteneciente a este género se cultiva en todos los continentes. A todas las especies silvestres de este género se les ha denominado teocintle. Dentro de este ggrupo se encuentran cuatro especies: *Zea luxurians* (Durieu & As-cherson) Bird, *Zea nicaragüensis* (Iltis & Benz), *Zea diplope-rennis* Iltis (Doebley & Guzmán) y *Zea perennis* (Reeves & Mangelsdorf); y tres subespecies *Zea mays* L. (Zea mays ssp. parviglumis Iltis & Doebley, *Zea mays* ssp. mexicana Schrader, y *Zea mays* ssp. huehuetenanguensis Iltis & Doebley) (Sánchez, 2011).

El maíz es una planta anual originaria de América, con una distribución cosmopolita que se extiende a la mayoría de las regiones del mundo, exceptuando la Antártida y el Ártico, mientras que en África su distribución se encuentra restringida. Constituye una de las fuentes principales de alimento de millones de personas principalmente en América y Asia. Se trata de una de las primeras plantas que se domesticaron y se difundieron por todo el mundo, después del trigo. El maíz es un cultivo dinámico y con múltiples formas y colores, a la selección de los principales tipos y formas se les denomina ¨razas¨. Las diversas razas se nombran a partir de características físicas. En México se han reportado más de 64 razas, de las cuales, 59 se pueden considerar nativas (CONABIO, 2022).

Según Acosta (2009) la taxonomía del maíz es:

Reino: Plantae
  División: Espermatofitas
    Subdivisión: Angiospermas
      Clase: Monocotiledoneae
        Subclase: Glumiflorae
          Orden: Poales
            Familia: Poaceae
              Tribu: Maydeae
                Género: Zea
                  Especie: *Zea mays* L.

2.1.3 Producción de maíz a nivel mundial

El maíz, es el cultivo más producido a nivel mundial. Este cereal, en la actualidad se cultiva en al menos 164 países (CropTrust, 2022). Estados Unidos es el mayor productor de maíz; y a su vez, el mayor productor de cultivos transgénicos en el mundo, entre los más importantes destacan soya, canola, algodón y maíz; siendo el maíz el cultivo de mayor producción (50%). La producción de este cereal se ha visto afectada durante los últimos años debido a diversos factores, en el año 2022, se estimó aproximadamente una disminución global de 188 millones de toneladas

(1.6% menos respecto a 2021). Esta disminución se centró en América del Norte, específicamente en Estados Unidos debido a un mal tiempo que se presentó durante la primavera de ese año; en Europa, la producción de Ucrania cayó aproximadamente 50% debido a que la guerra ha restringido significativamente tanto a los insumos agrícolas como la tierra de siembra. En América del Sur, la producción de Brasil aumentó, mientras que la estimación de producción para Argentina se espera siga disminuyendo cada año (FAO, 2022). En la figura 1 se muestra la producción de los principales productores de maíz en todo el mundo durante los años 2018-2022. Se muestra como mayor productor Estados Unidos, seguido por China, Brasil y la Unión Europea.

Para las empresas biotecnológicas invertir en el desarrollo de variedades transgénicas podría ser favorable en problemas a los que se enfrentan los cultivos, incrementando la producción y ayudando a la resistencia ante plagas; a pesar de estas ventajas, la liberación de cultivos OGM supone un riesgo muy alto que algunos países no quieren tomar, especialmente en regiones que poseen una gran riqueza biológica y una larga tradición cultural en el cultivo del grano, como es el caso del maíz en México (González Ávila, 2014, Martínez, 2021).

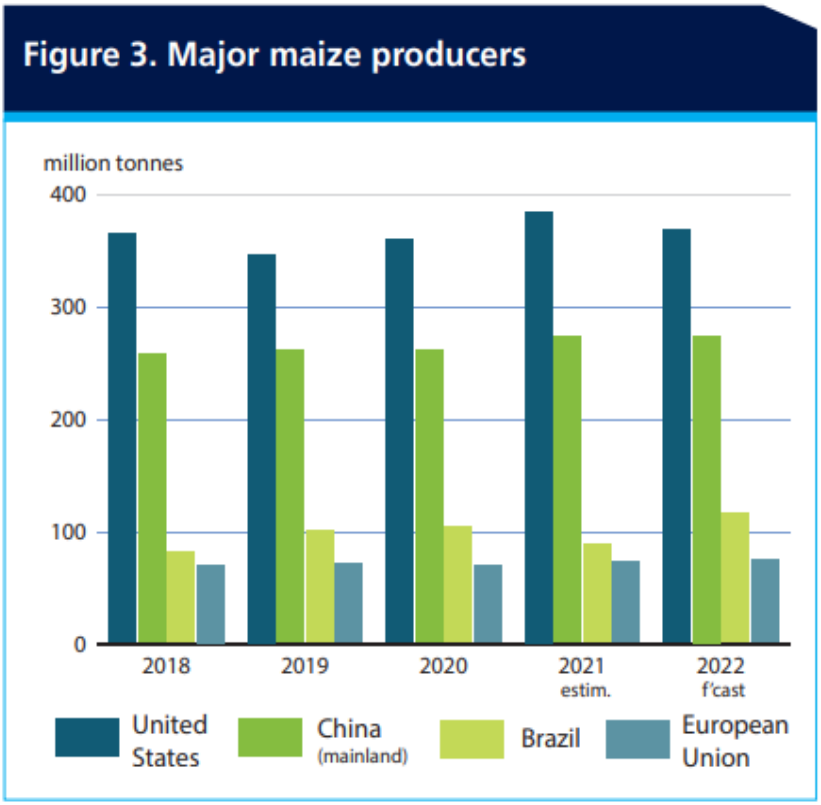

***Figura 1**. Mayores productores de maíz. Extraído del Informe semestral de sobre los mercados mundiales de alimentación. (FAO, 2022).*

2.1.4 Producción de maíz en México

En México, el maíz es el cultivo que ocupa mayor superficie de siembra, se obtienen alrededor de 27 millones de toneladas anuales, colocándose como el sexto productor de maíz a nivel mundial. Se estima que existe un promedio de 3.2 millones de productores de maíz. En la actualidad se buscan nuevas estrategias para implementar una producción sustentable que construya sistemas alimentarios sólidos y resilientes (CIMMYT, 2021; Secretaría del Campo, 2021). La gran diversidad de maíz se encuentra estrechamente relacionada con la diversidad geográfica y cultural del país, a lo largo de toda su historia, los agricultores tradicionales han seleccionado las mejores semillas de acuerdo con los ambientes y usos específicos; dando como resultado variedades mexicanas criollas únicas (CIMMYT, 2021).

El maíz en México se divide principalmente entre maíz forrajero y maíz de grano, el maíz forrajero se emplea como alimento para ganado en varias etapas del crecimiento de la planta; mientras que el maíz de grano es un cereal que se consume como alimento humano. A su vez, el maíz grano se divide en maíz blanco y amarillo, el maíz blanco se produce principalmente para consumo humano, contine gran cantidad de carbohidratos, y su uso puede destinarse como grano entero, harinas o productos derivados. Contiene un poco más de calorías que el amarillo. Mientras que el maíz amarillo se utiliza principalmente procesado para elaborar productos de la industria para la producción de almidón, frituras y cereales, dietas balanceadas o como alimento de ganado (SADER, 2020).

En 2023, la producción de maíz forrajero alcanzó 15 millones 432 mil toneladas, con una baja de 568 mil toneladas respecto al promedio de los últimos diez años y 10.5% en comparación con el año anterior. Jalisco fue la entidad federativa con mayor producción nacional, aportando 4, 583, 655 toneladas, seguido de Durango (2, 296, 025 toneladas) y Zacatecas (1, 591, 801 toneladas). La cosecha de maíz forrajero se obtiene durante las dos temporadas producción, sin embargo, la mayor recolección de este cultivo se da durante los meses de agosto a diciembre mediante sistemas de riego (SIAP, 2024, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2023).

La producción de maíz grano en el año 2023, registró una producción de 27 millones 550 mil toneladas (Figura 2), 3.8% más en relación con 2022. A diferencia del maíz forrajero, en este cultivo la entidad federativa con mayor producción fue Sinaloa, con una producción de 6, 656, 331 toneladas; mientras que Jalisco ocupó el segundo lugar en producción con 3, 498, 653 toneladas (Figura 3 y 4). Datos del SIAP, indican que a pesar de que el precio promedio del grano en Sinaloa disminuyó 15.6% en comparación con 2022, el aumento de la producción favoreció que la producción de las cosechas se incrementara en 5.8% (SIAP, 2024).

La producción nacional de maíz grano ha fluctuado entre 26 y 27 millones de toneladas, lo que representa aproximadamente 2.3% de la producción mundial. Por lo tanto, México es el 6° productor de maíz grano en el ranking mundial. En 2023, las importaciones alcanzaron su cifra más alta en la última década. Siendo Estados Unidos el país que encabezó el suministro al mercado nacional con 17 millones 355 mil toneladas. Y los países de mayor exportación son: Cuba, Guatemala, Costa Rica,

Reino Unido, España, Honduras, El Salvador, Países Bajos, Dinamarca y Canadá. Mientras que, los países de mayor importación son: Estados Unidos, Brasil, Sudáfrica, Argentina, Canadá y Francia (SIAP, 2024).

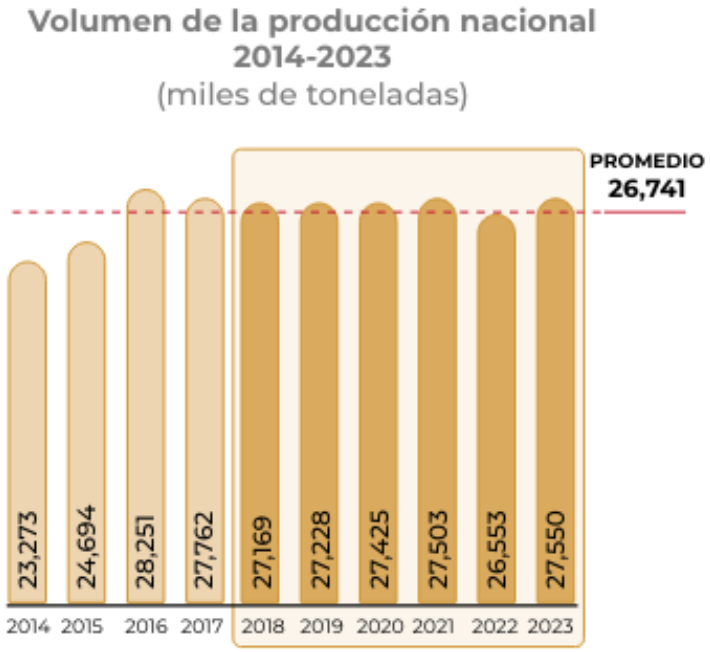

***Figura 2**. Volumen de la producción nacional de maíz grano durante el período 2014-2023. Imagen extraída del Panorama Agroalimentario de 2018-2024 del SIAP.*

***Figura 3.** Porcentaje del valor de la producción por entidad federativa durante el año 2023. Imagen recopilada del Panorama Agroalimentario 2018-2024 del SIAP*

Top 10 en volumen de producción
Principales entidades

Rank	Entidad federativa	Región	Volumen (toneladas)	Variación (%) 2022-2023
	Total nacional		27,549,918	3.8
1	Sinaloa	Noroeste	6,656,331	25.4
2	Jalisco	Centro-Occidente	3,498,653	-12.2
3	Michoacán	Centro-Occidente	1,905,198	-9.0
4	México	Centro	1,811,192	1.8
5	Guanajuato	Centro-Occidente	1,762,463	-7.2
6	Chihuahua	Noreste	1,601,890	-7.5
7	Guerrero	Centro	1,425,672	-4.4
8	Veracruz	Sur-Sureste	1,343,228	-0.8
9	Chiapas	Sur-Sureste	1,327,895	-3.7
10	Puebla	Centro	1,139,814	57.2
	Resto		5,077,583	5.6

Figura 4. *Top 10 de los estados de mayor producción de maíz grano en México. Imagen recopilada del Panorama Agroalimentario 2018-2024 del SIAP.*

2.2 Organismos Genéticamente Modificados

La Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados define un OGM a cualquier organismo vivo con excepción de los seres humanos, que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna. En 1982, científicos pertenecientes a la Universidad de Washington, St. Louis, Missouri, y de la Universidad de Ghent en Bélgica; lograron al mismo tiempo y en estrecha competencia desarrollar la construcción de un gen quimérico que confería resistencia a antibióticos a células vegetales transformadas (Bayer, 2024; Kranaskis, 2019, Li *et al*., 2022, Rostoks *et al.,* 2019). A partir de este suceso, los transgénicos se han esparcido alrededor del mundo en todo tipo de cultivos (Massieu, 2009).

Los Organismos Genéticamente Modificados son similares a sus homólogos naturales con la diferencia de que, mediante ingeniería genética han sido mejorados en una o más características (Carvajal *et al.,* 2017; Spanea *et al*., 2020; Demeke *et al.,* 2021). A partir del año 1996 dio inicio la adopción en el mercado de los OGMs y desde ese momento el número de cultivos transgénicos ha aumentado exponencialmente. Su uso en la superficie mundial aumentó un 3.3% en 2022 alcanzando los 202,2 millones de hectáreas, la superficie más alta jamás sembrada hasta ese momento. Este incremento se ha visto impulsado por el aumento de siembra en Brasil, Australia, India, Paraguay y Sudáfrica, que compensaron las caídas registradas en Estados Unidos, Canadá, Pakistán, China y Filipinas (Fundación Antama, 2024). En la figura 5 se muestra un mapa de los principales países productores de transgénicos en el mundo.

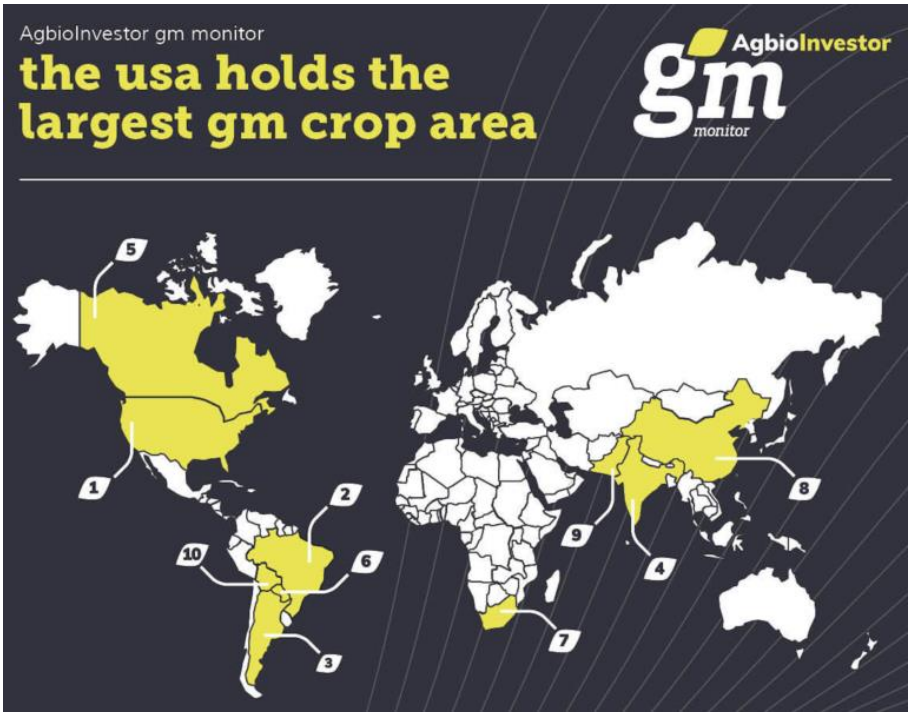

***Figura 5**. Mapa de los mayores productores de transgénicos en el mundo. Imagen disponible en: https://fundacion-antama.org/la-superficie-mundial-de-cultivos-t/*

Datos del último informe anual de AgrobioInvestor indican que, en 2022, 27 países cultivaron semillas modificadas genéticamente. Estados Unidos mantuvo su posición de liderazgo en el ranking mundial de cultivos transgénicos con 74,47 millones de hectáreas sembradas, aunque registra una caída de un 1 % respecto al año anterior. Estos datos convierten a los productos biotecnológicos en la tecnología de más rápida adopción en los últimos años. La soya es el cultivo que ocupa el primer lugar (48.9 % de la superficie mundial de productos biotecnológicos), seguido del maíz (32 %), la semilla de algodón (13.5 %) y la colza (5.3 %) (Fundación Antama, 2023; Vahdani *et al*., 2024).

2.2.1 Eventos transgénicos

Se denomina evento transgénico a la recombinación única de ADN que se inserta en las células usadas para dar una planta completa. Cada evento se identifica con una abreviación y cada evento se diferencía uno de otro en los elementos y genes insertados, en los sitios de inserción en el genoma de la planta, en el número de copias y en los patrones y niveles de expresión de las proteínas de interés (Álvarez-Buylla, 2018). En la base de datos del ISAAA se presenta una lista de 587 eventos transgénicos para todos los cultivos alrededor del mundo. Siendo el maíz el cultivo que presenta mayor número de eventos transgénicos. En esta lista, se presenta el nombre del evento y su código perteneciente, por ejemplo (Nombre: J10, Código: MON-ØØ1Ø1-8; Nombre: 19-51a, Código: DD-Ø1951A-7) (ISAAA, 2024).

Cada Organismo Genéticamente Modificado comercializado cuenta con un identificador único registrado, el cual es un elemento clave para la trazabilidad y el etiquetado de los alimentos y piensos derivados de OGMs, con el que se pretende mejorar la elección de los consumidores y salvaguardar la salud y el medio

ambiente. Para comprobar que cada OGM cuenten con un identificador único se tiene un formato específico al cual obedecen la base de datos BioTrack de la Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE) y el Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología (BCH) del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio de la Diversidad Biológica (EUR-Lex, 2016).

2.2.2 Desarrollo de Maíz OGM

El genoma del maíz ha sido modificado mediante técnicas de ingeniería genética confiriendo principalmente dos características: tolerancia a herbicidas (genes *epsps* y *pat*) y resistencia a los insectos (gen *cry*) (Vergaray *et al.,* 2023). Actualmente, en la base de datos del Servicio de Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas (ISAAA) se reportan 307 eventos que se han desarrollado a nivel mundial en maíz que son utilizados como alimento para humanos y animales (ISAAA, 2025). Los Organismos Genéticamente Modificados fueron desarrollados con el propósito de satisfacer la necesidad de obtener más y mejores alimentos, pero desde el comienzo de su comercialización ha existido una preocupación constante de la tecnología de ADN recombinante causando controversias en la comunidad científica, agricultores, autoridades y consumidores (León y García-Bustelo, 2003; Kato-Yamakake, 2004; Vergaray *et al.,* 2023). En México, este riesgo se ha visto agudizado en el maíz debido a que en él se presenta la mayor variación genética de este cultivo en el mundo.

2.2.3 Evento DAS-Ø15Ø7-1

El maíz que contiene este evento ha sido modificado con la inserción del gen *Cry1F* de *Bacillus thuringiensis* para conferir resistencia a *Ostrinia nubilalis*. Para protegerlo de la fitofagia del insecto. También, cuenta con un inserto que codifica la tolerancia al herbicida fosfinotricina (PPT), concretamente al glufosinato de amonio. La tolerancia permite a la planta completar su fase de desarrollo desde juvenil hasta adulto. Fue creado por dos organizaciones, Dow AgroSciences y Pioneer Hi-Bred International Inc. Cuenta con el vector PHI8999A derivado del plásmido PHP8999 y fue creado mediante la técnica de biobalística/ pistola de partículas (BCH, 2019). En la figura 6 se presenta el constructo de los elementos genéticos de este evento transgénico, se observa que cuenta con el promotor de ubiquitina y el promotor 35S, por lo tanto, la detección de este evento se puede realizar mediante ensayos cualitativos de presencia del promotor 35S.

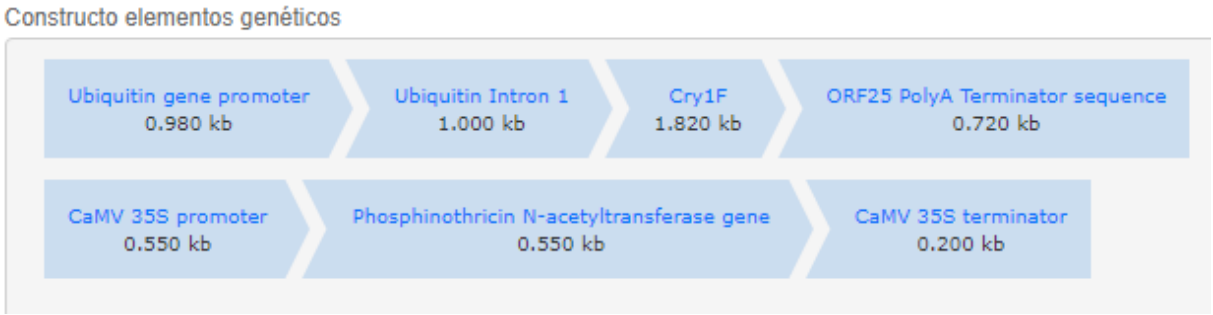

Figura 6. *Constructo de elementos genéticos del evento DAS-Ø15Ø7-1. Imagen extraída de la base de datos del BiosafetyClearing House. Disponible en https://bch.cbd.int/es/database/LMO/BCH-LMO-SCBD-14841/13*

2.2.4 Regulación Internacional de Organismos Genéticamente Modificados (OGM)

Por un lado, los OGM ofrecen ventajas sobresalientes en la producción ofreciendo un gran potencial al bienestar humano, sin embargo, los avances biotecnológicos deben desarrollarse con medidas de bioseguridad adecuadas; para ello, se cuenta con marcos reguladores como el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), del que forma parte el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología, el cual es un protocolo mundial jurídicamente vinculante que pretende contribuir a garantizar la transferencia, manipulación y utilización seguras de los organismos vivos modificados (OVM) creados mediante la biotecnología moderna. Fue firmado en Montreal, Canadá, el 29 de enero de 2000. Sin embargo, el texto original se redactó en Cartagena de Indias, Colombia, en 1999. México ratificó este protocolo el 30 de abril de 2002 y entró en vigor en el país el 11 de septiembre. Este protocolo se encuentra formado por 173 partes. Su principal objetivo es proteger la biodiversidad de los riesgos potenciales de los organismos vivos modificados resultantes de la biotecnología moderna y garantizar que la biotecnología se aplique de manera sostenible y que reduzca los riesgos de la salud humana y el medio ambiente (ISAAA, 2004; BCH, 2023; BCH, 2024).

Por otra parte, en la Unión Europea, el cultivo GM se encuentra regulado bajo la Directiva 2001/18/EC (2001) que se encarga de la liberación de OGM al ambiente, la Regulación (EC) 1829/2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente, la Directiva (EC) 2015/412 encargada de la posibilidad que poseen los miembros de la UE para restringir o prohibir el cultivo de OGM dentro de su territorio, la Regulación (EC) 1830/2003 que regula la trazabilidad y el etiquetado de OGMs y de alimentos y piensos producidos a partir de ellos; y por la Directiva 2009/41/EC que contiene la regulación del uso de microorganismos genéticamente modificados sobre los movimientos transfronterizos de OGM (León et al., 2003; Purnhagen *et al.,* 2018; Bohle *et al.,* 2024).

2.2.5 Regulación de OGMs en México

La Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados publicada el 18 de marzo de 2005 entró en vigor una en el marco legal en México, la cual tiene por objecto regular las actividades de utilización confinada, liberación experimental, liberación en programa piloto, liberación comercial, comercialización, importación y exportación de Organismos Genéticamente Modificados, en esta ley se presentaron las Reglas y Normas Internacionales derivados básicamente del Protocolo de Cartagena y se integra por siete ordenamientos legales publicados en el Diario Oficial de la Federación, entre ellos: 1) La Ley De Bioseguridad De Organismos Genéticamente Modificados, 2) El Reglamento de la Ley De Bioseguridad De Organismos Genéticamente Modificados, 3) El Acuerdo por el que se delegan en el titular del SENASICA y sus directores generales funciones específicas (SENASICA, 2016).

La Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados regula las actividades de utilización confinada, liberación experimental, liberación en

programa piloto, liberación comercial, comercialización, importación y exportación de organismos genéticamente modificados. El objetivo primordial de esta ley es tener control, prevenir, reducir o evitar los riesgos que las actividades relacionadas con el desarrollo de OGMs puedan causar a la salud humana o al medio ambiente y a la diversidad biológica o a la sanidad animal, vegetal y acuícola. En esta ley se establece la utilización confinada, es decir, cualquier actividad por la que se modifique el material genético o se cultive, almacene, procese, transporte, comercialice, destruya o elimine cualquier OGM. Para cumplir con todos los requerimientos necesarios en tema de OGMs se cuenta con el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) que trabaja con algunas secretarías del gobierno federal, con los gobiernos de los estados, el Congreso de la Unión y con organizaciones de productores (Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, 2005; SENASICA, 2021, SENASICA, 2023).

El SENASICA es un órgano administrativo desconcentrado de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) que participa en las políticas para la regulación nacional de seguridad de los OGM. En el ordenamiento tres se delegan en los titulares de las Direcciones Generales de Salud Animal, Sanidad Vegetal, y de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera del SENASICA las funciones y facultades de resolver las solicitudes, y en su caso, emitir los permisos correspondientes de liberación en programa piloto, experimental, comercial, y la importación de OGMs; así como aplicar las medidas de seguridad y de urgente aplicación, en los casos previstos por la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados y su reglamento. Específicamente para la Dirección de Sanidad Vegetal, vegetales que se consideren especies agrícolas, incluyendo semillas y cualquier otro organismo o producto, con excepción de las especies forestales reguladas por la Ley General de la Vida Silvestre y la Ley General de Desarrollo Rural Sustentable; entre otros (Diario Oficial de la Federación, 2009).

2.3 Análisis de Organismos Genéticamente Modificados

2.3.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN es un paso crucial en el análisis molecular, un método óptimo de extracción requiere obtener buenos rendimientos de ADN, lo que implica poder realizar modificaciones al método para obtener mejores y más altas concentraciones de ADN. Los diferentes métodos de extracción combinan procesos de lisis, eliminación de proteínas, precipitación y purificación del ADN (Mazzara *et al.,* 2006; Tamari y Hinkley, 2016; Dairawan y Shetty, 2020; Weng *et al.,* 2020; Paz *et al.*, 2023). El primer paso en la extracción de ADN consiste en la lisis celular, que se realiza con el objetivo de liberar los ácidos nucleicos y otros compuestos celulares, este proceso se puede llevar a cabo por lisis química, mecánica, eléctrica, ultrasónica y enzimática (Paul *et al*., 2020). Posteriormente, se separan los ácidos nucleicos del resto de proteínas e impurezas celulares. Finalmente se precipita el ADN mediante sales y se resuspende en agua grado biología molecular. Adicionalmente, se pueden incluir procesos de purificación de ADN que generalmente se lleva a cabo mediante una columna de un kit de purificación comercial.

La extracción de ADN se realiza en una gran diversidad de estudios, desde filogenéticos (Chakraborty *et al.*, 2020), para la detección de enfermedades en plantas y animales (Paul *et al.,* 2020; Hariharan y Prasannath, 2021, Wang *et al.,* 2022), encontrar ADN ambiental (Shu *et al.*, 2020), se extrae ADN de muestras de bacterias (Tourancheau *et al.*, 2021), de agua, de suelo (Semenov, 2019), a partir de fluidos corporales como saliva, sangre, entre otros (Li *et al.,* 2020; Middleton *et al.,* 2022). De manera general, estos estudios se generan en tres etapas principales: la extracción de ácidos nucleicos, la amplificación y posteriormente la detección.

Los protocolos en los que se emplea Bromuro de trimetil-cetil amonio (CTAB) son actualmente las técnicas de extracción de ADN más comúnmente aplicados, desde su invención por Doyle y Doyle (Schenk *et al.,* 2023). La extracción empleando CTAB consiste en la formación de un complejo insoluble de ácidos nucleicos en un medio bajo en sales, en estas condiciones los compuestos fenólicos, polisacáridos, proteínas, entre otros compuestos quedan en el sobrenadante. Generalmente, se hacen lavados con cloroformo, finalmente el ADN es solubilizado al aumentar la concentración de sales y es precipitado con isopropanol y etanol. Este método se basa principalmente en tres etapas: lisis celular, extracción del ADN y precipitación (Matthes *et al*., 2020).

Debido a las regulaciones en materia de Organismos Genéticamente Modificados, para la autorización y el seguimiento de los alimentos y piensos modificados genéticamente incluyendo las disposiciones legales del etiquetado, son requeridos métodos de extracción que permitan la detección, identificación y cuantificación del producto modificado (Corbisier *et al.,* 2022). Por lo tanto, es necesario establecer métodos de extracción de ADN en plantas de gran calidad para realizar los ensayos analíticos posteriores. Sin embargo, aún la extracción de ácidos nucleicos puede ser un gran reto, sobre todo, a partir de tejidos vegetales que generalmente involucran procesos largos y costosos. Especialmente cuando se extraen ácidos nucleicos a partir de plantas con gran cantidad de polisacáridos y compuestos fenólicos. A pesar de ello, asegurar la calidad es primordial ya que el ADN de baja calidad puede comprometer los ensayos posteriores (Masoomi-Aladizgeh *et al.,* 2023).

La extracción de ADN en plantas es complicada debido a las propiedades anatómicas y químicas que permiten sobrevivir a las plantas en su entorno (Schenk *et al*., 2023). Específicamente su extracción y purificación en cereales resulta una tarea ardua por la cantidad de polisacáridos, proteínas, así como inhibidores de la ADN polimerasa como taninos, alcaloides y polifenoles (Abdel-Latif y Osman, 2017; Paz *et al.,* 2023). La eliminación eficaz de estos componentes químicos es requerida durante el aislamiento del ADN, ya que se pueden unir al pellet generando un color marrón que podrá interferir en los ensayos de amplificación, sin embargo, este paso incluye la separación de fases y recolectar de manera muy cuidadosa la fase acuosa, lo que puede impedir un alto rendimiento en algunos protocolos manuales (Gupta *et al.,* 2020; Vicente, 2021). La coloración marrón presente en el pellet de ADN puede deberse a diversos factores, entre ellos; las especies reactivas de oxígeno (Macedo-Márquez, 2012; Matus *et al.,* 2021).

2.3.2. PCR en tiempo real para la detección de OGMs

Es importante seleccionar la técnica analítica que permita detectar secuencias de modificación genética con alta sensibilidad, exactitud, reproducibilidad, y confiabilidad. Actualmente, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es la técnica que permite la síntesis específica y exponencial de una región de ADN mediante el uso de fragmentos diseñados específicamente (llamados primers, oligonucleótidos o cebadores), que forman el inicio y el término de la región que se va a amplificar. La amplificación general mediante PCR cuenta con una alta especificidad que es determinada por la correcta hibridación de las secuencias específicas de primers para completar las secuencias presentes en la molécula de ADN blanco a amplificar.

Los cebadores de PCR comprenden secuencias específicas que están diseñadas para la hibridación de la hebra paralela o antiparalela de ADN objetivo. Una vez hibridados con el ADN objetivo, los cebadores proporcionan el término de doble cadena de 3'- hidroxilo requerido por las polimerasas de ADN dependientes del ADN termoestables para comenzar la síntesis de una nueva hebra de ADN (complementaria a la hebra a la que se ha hibridado). Esta técnica se compone principalmente de tres etapas, desnaturalización, alineamiento y extensión, las cuales pertenecen a un ciclo, que se repite un número predeterminado de veces. Después de cada ciclo de replicación, cada molécula de ADN de doble hebra recién sintetizada es conocida como amplicón, que es definida como un fragmento de ADN obtenida mediante la amplificación de un gen mediante PCR (Márquez-Luna *et al.,* 2021).

La PCR en tiempo real (qPCR), es la técnica más utilizada para la detección y cuantificación de secuencias de modificación genética, (Vergaray *et al.,* 2023). Esta variante permite medir directamente la acumulación del amplicón durante la reacción, siendo más eficiente que la PCR tradicional. En condiciones estándar, la cuantificación debe ser realizada durante la fase exponencial de la amplificación. Un ensayo de qPCR consiste en tres etapas: fase exponencial, lineal y meseta, estas tres etapas se muestran en la Figura 7.

- Fase exponencial: En cada ciclo se duplica el producto.
- Fase lineal: El proceso de reacción se vuelve más lento, el consumo de los componentes llega casi a su fin y es el principio de la degradación.
- Meseta: Parada de la reacción, agotamiento de los componentes.

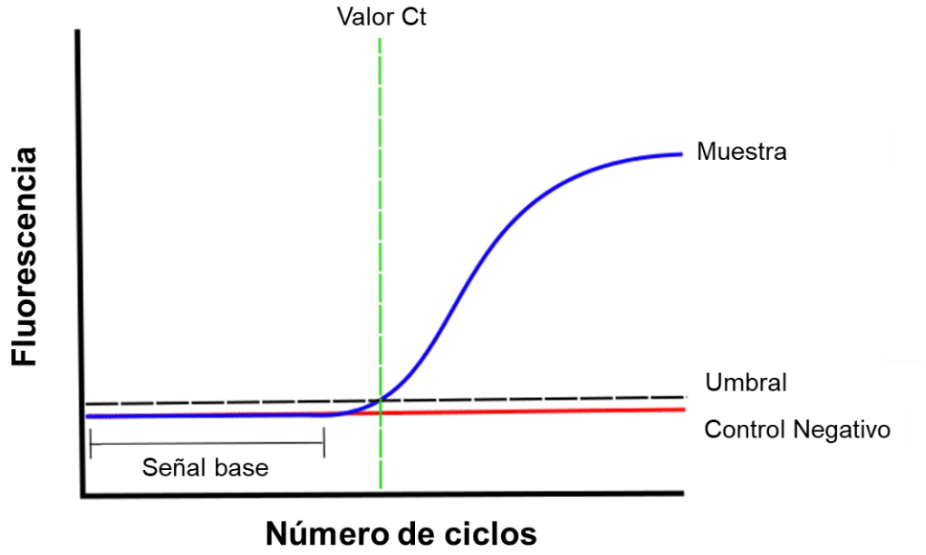

Figura 7. *Representación gráfica de la amplificación mediante PCR tiempo real. Disponible en* https://www.google.com/search?q=pcr+en+tiempo+real

La colecta de los datos durante la reacción de amplificación se realiza mediante el uso de fluorescencia, de esta manera se elimina la necesidad de manipular la muestra. Las sondas fluorescentes se unen al producto amplificado y se degradan por acción de la enzima Taq polimerasa para generar una señal detectable por un equipo llamado "termociclador de tiempo real", que se encarga de la amplificación y cuantificación simultánea de secuencias específicas de ADN durante el proceso de amplificación. Por lo tanto, cuando esta PCR concluye, la detección y el análisis han sido completados (Márquez-Luna *et al.,* 2021).

2.3.3 Detección de Organismos Genéticamente Modificados

2.3.3.1. Ensayos cualitativos de OGM

Se consideran métodos cualitativos a aquellos cuya respuesta indica la presencia o ausencia del analito de forma directa o indirecta en una muestra. El aumento del número y la diversidad de organismos genéticamente modificados en el mercado mundial supone un reto para los laboratorios de OGM, así como para los responsables políticos (Bogožalec *et al.,* 2023). La detección de OGMs se realiza a través de pruebas de cribado mediante qPCR, la mayoría de los laboratorios prefieren realizar este procedimiento antes de realizar otro ensayo, ya que son los elementos recombinantes más comunes encontrados en los OGMs, el promotor 35S (P-35S) del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador nopalina sintasa (t-NOS) de *Agrobacterium tumefaciens*. Ambas secuencias son reguladoras de la transcripción y forman parte de constructos de la mayoría de los eventos aprobados para su comercialización, por lo tanto, son indicadores de ADN recombinante en material vegetal y alimentos procesados (Eugster *et al.,* 2014; Oviedo- Bolaños *et al.,* 2020).

El laboratorio de referencia de la Unión Europea para alimentos y piensos genéticamente modificados (EURL-GMFF) se ha encargado de elaborar la matriz de OGM que contiene información sobre la secuencia de los OGM conocidos y métodos

validados de detección e identificación basados en la PCR, lo que constituye una herramienta útil para la validación y evaluación de métodos (Marchesi *et al.,* 2015; Fu *et al*., 2020).

2.3.3.2. Ensayos cuantitativos de OGM

Además de los estudios cualitativos que indican la presencia o ausencia de organismos genéticamente modificados, son necesarios los análisis cuantitativos que indican su proporción en la muestra, la cual permite determinar si está o no dentro del umbral establecido por la norma de cada país (Vergaray *et al.*, 2023). En la UE, los OGM están controlados por el Reglamento (CE) nº 1829/2003, que especifica un umbral del 0.9% para los OGM autorizados (Liu *et al.,* 2020). Para determinar estos valores se han desarrollado dos herramientas, el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ). Actualmente, en México a partir de las reformas establecidas en diciembre de 2020 y febrero de 2023 se prohibió el uso de maíz transgénico para consumo humano. Esto con el objetivo de promover la conservación de las semillas nativas de maíz, cuidando la riqueza genética y biocultural de México. Por lo tanto, se requieren establecer métodos de detección y cuantificación precisos para detectar maíz OGM desde las primeras etapas fenotípicas de la planta sin que se llegue a la producción del grano.

2.3.3.3. Límite de detección (LOD)

Se define al límite de detección como LOD por sus siglas en inglés a la mínima cantidad de OGM, expresada en fracción masa/masa o el número de copias de ADN, que pueden ser detectados en una muestra, cuando un número de copias del genoma conocido del taxon o matriz ha sido determinado o estimado (Hougs *et al.,* 2017).

2.3.3.4. Límite de cuantificación (LOQ)

El límite de cuantificación, o bien; Limit of Quantification (LOQ), es la cantidad mínima de OGM que puede ser cuantificada en una muestra, cuando un número de copias del genoma conocido del taxón ha sido determinado o estimado (Hougs *et al.,* 2017).

2.4. Uso de genes endógenos para la cuantificación de OGM en maíz

Cuando se realizan estudios sobre la cuantificación relativa de la expresión de un gen diana es importante elegir un gen adecuado para utilizarlo como referencia o control endógeno. Un gen de control endógeno es aquel cuyo nivel de expresión no debe diferir entre las muestras. En plantas el número de genes de referencia validados para este tipo de estudios es aún limitado, comúnmente, los genes de referencia utilizados son, genes de mantenimiento (Housekeeping Genes), incluyen los que codifican la actina, el ARNr gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de elongación (EF), α-tubulina y ubiquitina, que son necesarios para mantener los procesos celulares básicos, por lo tanto, se supone que no se

regulan de forma diferente en presencia de distintas condiciones experimentales (Wu *et al*., 2015).

La detección de OGM se puede realizar de manera cualitativa o cuantitativa. Durante la detección cualitativa, la PCR específica del gen de referencia endógeno se utiliza como control experimental para confirmar el éxito de la amplificación de cada muestra de ADN. En cambio, para la detección cuantitativa, el número de copias de ADN-específico de un OGM y un gen de referencia son medidos mediante una PCR en tiempo real, y después el contenido (%) de OGM es calculado como la relación de estos números de copias (Imai *et al*., 2012; Liu *et al.,* 2021; Vahdani *et al*., 2024).

De manera general, el contenido genéticamente modificado se expresa como relación masa/masa o número de copias del organismo analizado. Por lo tanto, los genes de referencia endógenos y sus ensayos de PCR en tiempo real se denominan "estándares de oro" en el análisis de OGM. Un gen de referencia endógeno deseable y su ensayo qPCR debe tener las siguientes características: especificidad de especie, número de copias único y bajo en el genoma y, por último, baja heterogeneidad entre diferentes líneas, y variabilidad intraespecífica de las secuencias de nucleótidos (Hernández *et al*., 2001; Huang *et al*., 2013; Wu *et al*., 2015).

Genes de referencia de maíz

2.4.1. Genes HMG

Los genes HMG son un grupo de genes ampliamente extendidos en diversos grupos de organismos tanto en animales como plantas; comparten una característica en común, una región conservada (cerca de 79 aminoácidos). Cumplen funciones en las etapas tempranas del desarrollo embrionario, el desarrollo del sistema nervioso y la formación de diferentes tejidos y órganos. Algunos estudios mencionan que el gen HMG-A codifica para la proteína de alta movilidad que actúa como un factor de transcripción que suprime la interacción para algunos organismos fitopatógenos que no han evolucionado como patógenos de la especie (Reeves *et al.,* 2001; Klosterman *et al*., 2003; Lei *et al.,* 2021; Ding *et al.*, 2023).

2.4.2. Genes ADH

La Alcohol Deshidrogenasa es una de las enzimas que participan en la glucólisis y fermentación. Las proteínas ADH se encuentran en distintos organismos incluyendo bacterias, levaduras, animales y plantas. El gen ADH1 mejora la resistencia a estrés biótico y abiótico en *Arabidopsis thailana*, en cereales el gen ADH es uno de los genes más comunes inducidos por el frío, mientras que en la soya (*Glycine max*), el chícharo (*Lathyrus sativus* L.) y *Arabidopsis* el estrés por salinidad induce la acumulación de ADH ARN mensajero. Su y colaboradores en el 2020 realizaron un estudio donde encontraron la presencia de proteínas ADH en 5 especies de eudicotiledóneas (Figura 8), 9 en monocotiledóneas, 2 en especies de musgos y 1 en especie de angiosperma basal. En la figura 8 se muestra un fragmento del cladograma donde se observan los genes ADH en maíz (*Zea mays*). Estos datos indican que gen ADH es un gen conservado durante el proceso evolutivo de las plantas (Ventura *et al.,* 2020; Su *et al.*, 2020).

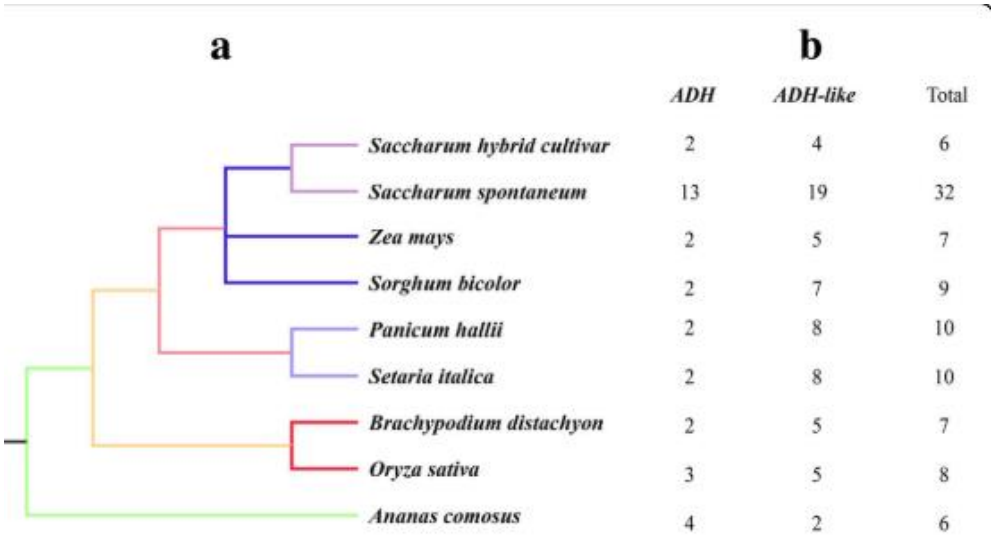

Figura 8. *Fragmento de cladograma que representa la identificación en todo el genoma de genes ADH. En la imagen se puede apreciar la presencia de estos genes en Zea mays. Imagen retomada de Su et al., 2020.*

2.4.3. Genes Zeina

Los genes que codifican para las proteínas de zeina se han clasificado en tres grupos: 1) genes que codifican proteínas de zeina o cuerpos proteícos, 2) genes que codifican enzimas que regulan el metabolismo del endospermo y 3) genes reguladores de la transcripción. Las proteínas de almacenamiento de las semillas vegetales se sintetizan y depositan en el endospermo o en el tejido del cotiledón para cumplir una importante función fisiológica al inicio de la germinación. En el maíz, las proteínas más abundantes dentro del endospermo son las zeinas, pertenecientes al grupo de las prolaminas, estas proteínas también se encuentran presentes en otras especies de cereales como sorgo, arroz y cebada, entre otras. En la figura 9 se muestra la anatomía común de un grano de maíz (Feix ,1993; Han *et al.,* 2023).

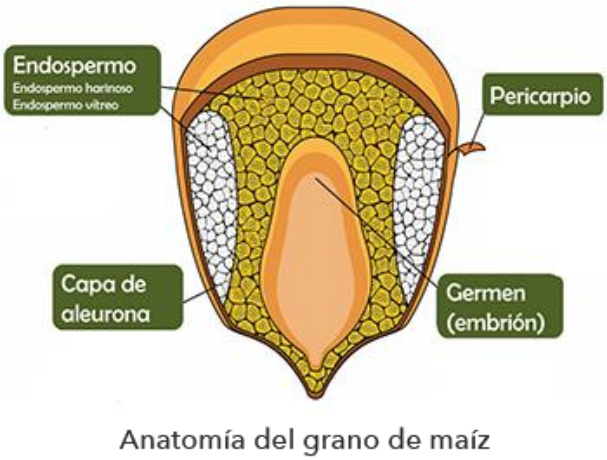

Figura 9*. Anatomía del grano de maíz. En la imagen se muestran los principales componentes, se observa el endospermo, estructura donde se presenta la mayor cantidad de proteínas de zeina. Disponible en: https://www.inecol.mx/index.php/divulgacion/ciencia*

2.5 Materiales de referencia y Materiales de Referencia Certificados

Existen algunos estudios que requieren resultados de medición muy precisos que eliminen la necesidad de duplicar o impugnar los datos de los ensayos realizados, ejemplo de ellos son: clínicos, ambientales, de alimentos, nucleares, nano nucleares, entre otros. Para lograr esta precisión se han desarrollado materiales de referencia. El uso de estos materiales se extiende a una gran cantidad de aplicaciones como muestras de control, la corrección de desviaciones, la verificación de la calibración, validación de métodos, la evaluación del sesgo de métodos y la incertidumbre de las mediciones, la demostración de las competencias de los analistas o del laboratorio. Existen algunas normas internacionales que proporcionan la orientación para su uso e incluso instrucciones para su preparación. Estos materiales se clasifican en dos grupos: Material de Referencia (MR) y Material de Referencia Certificados (MRCs) (Carson, 2023; JRC, 2024).

A continuación, se especifica cada uno de estos términos.

- **Material de Referencia (MR):** Se define como un MR a aquel material suficientemente homogéneo y estable con respecto a una o más propiedades especificadas, que se ha establecido que es apto para su uso previsto en un proceso de medición (Carson, 2023).

- **Material de Referencia Certificado (MRC):** Es un material que ha sido caracterizado por un procedimiento metrológicamente válido para una o más propiedades especificadas, acompañado de un certificado de material de referencia que proporciona el valor de la propiedad especificada, su incertidumbre asociada y una declaración de trazabilidad metrológica que refleja la dispersión de los valores medidos para la o las propiedades (CENAM, 2025; Carson, 2023).

2.5.1. Materiales de referencia Certificados (MRCs) para el análisis de OGMs

Todos los ensayos de detección y cuantificación mediante qPCR de Organismos Genéticamente Modificados se realizan a través de un material de referencia certificado, el cual es una sustancia que comprueba ser homogénea y con valores fijos de sus concentraciones, los MRC se fabrican en instalaciones acreditadas según las normas ISO 9001, ISO 17025 e ISO 17034 para garantizar la exactitud de los análisis. Lo fundamental de entregar mediciones fiables depende de la calidad del material de referencia (Agilent, 2024). Estos materiales son un punto de referencia para que los laboratorios analíticos de todo el mundo proporcionen resultados precisos y comparables (JRC, 2024).

Normalmente, la amplificación resultante de un transgén se normaliza con respecto a la amplificación de un gen de control endógeno, y el resultado analítico final es indicado en % como GM (Shokere *et al*., 2009). En ciertos casos, se presenta un grado de degradación entre el material de referencia y una muestra desconocida. Aunque, de manera teórica el valor analítico final asignado de una muestra concreta debería

ser independiente del grado de degradación del ADN, ya que la secuencia diana del transgén y la secuencia específica del taxón (gen de referencia) deberían degradarse en paralelo (Shokere *et al*., 2009), no obstante, no siempre ocurre de esta manera. Ahmed (2004) indica adicionalmente que la variación entre análisis replicados se incrementa a medida que aumenta el grado de degradación.

Los materiales de referencia de matrices agroalimentarias pueden encontrarse disponibles en dos presentaciones: en material de la matriz o plásmido recombinante. Los que se encuentran como plásmidos son moléculas lineales o circulares que contienen el gen diana, pueden prepararse fácilmente en grandes cantidades y no están limitados por la fuente de la materia prima, lo que representa una ventaja para los laboratorios de detección, pues muchas veces es complicado conseguir los MRC que se requieren en cada ensayo (Chen *et al.,* 2024). Nuevos estudios se encargan de desarrollar Materiales de Referencia de Ácidos Nucleicos (NRM), para ello requieren de métodos de cuantificación muy precisos como qPCR y espectrofotometría de masas por dilución isotópica. Pero, nuevamente se presenta la limitante de una curva de calibración y que el contenido de Organismos Genéticamente Modificados está sujeta a "efectos de matriz" o a la disponibilidad del evento transgénico que se requiere cuantificar.

2.5.1.1. Productores de Materiales de Referencia (PMR)

Un productor de material de referencia es un organismo, organización o compañía, pública o privada que es completamente responsable de planificar y gestionar proyectos; asignar y decidir valores de propiedades e incertidumbres pertinentes; autorizar valores de propiedades; y emitir certificados de MR u otras declaraciones para los materiales de referencia producidos (ISO 17034:2016). La JRC (Joint Research Centre) y la AOCS (American Oil Chemistry Society) son los mayores productores de materiales de referencia para la detección, identificación y cuantificación de Organismos Genéticamente Modificados (AOCS, 2024; JRC, 2024).

La JRC produce MRCs en apoyo de la política de la Unión Europea. Se encarga de desarrollar, producir y distribuir MRCs para la calibración o el control de la calidad de las mediciones realizadas normalmente mediante qPCR. Ofrece materiales de referencia para diferentes eventos transgénicos en maíz, soya, papa, remolacha azucarera y algodón. En su página oficial indican que se están llevando a cabo actividades de investigación para desarrollar más MRC de OMG, incluidos MRC para nuevas especies vegetales (JRC, 2024).

2.5.1.2. Productores de MRCs en México

El Centro Nacional de Metrología (CENAM) es el encargado de desarrollar y certificar materiales de referencia con diversas aplicaciones, dentro de ellas se encuentra la detección de OGMs que permita cumplir de manera correcta la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados en México. El CENAM cuenta con un catálogo de MRCs disponible en línea: https://www.cenam.mx/materiales/default.aspx. En el catálogo se ofrece harina de

maíz donde se indica que puede ser utilizada en el control de calidad y validación de métodos analíticos para la medición de proteína, grasa y cenizas. Sin embargo, en este catálogo no se ofrece ningún MRC de hoja de maíz.

2.4.2 MRCs de hoja de maíz para la detección de OGMs

La AOCS proporciona MRCs para que los laboratorios comprueben la detección, identificación y/o cuantificación de eventos genéticamente modificados en cultivos. En su base de datos se ofrecen dos materiales de hoja de maíz, AOCS 0306-H12 y AOCS 0306-C4; el primero indica que contiene ADN genómico extraído de hojas limpias de maíz T25 que contiene los genes pat (syn) y bla para conferir tolerancia al herbicida glufosinato y resistencia a los antibióticos. El segundo material, es un material de control negativo preparado a partir de hojas no modificadas genéticamente (AOCS, 2024).

2.4.3. Prohibición de maíz transgénico en México

Durante los años 2009 a 2023 se registró un aumento del 1% al 33% en presencia de transgenes provenientes de muestras de maíz de toda la república mexicana. Debido a este hallazgo, entre otras investigaciones se emitieron dos decretos que fueron publicados en el Diario Oficial de la Federación el 31 de diciembre de 2020 y el 13 de febrero de 2023, que prohibieron el uso de semilla transgénica para siembras agrícolas. En enero de 2025, quedo reafirmado el compromiso de México por continuar con la protección del maíz, donde se planea modificar dos artículos constitucionales. Estas legislaciones evitan que el maíz transgénico ponga en riesgo la biodiversidad que existe en México, esto debido a que México es centro de origen, diversidad y domesticación de este cultivo; por lo tanto, cuenta con el acervo genético más grande del mundo que ha sido el resultado del mejoramiento tradicional por más de 10 mil años (El país 2025; Medio Ambiente e INECC, 2023). Por lo tanto, se requieren de metodologías eficaces que permitan la detección de maíz transgénico en las primeras etapas fenotípicas de la planta.

3. Objetivo general

Establecer un material de referencia en hoja de maíz para seleccionar y estandarizar un método de extracción de ADN que permita la detección de Organismos Genéticamente Modificados que sea interno al Departamento de Análisis Molecular y Nuevas Tecnologías.

3.1 Objetivos particulares

- Optimizar un método de extracción de ADN para hoja y harina de maíz
- Desarrollar un material de referencia negativo de hoja de maíz
- Evaluar tres genes de referencia en ADN de hoja de maíz por el método de urea modificado y optimizado
- Seleccionar el gen de referencia con el menor ciclo de amplificación
- Desarrollar un material de referencia positivo al DAS-Ø15Ø7-1 de hoja de maíz
- Establecer el límite de detección bajo condiciones de repetibilidad, reproducibilidad intermedia y robustez del evento DAS-Ø15Ø7-1 en el material de referencia positivo
- Establecer el límite de cuantificación bajo condiciones de repetibilidad, reproducibilidad intermedia y robustez del evento DAS-Ø15Ø7-1 en el material de referencia positivo

4. Hipótesis

El material de referencia positivo de hoja de maíz desarrollado y la elección del método de extracción de ADN óptimo, permitirá establecer el límite de detección práctico y el Límite de Cuantificación práctico del evento DAS-Ø15Ø7-1.

5. Metodología

5.1 Selección del método de extracción de ADN para maíz

Se probaron tres métodos de extracción (CTAB modificado, Fenol+β-mercaptoetanol y urea modificado). A cada método se le realizaron modificaciones que se le denominaron "tratamientos", estas modificaciones se detallan en los cuadros 1 y 2.

Cuadro 1. *Descripción de tratamientos de tres métodos de extracción en hoja de maíz*

Método	Tratamiento	Descripción del tratamiento
I CTAB: glucosa + PVP	I	Buffer A esterilizado, 0.5M glucosa, buffer B 2% PVP sin columna de purificación
	II	Buffer A no esterilizado, 0.5M glucosa, buffer B 2% PVP con columna de purificación
	III	Buffer A no esterilizado, 0.5M glucosa, Buffer B 0.5% PVP, sin columna de purificación
	IV	Buffer A no esterilizado, 0.5M glucosa, Buffer B 1% PVP, sin columna de purificación
II Fenol + β-mercaptoetanol	I	2 gramos de muestra. 8 mL de buffer de extracción, 500 mM NaCl, sin columna de purificación
	II	200 mg de muestra. 4 mL de buffer de extracción, 500 mM NaCl
	III	2 gramos de muestra. 4 mL de buffer de extracción, 500 mM NaCl, con columna de purificación
	IV	200 mg de muestra. 4 mL de buffer de extracción, 500 mM NaCl con columna de purificación
III Urea modificado	I	Acetato de sodio 5M sin columna de purificación. 10 minutos incubación a 65°C
	II	Acetato de potasio 5M sin columna de purificación. 20 minutos incubación a 65°C
	III	Acetato de potasio 3M, con 20 minutos de incubación, sin columna de purificación, secado 5 minutos
	IV	Acetato de potasio 3M, con 20 minutos de incubación, con columna purificación, secado 5 minutos

Cuadro 2. *Descripción de tratamientos de tres métodos de extracción en harina de maíz*

Método	Tratamiento	Descripción del tratamiento
I CTAB: glucosa + PVP	I	Buffer A esterilizado, 0.5M glucosa, buffer B 2% PVP sin columna de purificación
	II	Buffer A no esterilizado, 0.5M glucosa, buffer B 2% PVP con columna de purificación
	III	Buffer A no esterilizado, 0.5M glucosa, Buffer B 0.5% PVP, sin columna de purificación
	IV	Buffer A no esterilizado, 0.5M glucosa, Buffer B 1% PVP, sin columna de purificación
II Fenol + β-mercaptoetanol	I	2 gramos de muestra. 8 mL de buffer de extracción, 500 mM NaCl, sin columna de purificación
	II	200 mg de muestra. 4 mL de buffer de extracción, 500 mM NaCl
	III	2 gramos de muestra. 4 mL de buffer de extracción, 500 mM NaCl, con columna de purificación
	IV	200 mg de muestra. 4 mL de buffer de extracción, 500 mM NaCl con columna de purificación
III Urea modificado	I	Acetato de sodio 5M sin columna de purificación. 10 minutos incubación a 65°C
	II	Acetato de potasio 5M sin columna de purificación. 20 minutos incubación a 65°C
	III	Acetato de potasio 3M, con 5 minutos a 65°Cde incubación, sin columna de purificación, secado 5 minutos
	IV	Acetato de potasio 3M, sin incubación a 65°C, con columna purificación, secado 5 minutos

5.1.1 Elaboración de disoluciones para los métodos de extracción de ADN

Se llevó a cabo la elaboración de los buffers de extracción de los tres métodos seleccionados. Cada una de las soluciones de lisis y precipitación fueron preparadas a la concentración indicada con agua grado biología molecular; se ajustó el pH en un rango de (8.0 a 8.3) y se esterilizaron en una autoclave de dos puertas Pailería, modelo ES-07, mediante el tipo de esterilización de líquidos; se mantuvieron en condiciones ambientales hasta su uso.

- **Método de extracción I: CTAB modificado + Glucosa + PVP**

La preparación del buffer A consistió en la adición de glucosa y polivinilpirrolidona (PVP) como agentes antioxidantes, además de β-mercaptoetanol que debilita los puentes disulfuro de las proteínas. El proceso de extracción se realizó según lo descrito por Ali *et al*., 2019 con modificaciones (en el anexo 10.1.1 se describe el proceso completo). El buffer de extracción A corresponde al buffer de lisis, mientras que el buffer B es un buffer de precipitación. El proceso de extracción finalizó disolviendo el pellet de ADN en un buffer de resuspensión. Para este método de extracción se prepararon los buffers como se describe a continuación.

Buffer de extracción A: glucosa 0.5 M, EDTA 30mM (pH 8.0), 200 mM NaCl, 200 mM Tris–HCl (pH 8.0), 0.5% (v/v) βME (agregado antes de su uso) y 1% (m/v) SDS

Buffer de extracción B: 2% (m/v) PVP, 2% (m/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl y 20 mM EDTA (pH 8.0) + disolución de cloroformo: Alcohol Isoamílico: (24:1), disolución que se prepara y agrega antes de su uso.

Buffer de re-suspensión TE: 1 mM EDTA (pH 8.0) and 10 mM TrisHCl (pH 8.0)

- **Método de extracción II: Fenol y β-mercaptoetanol**

El proceso de extracción se realizó según lo establecido por Mazzara *et al.,* 2006 con modificaciones. En el anexo 10.1.2 se muestra el procedimiento paso a paso.

Buffer de extracción: 100 mM Clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano (HCl) pH 8, 50 mM Ácido etilendiaminotetraacético pH 8, 500 mM Cloruro de sodio, 10 mM β-mercaptoetanol

Eliminar contaminación por ARN/ Digestión enzimática: RNAasa A 10 mg/mL

Buffer para amortiguar el pH:
1x TE buffer: 10 mM Tris pH 8.3, 1 mM EDTA pH 8.3,
0.1x TE Buffer: 10 mM Tris pH 8.3, 0.1 mM EDTA pH 8.3

- **Método de extracción III: Urea modificado**

El tercer método de extracción fue realizado según lo citado por Leach y colaboradores (2016) con modificaciones (En el anexo 10.1.3 se muestra el proceso completo).

Buffer A (lisis): 210 g de urea, 35 mL 5M NaCl, 25 mL 1M Tris-HCl, pH 8.0, 20 mL 0.5 M EDTA, pH 8.0, 5g de N-Lauroilsarcosina, sal sódica

Buffer B (precipitación): 1:10 isopropanol: acetato de potasio 3M.

5.1.2 Extracción de ADN con tres métodos de extracción en hoja y harina de maíz

Se extrajeron 4 réplicas de 200 mg de hoja y harina de maíz mediante los tres métodos de extracción. Se realizaron cuatro tratamientos distintos de cada método de extracción, por lo tanto, se obtuvieron 12 tratamientos diferentes (cuadro de arriba). De esta manera, se obtuvieron 48 extracciones totales de hoja y 48 extracciones en harina de maíz. Una vez concluida la extracción del ADN, el pellet se cuantificó mediante espectrofotometría en el equipo NanoDrop™ 2000/2000c. Se evaluó la concentración (ng/µL), los cocientes de absorbancia A_{260}/A_{280} para calcular la pureza de ADN es aproximadamente de 1.8 y 2.0; en cuanto a la A_{260}/A_{230} las muestras puras se presentan en 2.2. Se obtuvo el promedio de todas las muestras. Cada una se leyó y estandarizó dentro de los parámetros de concentración de 45-55 ng/µL mediante el espectrofotómetro.

5.1.3. Amplificación del gen de referencia del ADN de tres métodos de extracción

Se realizó por tetratriplicado la amplificación del gen de referencia *HMG-A* en el equipo QuantStudio 6 Pro (Applied Biosystem®) de todos los tratamientos realizados. Por lo tanto, se obtuvieron 16 resultados de ciclo de amplificación del gen de referencia por cada tratamiento. Es decir, se obtuvieron 192 datos de ciclo de amplificación del gen de referencia *HMG-A* para hoja y harina de maíz, respectivamente. En el cuadro 3 se presenta el programa de amplificación para el termociclador empleado y las secuencias de los cebadores forward y reverse y la sonda del gen de referencia *HMG-A* (cuadro 4).

Cuadro 3.. *Programa de amplificación empleado para el termociclador QS6®.*

Paso	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Detección de fluorescencia	No. De ciclos
	UNG	50	120	No	1
1	Desnaturalización	95	600	No	1
2	Desnaturalización Amplificación Alineamiento y Extensión	95 60	15 60	No Sí	45

Cuadro 4. *secuencias de cebadores y sonda para el gen de referencia HMG-A*

Nombre del sistema de referencia	Secuencia del gen de referencia/sonda	Amplicón (pb)
high-mobility group (HMG)	forward, 5′-TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA-3′ reverse, 5′-GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT-3′ probe, 5′-FAM-CAATCCACAAACGCACGCGTA-TAMARA-3′	79

5.1.4. Selección de dos tratamientos de cada método de extracción

La selección del método de extracción se realizó con base un análisis de varianza (ANOVA) entre cada tratamiento y comparadas mediante la prueba de Tukey (IC=95%, α=0,05), para los parámetros de concentración y pureza. Mientras que, para los ciclos de amplificación se compararon las amplificaciones mediante una prueba de Chi cuadrada (α=0,05). Se seleccionaron los mejores dos tratamientos de cada método de extracción en cuanto a rendimiento (concentración de ADN obtenida) y ciclo de amplificación. A cada tratamiento se le asignó una letra para su identificación.

5.1.4.1. Método I: CTAB modificado

El tratamiento A consistió en emplear el buffer de extracción A esterilizado y sin llevar a esterilizar, esta modificación fue realizada debido a los componentes presentes en el buffer de extracción A. La segunda modificación fue el cambio de concentración de glucosa del buffer de extracción A, cambiado de 0.5M a 0.1M. Finalmente, la última modificación fue el cambio de concentración de PVP; se prepararon dos buffers a diferente concentración de PVP: 0.5 y 1.0% (m/v), respectivamente.

5.1.4.2 Método II: Fenol y β-mercaptoetanol

La primera modificación en el procedimiento consistió en pesar 2 gramos de muestra (hoja y harina); por lo tanto, todos los cálculos de adición de buffer fueron ajustados a la cantidad de la muestra. La segunda modificación consistió en purificar el ADN obtenido utilizando el kit DNA Clean & Concentrator según las instrucciones del fabricante.

5.1.4.3. Método III: Urea modificado

La primera modificación realizada fue la extracción de ADN de forma manual, en el artículo original se realizó la extracción en placas de 96 pozos. La concentración del buffer de lisis se mantuvo igual, a un pH de 8.0. En cuanto al buffer de precipitación, se empleó acetato de sodio (CH_3CO_2Na) y acetato de potasio (CH_3CO_2K). En los

cuadros 11 y 12 se muestra la descripción de los dos tratamientos seleccionados en hoja y harina de maíz.

5.1.4.4. Selección de un método de extracción de ADN en hoja y harina de maíz

Para la selección del mejor método de extracción se tomaron en cuenta cinco criterios de evaluación: 1) Concentración de ADN, 2) Relación de pureza, 3) Ciclo de amplificación del gen de referencia, 4) Tiempo de proceso y 5) Generación de residuos. Se empleó una matriz cualitativa de decisión para comparar cada uno de los tratamientos. Para ello, se asignaron valores del 1-6 en función de cada uno de los parámetros evaluados considerando con el mayor valor al tratamiento que presentó la característica más cercana al valor estándar que se establece como criterio deseable, para el caso de número de ciclos se considera al número menor como el más adecuado. Para el tiempo, se consideró como el mejor el que requiera menor tiempo. Para los otros parámetros se aplicó el mismo criterio dando la calificación de mayor puntuación a la característica más deseable.

La concentración y la pureza de ADN se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000, el ciclo de amplificación del gen de referencia se llevó a cabo mediante qPCR, por otro lado; el tiempo de proceso se midió con un cronómetro y los residuos se clasificaron y procesaron.

5.1.5. Estandarización del método de urea modificado

Se seleccionó el método de extracción de urea modificado a través de la matriz cualitativa para la extracción de ADN de bajo costo y lo suficientemente sensible. Por lo tanto, se procedió a estandarizar este método, este proceso se dividió en 3 etapas y se fue diseñando cada una de ellas. Se probaron distintos tiempos, cantidad de buffer de lisis, concentración de reactivos y cantidad de muestra en cada uno de ellos. En el cuadro 5 se muestra a detalle cada una de las etapas. Se extrajeron 4 réplicas con cada una de las modificaciones de cada etapa de los diferentes tratamientos mencionados sin perturbar otro parámetro a la vez. Al ADN extraído con estas modificaciones únicamente se le determinó la concentración y pureza.

Cuadro 5. Estandarización del método de extracción de urea modificado en hoja de maíz

Etapa I: Pesado de muestra y lisis	Etapa II: Precipitación	Etapa III: Secado y resuspención
Cantidad de muestra (100 y 200 mg) Volumen de buffer de lisis (buffer A) (500 y 800 µL para hoja; 800 y 1000 µL para harina). Tiempos de incubación de las muestras durante la lisis celular (0, 10, 20 y 30 minutos) a 65°C	Tiempos de incubación a -20°C durante el proceso de precipitación de ADN (10, 20 y 30 minutos). Velocidades y tiempos de centrifugación (10 minutos a 12,000 rpm y 10 minutos a 14,000 rpm) Concentración: 3 y 5 M de acetato de potasio	Tiempo de secado de pellet en concentrador de ADN (3 y 5 minutos) Volumen de H_2O grado biología molecular para disolver el pellet (100 y 200 µL)

La extracción se realizó por tetratriplicado con cada modificación. Los resultados obtenidos de concentración y relación de pureza se compararon mediante una prueba de T-student (datos no mostrados), y se eligió el mejor.

5.2. Desarrollo del material de referencia interno

5.2.1. Extracción y cuantificación de ADN con el método de urea modificado

La extracción del material de referencia negativo se realizó con 10 muestras de hoja de maíz negativo a cualquier evento transgénico. Se pesaron 25 réplicas de 200 mg de cada muestra en una balanza analítica Mettler Toledo modelo MS304S. Posteriormente, se extrajeron las 250 réplicas con el método de urea modificado y estandarizado. Cada muestra se rotuló con números arábigos comenzando con 1 y concluyendo con 10. Se almacenaron individualmente en una bolsa de plástico a -20°C hasta su uso. Una vez extraído el ADN se leyó la concentración y la relación A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} en espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific). Se estableció la media aritmética de cada muestra.

5.2.2. Evaluación de la especificidad en material de referencia negativo

Previo a la realización de los ensayos de qPCR, se verificó que los iniciadores y sondas empleados fueran específicos para los genes de referencia HMG-A, ADH-1 y zeina. El diseño de oligonucleótidos se realizó a partir de una secuencia de nucleótidos única, ubicada entre la región de recombinación entre el inserto y el genoma de la planta, y que sirve como punto de partida para la replicación del ADN para el gen de referencia. En este ensayo se empleó ADN perteneciente de soya, algodón, canola, arroz, alfalfa y maíz para verificar que la amplificación de los genes de referencia fuera específica para maíz. Se agregó 18 µL de mezcla de reacción (se describe en el cuadro 7) y 2 µL de ADN en cada pozo de reacción. Se empleó una placa de 384 pozos y el ensayo se realizó en equipo QuantStudio 6 Pro®. Se consideraron reacciones de PCR para control de reactivos (NTC=*Not Template Control*) con agua grado biología molecular.

5.2.3. Eficiencia de amplificación y evaluación de la presencia de inhibidores en material de referencia negativo

La prueba de presencia de inhibidores consistió en realizar curvas estándar en dilución 1:2 para el gen de referencia *HMG-A* en cada una de las extracciones. Las curvas estándar se generaron con 4 puntos por triplicado para alcanzar concentraciones finales de ADN equivalentes a 100, 50, 25 y 12.5 ng/µL. La qPCR se realizó mediante la selección del elemento utilizando un sistema de detección simple con una longitud de emisión de fluorescencia de 510 nanómetros. Los ensayos se llevaron a cabo en el equipo QuantStudio 6 Pro (Applied Biosystem®). Se consideraron dos reacciones como control negativo con ADN de diferente especie y dos reacciones de PCR para control de reactivos (NTC=*Not Template Control*) con agua grado biología molecular.

5.2.4. Eficiencia de amplificación en material de referencia negativo

El ensayo de eficiencia de amplificación se realizó a través de curvas estándar. Los 4 puntos de la curva correspondieron a las concentraciones finales de 100, 50, 25 y 12.5 ng/µL. Se presentó el 100% de amplificación del gen de referencia. Por lo tanto, se obtuvieron 600 datos de ciclo de amplificación del gen de referencia *HMG-A* para la evaluación de la presencia de inhibidores en las extracciones de ADN en hoja de maíz. Se verificó la amplificación del gen de referencia en todos los puntos de las curvas estándar y se observó la repetibilidad entre los tres puntos (se consideró como repetibilidad que no existiera una diferencia entre ciclos mayor a 0.5).

Posteriormente, se observó en el software del equipo, la gráfica de la regresión lineal obtenida de la curva estándar y se confirmó que las curvas cumplieran con los parámetros de calidad establecidos de pendiente, coeficiente de relación y eficiencia de amplificación. En el cuadro 24 se presenta el promedio de 50 datos de pendiente, eficiencia de amplificación y coeficiente de correlación. La eficiencia de amplificación y la ausencia de la prueba de inhibidores cumplió con los parámetros establecidos por la Red Europea de Laboratorios de OGM (*ENGL*), por sus siglas en inglés. Donde se establecen los valores de aceptación para pendiente (-3.1 a -3.6), coeficiente de relación (≥0.98) y eficiencia de amplificación (90 a 110%) (Marchesi *et al.,* 2015). Por otra parte, la inhibición de la PCR se analizó contemplando la guía "Directrices para la validación de métodos de extracción de ADN aplicados en el análisis PCR posterior de alimentos y piensos para detectar la presencia de material modificado genéticamente" de Hans-Ulrich y Grohmann (2014), donde se verificó la amplificación del gen de referencia en cada nivel de dilución (ISO 21570:2005). En el cuadro 24 se muestra la media de los cuatro puntos de las curvas (100, 50, 25 y 12.5%). Las figuras 15 y 16 representan las curvas estándar recuperadas del software del termociclador QuantStudio 6 Pro®.

De acuerdo con la fórmula de la PCR:

$F.D=2^n$

En la cual*:*

F.D: Factor de dilución

n: número de ciclo de amplificación

Por lo tanto, despejando n se obtiene:

$$n = \frac{\ln F\ D}{\ln 2}$$

Una vez despejada la fórmula, se sustituye $F.D$ por 2:

$$n = \frac{\ln F\ D}{\ln 2} = \ln \frac{2}{2} = 1$$

5.2.5. Evaluación de la presencia de inhibidores en material de referencia negativo

La presencia de inhibidores se evaluó a partir del intercepto de las curvas estándar, el Cq medido, el Cq teórico y el ΔCp. Los datos de intercepto y Cq medido se obtuvieron del software del termociclador utilizado. Por otro lado, el Cq teórico se calculó mediante la siguiente fórmula:

Cq teórico= (pendiente * log [ADN] + intercepto)

Los datos del Cq teórico se calcularon en el programa Microsoft Excel (versión 2405, compilación 18730.20142). En el cuadro 23 se muestran los resultados obtenidos. Por otra parte, para calcular ΔCq, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\Delta C\text{q} = C\text{q}\ extrapolado - C\text{q}\ medido$$

Donde, Cq extrapolado resulta de la ecuación de regresión lineal:

$$C\text{q}\ extrapolado = mx + b$$

En la cual:

$$x = logC\text{q}\ puntocurva.$$

5.2.5. Amplificación de genes de referencia en material de referencia negativo

Se evaluó la amplificación tres genes de referencia de maíz (*HMG-A*, *ADH1* y *zeina*) del material de referencia negativo. El ensayo se realizó en el equipo Quant Studio 6 Pro (Applied Biosystem®) siguiendo el programa de ciclado que se empleó para la amplificación del gen de referencia del cuadro 3. Se eligieron de manera aleatoria 10 réplicas de cada muestra de ADN y cada una de ellas se amplificó por tetratriplicado, obteniendo así 400 datos de cada uno de los genes ensayados. En los siguientes cuadros (cuadro 6) se muestran las secuencias de los cebadores y las

sondas de cada gen de referencia. Y el volumen y la concentración de los componentes empleados en el ensayo de qPCR (cuadro 7). En la figura 10 se muestra un diagrama que representa una fase del proyecto, desde el acondicionamiento de la muestra hasta la amplificación del gen de referencia.

***Cuadro 6**. Secuencias de cebadores y sondas para cada uno de los genes de referencia*

Nombre del sistema de referencia	Secuencia del gen de referencia/sonda	Amplicón (pb)
high-mobility group (HMG)	forward, 5′-TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA-3′ reverse, 5′-GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT-3′ probe, 5′-FAM-CAATCCACAAACGCACGCGTA-TAMARA-3′	79
alcohol dehydrogenase (ADH)	forward, 5′-CGTCGTTTCCCATCTCTTCCTCC-3′ reverse, 5′-CCACTCCGAGACCCTCAGTC-3′ probe, 5′-FAM-AATCAGGGCTCATTTTCTCGCTCCTCA-TAMARA-3′	136
Zeina	forward, 5′-GCCATTGGGTACCATGAACC-3′ reverse, 5′-AGGCCAACAGTTGCTGCAG-3′ probe, 5′-FAM-AGCTTGATGGCGTGTCCGTCCCT-TAMARA-3′	104

***Cuadro 7.** Volumen y concentración de los componentes de la mezcla de reacción utilizada en los ensayos de PCR.*

Secuencias de interés	Componente	Volumen de reacción (µL)	Concentración inicial (nM)
HMG-A *ADH-1* *Zeina*	Máster Mix*	10	1X
	Iniciador F	0.6	300
	Iniciador R	0.6	300
	Sonda	0.7	180
	ADN	0.2	45-55 ng/µL

**Cabe mencionar que solamente se sustituye la enzima de acuerdo con la marca del termociclador empleado. Termociclador Light Cycler 480® utiliza la enzima Light Cycler 480 Probes Master 2X y termociclador QuantStudio 6 Pro utiliza la enzima Taqman Universal PCR Master Mix 2X.*

5.2.5.1. Amplificación de gen de referencia empleando columna de purificación

Una vez seleccionado el gen de referencia *HMG-A* como el gen con el que se obtuvo el menor ciclo de amplificación en los ensayos de qPCR, Se eligieron cinco réplicas al azar de cada muestra y se les aplicó una columna de purificación DNA Clean and Concentrator™, Zymo Research siguiendo el protocolo del productor.

5.3. Generación y extracción de ADN del material de referencia positivo

Para la generación del material de referencia positivo se realizaron 6 mezclas de diferentes porcentajes tomando como testigo el porcentaje de 10% (1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.025 y 0.010%) en cantidad suficiente (5g de cada una) (cuadro 8). La mezcla 10% se obtuvo directamente de una muestra analizada anteriormente por un analista del Departamento de Análisis Moleculares y Nuevas Tecnologías caracterizada como positiva al evento DAS-Ø15Ø7-1, con un resultado ≥10%.
Las mezclas generadas se realizaron a partir del material de referencia negativo generado en este estudio y se homogeneizaron con el material de referencia positivo generado en este estudio de acuerdo con los porcentajes presentado en el siguiente cuadro. El proceso se realizó dentro de un recipiente de plástico en un vórtex durante cinco minutos. Se preservaron a -20°C hasta su uso. Se pesaron por tetratriplicado 200 mg de cada mezcla y se realizó la extracción de ADN con el método de urea modificado.

Cuadro 8. *Masa de hoja de los materiales utilizados en la generación de las mezclas analíticas*

Mezcla (%)	**Masa de hoja del material de referencia negativo GM (mg)**	**Masa de hoja del material de referencia positivo al evento DAS-Ø15Ø7-1 (mg)**
10	0.0	0.0
1	4,500	500
0.1	4,950	50
0.05	4,975	25
0.025	4,987.5	12.5
0.010	4,995	5.0

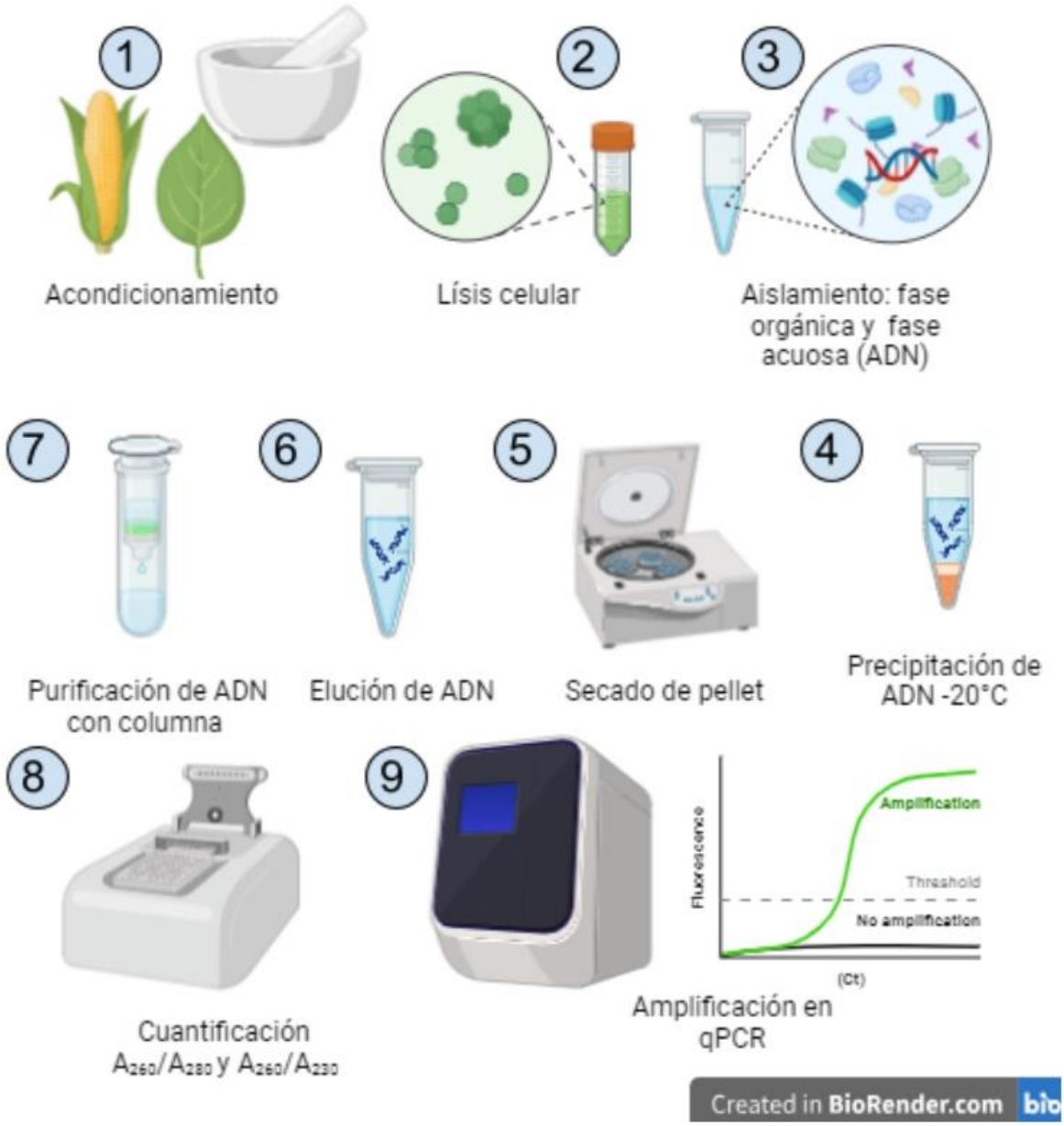

***Figura 10**. Diagrama de flujo del diseño experimental.*

En el paso 1 se muestra el acondicionamiento de la muestra, ya sea en hoja o grano de maíz. Los siguientes cinco pasos representan la extracción de ADN, en la lisis celular se aprecia la ruptura de la pared celular y el sobrenadante de color verde que se obtiene al procesar muestras de hoja, posteriormente se representa la liberación de ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos, etc. En el paso 7 se observa la purificación del ADN mediante una columna de purificación para obtener ADN de mayor calidad. Finalmente, se realiza la cuantificación en espectrofotómetro y la amplificación del gen de referencia mediante qPCR.

5.3.1. Purificación de ADN de material de referencia negativo

Se realizó la amplificación de los tres genes de referencia sin haber purificado el ADN obtenido, una vez seleccionado el gen de referencia con el cual se obtuvo el ciclo de amplificación más temprano, se seleccionaron al azar cinco réplicas de cada muestra (n=50), se purificaron mediante la columna de purificación DNA Clean and Concentrator™, Zymo Research siguiendo las instrucciones del proveedor. Se leyeron en espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c. Cada una de ellas se estandarizó en un rango de 45-55 ng/µL para su posterior análisis cualitativo. La purificación de las muestras se realizó con el objetivo de obtener un ciclo de amplificación más temprano del gen de referencia HMG-A, esto debido a que al final el material de referencia interno desarrollado se comparó contra el MRC 1529 el cual contiene el evento transgénico DAS-Ø15Ø7-1 y de esta manera los ciclos de amplificación pudiesen empatar.

5.4. Límite de Detección (LOD) del evento DAS-Ø15Ø7-1 del material de referencia

Se realizó el ensayo bajo condiciones de repetibilidad, precisión intermedia y robustez. Cada análisis de PCR incluyó testigos negativos: ADN de soya para la respuesta a la secuenciación endógena para la secuenciación del gen de referencia de maíz *HMG-A,* para el evento transgénico se empleó una muestra de maíz no modificado y un blanco de reactivos (sin ADN); todos por duplicado. La identificación del gen endógeno *HMG-A* y del evento específico DAS-Ø15Ø7-1 en cada muestra se realizó por tetratriplicado a cada mezcla generada utilizando como referencia el documento DOGM-PR-DIS "DETERMINACIÓN DE ESPECIES E IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS GM" (DAMNT, 2023), obteniendo así 16 réplicas de cada mezcla.

El ensayo se realizó bajo condiciones de repetibilidad, reproducibilidad y robustez. El programa de amplificación se llevó a cabo de acuerdo con el cuadro 3 para el termociclador QuantStudio 6 Pro® y con el objetivo de realizar los ensayos de robustez se realizó en el equipo LightCycler480 II® (cuadro 9). El LOD se estableció a partir de 384 valores bajo condiciones de repetibilidad, 384 bajo condiciones de reproducibilidad intermedia y 384 para robustez.

Cuadro 9. *Programa de amplificación empleado para el termociclador LC-480®.*

Paso	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Detección de fluorescencia	No. De ciclos
1	Desnaturalización	95	600	No	1
2	Desnaturalización Amplificación Alineamiento y Extensión	95 60	10 30	No Sí	45
3	Enfriamiento	40	30	No	1

5.5. Límite de cuantificación (LOQ) del evento DAS-Ø15Ø7-1 del material de referencia

La cuantificación del evento DAS-Ø15Ø7-1 fue realizada bajo condiciones de repetibilidad, precisión intermedia y robustez para los porcentajes de 10%, 1.0% y 0.1%. Se evaluó con el promedio y la desviación estándar del porcentaje de recobro o concentraciones medidas de un mínimo de 6 repeticiones y un máximo de 15, en el nivel candidato de LC (DSG, 2024).

6. Resultados y análisis de resultados

6.1. Selección del método de extracción de ADN para maíz

Los tratamientos realizados a cada método de extracción tuvieron el objetivo de comparar los resultados de concentración y pureza del ADN obtenido. En los cuadros 10 y 11 se presenta el promedio de 64 réplicas de hoja y harina de maíz respectivamente de los 12 tratamientos probados. El promedio de cada tratamiento corresponde a 4 datos para concentración, A_{260}/A_{280}, A_{260}/A_{230}. Mientras que el promedio del ciclo de amplificación corresponde a 16 datos por cada tratamiento.

Cuadro 10. *Resultados de concentración, pureza (A_{260}/A_{230} y A_{260}/A_{280}) ciclo de amplificación (Cq) de los tratamientos empleados en* ***hoja de maíz***

	Tratamiento	Concentración	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}	Cq
Método I: CTAB modificado	I	124.6	1.765	1.16	24.65
	II	42.7	1.44	0.63	27.42
	III	51.25	1.82	1.85	23.97
	IV	137.9	1.79	1.1	24.53
Método II: Fenol y β-mercaptoetanol	I	**7.5**	1.8	1.5	*
	II	205.6	1.93	1.14	24.42
	III	**459.5**	1.86	2.1	23.67
	IV	130.2	1.83	2.02	**22.92**
Método III: Urea modificado	I	**233.82**	1.85	1.19	26.16
	II	130.5	1.85	1.27	24.97
	III	217.77	1.84	1.21	24.74
	IV	160	1.84	2.02	**23.09**

**no se realizó la amplificación del gen debido a que la concentración obtenida fue muy baja.*

Cq; Ciclo de amplificación

El análisis estadístico demostró que no se presentó diferencia significativa entre las réplicas de cada tratamiento, sin embargo, sí existió una diferencia estadística en el rendimiento de ADN ($p < 0,05$) entre cada tratamiento comparado entre cada método, es decir, existió diferencia significativa del rendimiento de ADN entre los tratamientos (I, II, III y IV) del método I ($p < 0,05$), (F calculada, 651.73935), método II ($p < 0,05$), (F calculada, 7066.4678), método III ($p < 0,05$), (F calculada, 339.2273).

Se obtuvieron los rendimientos más altos de concentración en el método II (Fenol y β-mercaptoetanol) tratamiento III (2 gramos de muestra. 4 mL de buffer de

extracción, 500 mM NaCl, con columna de purificación), y en el método III (Urea modificado) tratamiento I (Acetato de sodio 5M sin columna de purificación. 10 minutos incubación a 65°C) del. Por otro lado, se encontró la concentración más baja en el método II (Fenol y β-mercaptoetanol) tratamiento I, esto debido a que durante la extracción tuvimos la pérdida del pellet de ADN.

Cuadro 11. *Resultados de concentración, pureza y ciclo de amplificación de los tratamientos empleados en harina de maíz.*

	Tratamiento	Concentración	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}	Cq
Método I: CTAB modificado	I	206.5	1.78	1.22	27.27
	II	47.27	1.9	1.6	23.09
	III	76.65	1.77	0.98	25.28
	IV	85.5	1.76	0.95	25.73
Método II: Fenol y β-mercaptoetanol	I	**496.5**	1.86	2.1	24.02
	II	248.5	1.94	2.28	25.1
	III	**489.63**	1.83	2.02	**23.01**
	IV	250.9	1.95	2.28	24.11
Método III: Urea modificado	I	254.2	2.12	1.65	31.23
	II	318.02	1.8	0.61	34.96
	III	339.87	1.73	0.57	34.52
	IV	56.05	1.95	1.82	**22.65**

6.1.2. Selección de dos tratamientos de cada método de extracción

Se seleccionaron los dos mejores tratamientos de cada uno de los métodos en cuanto a rendimiento (concentración de ADN obtenida). Los dos tratamientos seleccionados se describen a continuación. En el siguiente cuadro se muestra un resumen de los dos tratamientos seleccionados en hoja y harina de maíz (Cuadros 12 y 13).

Cuadro 12. *Descripción de tratamientos empleados para la extracción de ADN a partir de hoja de maíz*

Método	Tratamiento	Descripción
I CTAB modificado	A	Buffer A no esterilizado, 0.5M glucosa, Buffer B 1.0% PVP con columna de purificación
	B	Buffer A no esterilizado, 0.5M glucosa, Buffer B 0.5% PVP, sin columna de purificación
II Fenol y β-mercaptoetanol	C	2 gramos de muestra. 8 mL de buffer de extracción, 500 mM NaCl, sin columna de purificación
	D	2 gramos de muestra. 4 mL de buffer de extracción, 500 mM NaCl, con columna de purificación
III Urea modificado	E	Acetato de sodio 5M sin columna de purificación. 10 minutos incubación a 65°C, sin columna de purificación
	F	Acetato de potasio 3M, con 20 minutos de incubación, con columna purificación, secado 5 minutos

Cuadro 13. *Descripción de tratamientos empleados para la extracción de ADN a partir de harina de maíz*

Método	Tratamiento	Descripción
I CTAB modificado	A	Buffer A no esterilizado, 0.5M glucosa, con columna de purificación
	B	Buffer A no esterilizado, 0.5M glucosa, Buffer B 0.5% PVP, sin columna de purificación
II Fenol y β-mercaptoetanol	C	2 g de muestra, 10 mM B-mercaptoetanol, pH 8.3, sin columna de purificación
	D	2 g de muestra, 10 mM B-mercaptoetanol, pH 8.3, con columna de purificación
III Urea modificado	E	Acetato de sodio, sin incubación, sin columna
	F	Acetato de potasio sin incubación, con columna

6.1.3. Selección de un método de extracción de ADN en hoja y harina de maíz

En el Departamento de Análisis Moleculares y Nuevas Tecnologías se cuenta con tres criterios para la aceptación de un nuevo método de extracción de ADN: concentración ≥40 ng/µL, relación de pureza y la ausencia de sustancias inhibidoras durante la qPCR. En este proyecto se tomaron en cuenta cinco parámetros, se describen a continuación cada uno de ellos.

6.1.3.1. Concentración

El promedio de la concentración de las cuatro réplicas realizadas de cada tratamiento se muestra en el cuadro 14. Se presentan seis tratamientos en hoja y harina de maíz (Tratamientos A-F). El valor más alto de concentración para hoja de maíz se obtuvo a partir del tratamiento C (459.5 ng/µL), hecho que coincide para la concentración en harina, donde el valor más alto se presentó nuevamente en el tratamiento C con un valor de 496.5 ng/µL (Figuras 11 y 12). El segundo valor más alto fue obtenido en el tratamiento E en hoja que presentó un valor de 217.77 ng/µL; mientras que en harina se obtuvo 254.2 ng/µL.

Cuadro 14*. Concentración de ADN en cada tratamiento de hoja y harina de maíz*

Método	Tratamiento	Concentración ng/µL hoja	Concentración ng/µL harina
I CTAB modificado	A	**51.25**	**47.27**
	B	137.9	76.65
II Fenol y β-mercaptoetanol	C	**459.5**	**496.5**
	D	130.2	489.63
III Urea modificado	E	217.77	254.2
	F	160	56.05

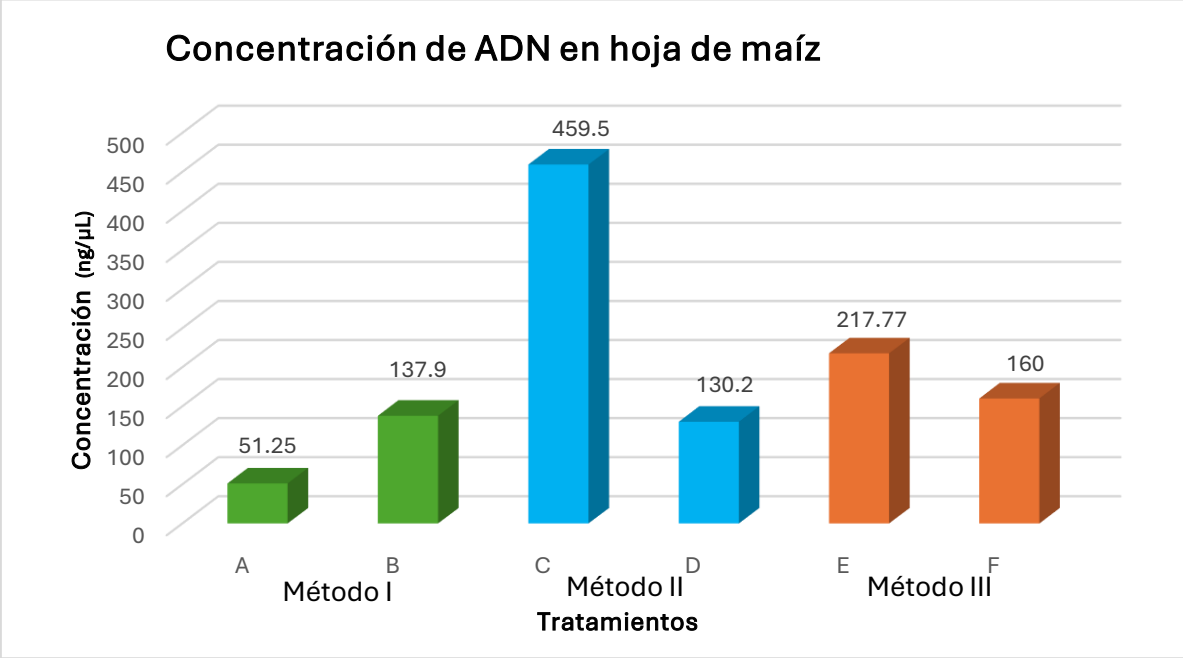

Figura 11. *Concentración de ADN por cada tratamiento en hoja de maíz*

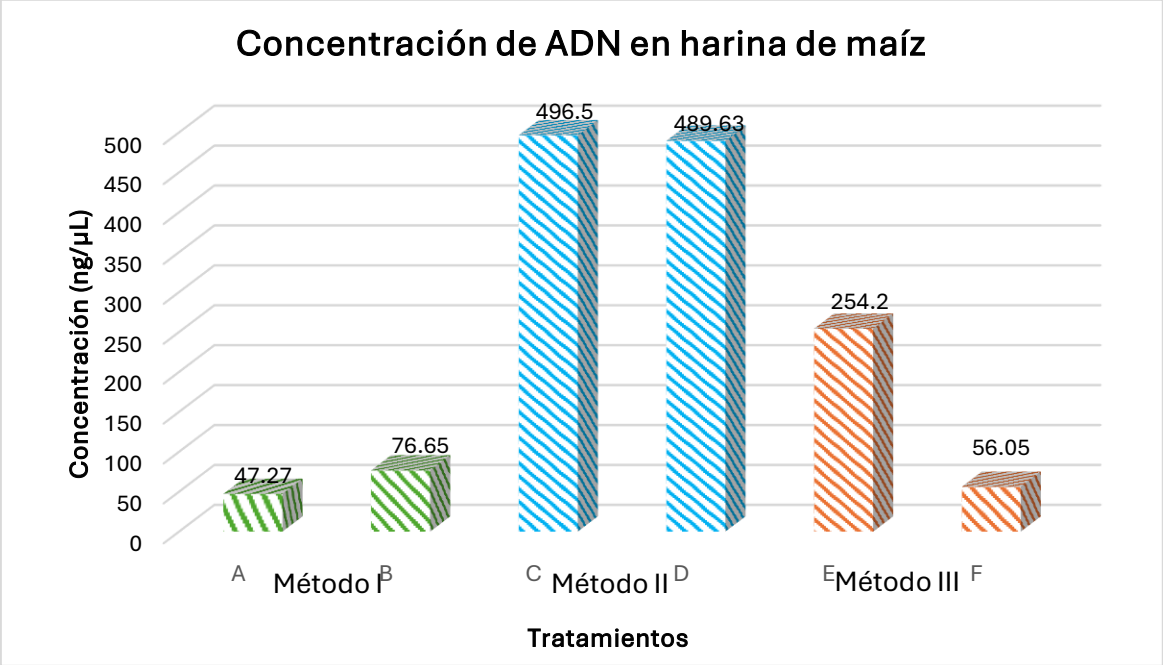

Figura 12*. Concentración de ADN por cada tratamiento en harina de maíz*

Los resultados más bajos de concentración se obtuvieron con el tratamiento A, que emplea como agente de lisis CTAB y SDS. En este método se obtuvo una concentración de 51.25 ng/µL y 47.27 ng/µL para hoja y harina, respectivamente (Cuadro 14) estas concentraciones son las resultantes después de haber purificado el ADN en la columna de purificación ADN Clean and Concentrator™, Zymo Research. Resultados similares fueron reportados por Wu y colaboradores (2015) en donde trabajaron con soya y compararon los métodos de CTAB y SDS contra un método

modificado de urea, extrajeron ADN en hoja y harina, y se logró obtener mayor rendimiento y mejor calidad de ADN con el método modificado de Urea que con los métodos mencionados. Por otra parte, Arias (2019) realizo una extracción de proteínas a partir harinas de pseudo cereales y maíz con un método lo suficientemente potente que permitiera descartar bandas proteicas, para ello, empleó la urea como agente desnaturalizante. De esta manera, se confirmó que la urea es un agente desnaturalizante potente que permite la extracción de ADN en diversas matrices vegetales.

Barrera-Guzmán, Legaria-Solano y Ortega-Paczka (2020), emplearon hojas de plántulas de maíz para la extracción de maíz, partiendo de una concentración para PCR de 10 ng/µL para la amplificación de marcadores microsatélites (SSR). Por otro lado, Heuermann y colaboradores (2019), emplearon como ADN molde para PCR tiempo real una concentración de 50 ng/µL para la amplificación de genes de cloroplasto. Esta concentración es similar a la empleada en ensayos cualitativos realizados en el DAMNT, los cuales se desarrollan a partir de 45-55 ng/ µL para la amplificación de genes de referencia. Los valores que se buscaban para la elección del método de extracción óptimo consistieron en los valores más altos de concentración y el valor más bajo (ciclo temprano) para la amplificación del gen de referencia mediante qPCR.

6.1.3.2. Relación de pureza

Se requería que el ADN extraído fuese lo suficientemente puro para permitir la amplificación mediante PCR del elemento de interés en los ciclos esperados. Esta medida se llevó a cabo a partir de la relación de la absorbancia A_{260}/A_{280} que es considerada como una métrica importante en la pureza del ADN (Acuña *et al*., 2023). La relación A_{260}/A_{280} se debe mantener en el rango de 1.8-2.0 indicando que el ADN tiene una pureza óptima y está libre de compuestos que absorben a esa longitud de onda. Una pureza estable debe tener al menos una relación A_{260}/A_{280} mayor a 1.6, un valor menor indicaría una posible contaminación con fenoles y proteínas, lo que podría afectar la calidad del ADN. Mientras que si el valor de la relación A_{260}/A_{280} es mayor a 2.1, es un indicativo de presencia de ARN lo que también puede afectar la calidad del ADN. Por otro lado, la relación A_{260}/A_{230} puede indicar otro tipo de contaminantes del ADN, como sales caotrópicas, fenoles y carbohidratos. Si el valor de esta relación es <1.5 indicaría una impureza significativa en la muestra que podría afectar su funcionalidad (Acuña *et al.,* 2023).

Cuadro 15. Relación de pureza de mejores dos tratamientos en hoja y harina de maíz

Método de extracción	Tratamiento	**Hoja de maíz**		**Harina de maíz**	
		A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
I CTAB modificado	A	1.82	1.85	1.9	1.6
	B	1.79	1.1	1.77	0.98
II Fenol y β-mercaptoetanol	C	1.86	**2.1**	1.86	2.1
	D	1.83	**2.02**	1.83	2.02
III Urea modificado	E	1.84	1.21	2.12	1.65
	F	1.84	2.02	1.95	1.82

En el cuadro 15 se muestran los resultados de pureza de los mejores dos tratamientos de cada método. Para las extracciones de harina, la relación de la absorbancia A_{260}/A_{280} presentó el mismo valor en los tratamientos de extracción E y F (1.84); mientras que en la relación A_{260}/A_{230} se presentaron valores de 1.21 y 2.02 respectivamente. Ambas relaciones indican que el ADN más puro se obtuvo con el método de extracción II, es decir con los tratamientos C y D, mostrando una pureza óptima e indicando estar libre de compuestos inhibidores que absorben a la misma longitud de onda por lo que se puede inferir que el ADN obtenido se encuentra libre de compuestos inhibidores como hidratos de carbono, péptidos, fenoles y compuestos aromáticos (Chakraborty, Saha y Neelavar, 2020; Hougs *et al.,* 2017; Jabeen *et al*.,2022). El mismo comportamiento se presentó en las extracciones de harina, se obtuvieron los mejores resultados en ambas relaciones A_{260}/A_{230} 1.86 y 1.83 en los tratamientos C y D respectivamente; mientras que en la relación A_{260}/A_{280} se obtuvieron los siguientes resultados 2.1 y 2.02.

6.1.3.3. Ciclo de amplificación

El promedio de los 96 ciclos de amplificación del gen de referencia *HMG-A* se muestra en el cuadro 16 y las figuras 13 y 14.

Cuadro 16*. Ciclo de amplificación (Cq) de gen de referencia HMG-A en hoja y harina de maíz*

Método de extracción	Tratamiento	Cq hoja de maíz	Cq harina de maíz
I CTAB modificado	A	23.97	23.09
	B	24.53	25.28
II Fenol y β-mercaptoetanol	C	23.67	24.02
	D	**22.92**	**23.01**
III Urea modificado	E	24.74	31.23
	F	**23.09**	**22.65**

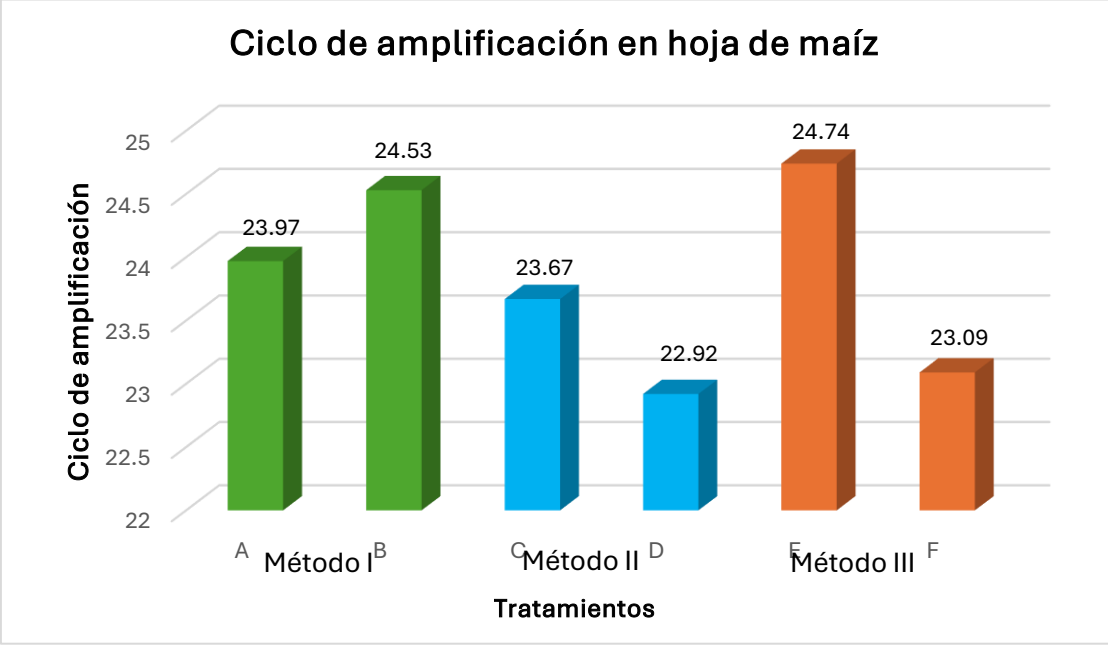

Figura 13. *Ciclos de amplificación de los mejores tratamientos de extracción en hoja de maíz*

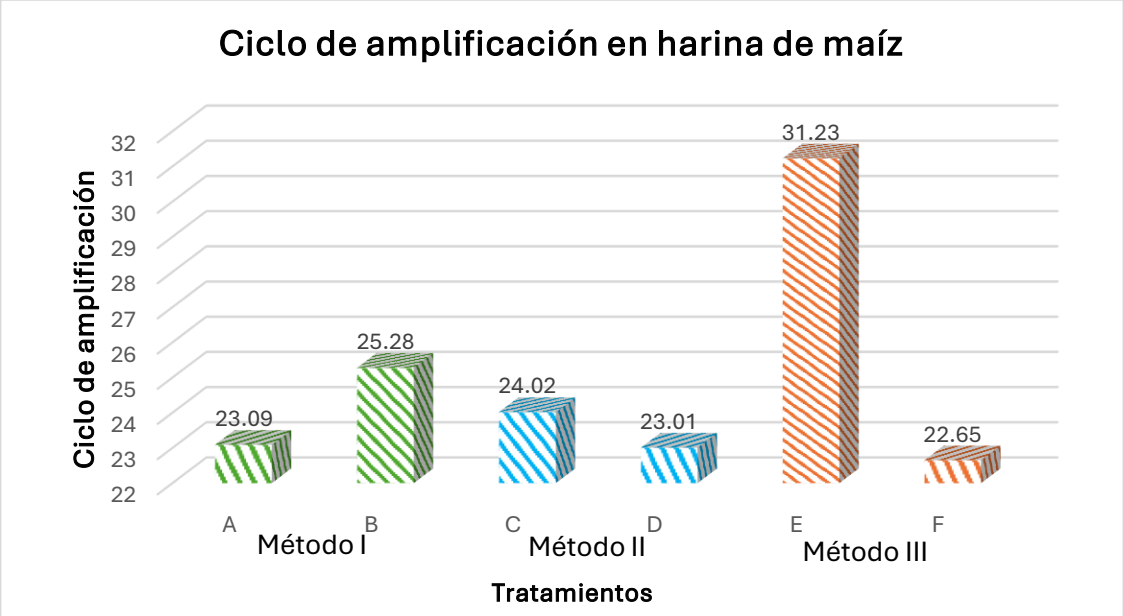

Figura 14. *Ciclos de amplificación de los mejores tratamientos de extracción en harina de maíz*

Para el ciclo de amplificación, existieron aproximadamente 0.5 ciclos de diferencia entre cada uno de los métodos; donde el método de extracción II fue el que presentó el valor más temprano con 22.630 ciclos para el gen de referencia *HMG-A*; así mismo el método III presentó un ciclo promedio de 23.005. De esta manera, al evaluar el promedio de ambos tratamientos en cada uno de los métodos de extracción, el método con las mejores cualidades respecto a concentración y ciclo de amplificación fue el método II.

El ciclo de amplificación más temprano para hoja perteneció al tratamiento IV (200 mg de muestra). 4 mL de buffer de extracción, 500 mM NaCl con columna de purificación) del método de extracción II (Fenol y β-mercaptoetanol). Mientras que, en harina de maíz, el ciclo de amplificación más temprano se presentó en el tratamiento IV (Acetato de potasio 3 M, con 20 minutos de incubación, con columna purificación, secado 5 minutos) perteneciente al método de extracción III (Urea modificado). Y la concentración más en los tratamientos I y III del método de extracción II (Fenol y β-mercaptoetanol).

6.1.3.4. Tiempo de proceso

En el cuadro 17 se muestran los tiempos de proceso obtenidos en los tres métodos utilizados. El método III es el que presentó el menor tiempo en ambos tratamientos. Si bien, los tiempos no son muy diferentes entre sí, en estudios de biología molecular la eficiencia del tiempo que dura el proceso de una muestra es un criterio primordial para la elección de nuevos métodos de extracción debido a que este factor podría aumentar la capacidad para proporcionar servicios y facilitar las oportunidades que satisfagan al cliente (ISO-9001/2015; Saling, Kicherer y Dittrich-Krämer, 2002).

Cuadro 17. *Tiempo de proceso de cada uno de los tratamientos en* ***hoja de maíz***

Método	Tratamiento	Tiempo (h)*
I CTAB modificado	A	6
	B	6
II Fenol y β-mercaptoetanol	C	7
	D	7
III Urea modificado	E	4
	F	4.5

*El tiempo de proceso considera la extracción de 25 muestras

6.1.3.5. Generación de residuos

En el Centro Nacional de Referencia de Inocuidad y Bioseguridad Agroalimentaria (CNRIBA) se establecen los lineamientos para manipular las sustancias químico-peligrosas, mezclas y sus Residuos Químicos Peligrosos (RQP), así como los agentes biológico-infecciosos y Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI) que se emplean y generan como parte de las actividades analíticas. El procedimiento establecido en el MEC-PR-MSRP-MANEJO DE SUSTANCIAS QUÍMICAS, MEZCLAS Y RESIDUOS PELIGROSOS-SGA,2024 considera la manipulación, el etiquetado, almacenamiento; así como su generación y disponibilidad para evitar cualquier tipo de accidente que ponga en riesgo la salud e integridad física de todos los trabajadores del CNRIBA, así como de las instalaciones y el medio ambiente. En los cuadros 18 y 19 se muestran los valores obtenidos en cada uno de los criterios

establecidos para la elección del método de extracción de ADN óptimo en hoja y harina de maíz.

La clasificación de los residuos químico-peligrosos se llevó a cabo según sus características: corrosivas, reactivas, tóxicas, explosivas e inflamables. Así como el riesgo que conllevan para la salud y el medio ambiente de lo especificado en la NORMA **Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005**. Las indicaciones de peligro y de precaución se registraron de acuerdo con la clasificación internacional utilizando un código alfanumérico que se compone de una letra y tres números. Donde la letra H significa "peligro". Un dígito que designa el tipo de peligro y dos números que designan peligros de explosividad (códigos de 200 a 210), inflamabilidad (códigos de 220 a 230), etc. (Secretaría de Medio Ambiente, 2006). Este identificador único siempre se muestra en las fichas de seguridad de cada reactivo, de donde fueron obtenidos (cuadros 18 y 19).

A continuación, se describen los residuos químico-peligrosos obtenidos pertenecientes en cada uno de los métodos de extracción según los siguientes reactivos empleados en cada método de extracción (Cuadros 18 y 19).

- **Método I**: Hexadeciltrimetilamonio bromuro (CTAB), cloroformo y Beta Mercaptoetanol
- **Método II**: Fenol, Cloroformo, Isopropanol, Beta Mercaptoetanol
- **Método III**: Isopropanol

En el método de extracción I se emplea el uso de cloroformo que puede ser nocivo en caso de ingestión (H302), toxicidad aguda en caso de inhalación (H331), reactivo de características de carcinogenicidad (H351), Toxicidad específica en determinados órganos (exposiciones repetidas) (H372). Además de CTAB que puede provocar daño ocular (H318), así como irritación cutánea (H315), muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos (H410).

El método de extracción II emplea el uso de fenol, B-mercaptoetanol para romper los puentes disulfuro de las proteínas presentes en la muestra. Según la ficha de datos de seguridad, indican que el B-mercaptoetanol es tóxico en caso de ingestión o inhalación y mortal en contacto con la piel además de que provoca irritación cutánea y lesiones oculares graves. En casos muy extremos puede provocar daños en algunos órganos como corazón e hígado, tras exposiciones prolongadas o repetidas, es muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos (Roth, 2016). Por otro lado, el fenol, es tóxico en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación, genera quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves, se sospecha que produce defectos genéticos, puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas, es tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Los principales reactivos del método de extracción III son urea, acetato de potasio y N-lauril saracosina sódica. Según datos de la ficha técnica de seguridad, la urea no presenta reactividad bajo condiciones ambientales normales, no se clasifica como corrosivo, provoca malestares en caso de ingestión, no se clasifica como sensibilizante respiratoria o sensibilizante cutánea, no se clasifica como mutágeno en células germinales, carcinógeno ni tóxico para la reproducción; además, no se clasifica como tóxico específico en determinados órganos (tanto en exposición única como repetida), nocivo para los organismos acuáticos (Pochteca, 2021; Roth, 2016).

El tipo de manejo que se específica en la ficha de seguridad técnica para la N-lauril saracosina sódica indica que, si se manipula de la manera correcta, no se requieren medidas especiales, diversos ensayos sugieren no ser irritante o provocar corrosión cutánea, no sensibilizante respiratoria, tampoco induce mutación en genes de mamíferos, ni aberraciones cromosómicas, el único riesgo que se puede presentar con el uso de esta sustancia es lesiones oculares graves en caso de contacto. Sin embargo, este riesgo puede disminuir si se manipula de manera correcta durante el procesamiento de las muestras (Fagron, 2014; Pochteca, 2021).

***Cuadro 18**. Criterios de evaluación para elección del método de extracción en hoja de maíz*

	Criterios evaluados						
				Pureza			
Método	**Tratamiento**	**Ciclo promedio de amplificación**	**Concentración**	**A_{260}/A_{280}**	**A_{260}/A_{230}**	**Tiempo (horas)**	**Clasificación de residuos**
I	A	23.9744	51.25	1.82	1.85	6	H302, H331, H315, H319, H372, H410, H318, H335, H373
	B	24.53069	137.9	1.79	1.13	6	H302, H331, H315, H319, H372, H410, H318, H335, H373
II	C	23.672	459.5	1.86	2.1	7	H301, H302, H303, H315, H319, H351, H372, H311, H331, H314, H318, H341, H373, H411, H310, H336
	D	22.929	130.2	1.83	2.02	7	H301, H302, H303, H315, H319, H351, H372, H311, H331, H314, H318, H341, H373, H411, H310, H336
III	E	24.74	217.77	1.84	1.21	4	H302
	F	23.09	160	1.84	2.2	4. 5	H302

Cuadro 19. *Criterios de evaluación para elección del método de extracción en harina de maíz*

	Criterios evaluados						
				Pureza			
Método	**Tratamiento**	**Ciclo promedio de amplificación**	**Concentración**	**A_{260}/A_{280}**	**A_{260}/A_{230}**	**Tiempo (horas)**	**Clasificación de residuos**
I	A	23.0922	47.27	1.905	1.605	6	H302, H331, H315, H319, H372
	B	25.2870	76.65	1.77	0.985	6	H302, H331, H315, H319, H372
II	C	23.672	459.5	1.86	2.10	7	H301, H311, H331, H411, H341, H310
	D	22.929	130.2	1.83	2.02	7	H301, H311, H331, H411, H341, H310
III	E	31.23	254.2	2.12	1.65	4	H302
	F	22.65	56.05	1.95	1.82	4.5	H302

Por lo tanto, se analizaron los datos obtenidos mediante una matriz cualitativa de decisión. Ya que se tenían cinco criterios a considerar y el objetivo en este proyecto no era únicamente elegir un método que presentara los valores más altos para la concentración de ADN y los más bajos para el ciclo de amplificación del gen de referencia. Sino elegir un método de extracción que permitiera reducir el tiempo de procesamiento de las muestras, optimizando un método que le permitiera realizar más eficiente la extracción de ADN en hoja y harina de maíz y establecer un método de extracción que generara la menor cantidad de residuos químico-peligrosos para la salud del analista y el medio ambiente.

6.1.4. Matriz de decisión cualitativa para la determinación del método óptimo de extracción

Al considerar los cinco criterios anteriormente mencionados, se construyó la matriz de decisión cualitativa para elegir el método próximo a estandarizar y validar. Como se observa, se asignaron valores del 1 al 6 en cada uno de los criterios. El valor asignado en cada uno de los criterios se especifica en el método. La matriz cualitativa de decisión se muestra en el cuadro 20 para hoja de maíz, en el cuadro 21 se muestra la matriz cualitativa de decisión para harina de maíz.

Cuadro 20. *Matriz cualitativa de decisión para tratamientos en hoja de maíz*

	Criterios evaluados							Sumatoria
				Pureza				
Método	**Tratamiento**	**Ciclo promedio de amplificación**	**Concentración**	**A_{260}/A_{280}**	**A_{260}/A_{230}**	**Tiempo**	**Clasificación de residuos**	
I	A	3	1	3	3	5	4	19
	B	2	3	1	2	5	4	17
II	C	4	6	6	5	4	2	27
	D	6	2	4	4	4	2	22
III	E	1	4	5	1	6	6	23
	F	5	5	5	6	5	6	**32**

Cuadro 21. *Matriz cualitativa de decisión para tratamientos en harina de maíz*

	Criterios evaluados							Sumatoria
				Pureza				
Método	**Tratamiento**	**Ciclo promedio de amplificación**	**Concentración**	**A_{260}/A_{280}**	**A_{260}/A_{230}**	**Tiempo**	**Clasificación de residuos**	
I	A	4	1	5	-1	5	4	18
	B	2	3	-1	-2	5	4	11
II	C	3	6	4	6	4	2	25
	D	5	4	3	5	4	2	23
III	E	1	5	0	-1	6	6	17
	F	6	2	6	1	5	6	**26**

Los resultados obtenidos con el método I, no fueron favorables casi en ningún aspecto debido a que no presentaron la concentración más alta (Tratamiento A: 51.25 ng/µL para hoja y 47.27 ng/µL para harina). El tratamiento B presentó valores más altos que el tratamiento A de concentración tanto para hoja como en harina (137.9 ng/µL y 76.65 ng/µL). Sin embargo, los ciclos de amplificación tampoco son los esperados en ambos tratamientos para un método de extracción que requiere un tiempo de proceso muy largo (Cuadros 18 y 19) y emplea el uso de cloroformo que puede causar irritación cutánea y podría ser tóxico en caso de inhalación (Roth, 2017). Tomando en cuenta los cinco criterios, la sumatoria del método de extracción I fue 19 y 17 puntos respectivamente para el tratamiento A y B en hoja; mientras que en harina 18 y 11 puntos respectivamente (Cuadros 18 y 19). De esta manera, es el primer método quedó descartado.

En el análisis de cada uno de los tratamientos, se observó que la concentración más alta se presentó en el tratamiento C con un valor de 459.5 ng/µL que pertenece al método II, posteriormente; el tratamiento E con un valor de 217.77 ng/µL. El ciclo

de amplificación para el gen de referencia *hmg* más temprano se presentó en el tratamiento F, perteneciente al método de extracción III, que además presentó valores óptimos para la pureza en ambas relaciones A_{260}/A_{280} (1.84) y A_{260}/A_{230} (2.2). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la generación y tipo de residuos generados fueron un criterio crucial en la selección del método de extracción definido.

El tratamiento que presentó la sumatoria más alta con 32 y 26 puntos (Cuadros 20 y 21), fue el tratamiento F, perteneciente al método de extracción III. A pesar, de no contar con los valores más altos de concentración, presentó el ciclo de amplificación más temprano (22.65), el tiempo de proceso es menor al empleado en el tratamiento C, que presentó el segundo valor más alto (25 puntos). Además, como se mencionó anteriormente, los residuos químicos generados no requieren tratamiento, etiquetado o desecho especial a diferencia de los generados en el tratamiento C, donde también se requiere el uso en gran parte del proceso de una campana de extracción de gases para la manipulación de los reactivos.

Actualmente, el cambio climático, la degradación del medio ambiente y la contaminación son situaciones preocupantes; por lo tanto, encontrar alternativas sostenibles en la ciencia es prioridad (Kurian y Das, 2021). Bánkuti y colaboradores en 2020 establecieron un método de extracción de ADN a partir de cultivos microbianos con bajo costo y además con menor carga de residuos ambientales. Bajo este mismo principio, en el presente estudio se identificó el método con la menor cantidad de residuos químico-peligrosos al método III (Cuadros 20 y 21).

Molero y colaboradores (2017) establecieron que la búsqueda de la calidad ha sido siempre un punto clave en la gestión de los procesos. En la antigüedad solo era orientada hacia la conformidad con el servicio y con el avance del tiempo se fue aplicando a todas las etapas de dichos procesos. El tratamiento F, perteneciente al método III de urea además de ser el que presentó el ciclo de amplificación más temprano, reduce comparablemente el tiempo de proceso empleado en los otros dos métodos de extracción. Una manera de disminuir el tiempo de proceso de extracción es mediante el uso de kits comerciales, que desde que se introdujeron al mercado en los años 90 fueron muy exitosos debido a que generalmente estos kits suelen ser métodos más eficientes en tiempo, generalmente, los fabricantes proporcionan datos de grandes concentraciones de ADN o pureza (Kazantseva *et al.,* 2021; Raghunathan *et al.*, 2020).

Las fases del proceso analítico de un laboratorio se presentan de manera general en tres etapas: la etapa pre-analítica, donde se realiza la recolección de muestra, registro y procesamiento; la etapa analítica, donde se realiza el procedimiento de las diferentes pruebas y el registro de resultados y finalmente la etapa post-analítica, donde se realiza el informe y archivo de resultados, el resguardo de la muestra y la

disposición de residuos (Bone, 2023). Dentro del proceso analítico se encuentra la extracción de ADN, por lo tanto, con el objetivo de desarrollar una mejora continua, se tomó el tiempo empleado en cada uno de los métodos empleados, tomando como base la extracción de 25 muestras. Los resultados se muestran en el cuadro 5. Se observa que el método más rápido es el método III, donde el tratamiento E se desarrolla en 4 horas, mientras que el tratamiento F requiere únicamente de 30 minutos más debido al empleo de la columna de purificación ADN Clean and Concentrator™, Zymo Research.

A pesar de representar una gran opción para la extracción de ADN y reducir el tiempo de proceso, el precio de los kits de extracción es elevado y ese aspecto suele ser una limitante dependiendo del presupuesto del laboratorio. En algunos estudios se han encargado de evaluar distintos kits de extracción comercial centrándose en el rendimiento y la pureza Jabeen y colaboradores en 2022 argumentaron que cuando los ensayos posteriores a la extracción requieren una alta calidad los kits de extracción son una mejor opción, mientras que en los casos en que la cantidad de ADN es requerida sobre la calidad, el método de CTAB es la mejor opción, además de ser más económica. Sin embargo, se debe considerar que métodos manuales como CTAB, a pesar de ser un método muy eficaz y obtener ADN de alta calidad requiere de mucha capacitación del analista y un gran tiempo de procesamiento.

Se evaluó la cantidad y tipo de tratamiento que requerían los residuos generados durante el proceso de extracción de cada uno de los tratamientos. De acuerdo con este criterio, se tomaba como 6 a aquellos que generaban menor cantidad de residuos y su manejo no requería un tratamiento especial, por lo tanto, los tratamientos con el menor valor son aquellos que generaban mayor cantidad de residuos y su almacenamiento, transporte y tratamiento eran especiales.

El tratamiento F, perteneciente al método de extracción de urea modificado resultó exitoso en la matriz de maíz para hoja y harina. Los resultados presentados respaldan el potencial del método para la extracción de ADN de bajo costo y sensible que permite extraer ADN para los ensayos posteriores de qPCR. Adicionalmente, disminuye los pasos de pipeteado que se realizan en el método de CTAB, dando como resultado buena reproducibilidad y generando una carga menor de residuos al medio ambiente. Que puede ser un parteaguas para la extracción en otras matrices vegetales. El método propuesto en este proyecto proporciona un método de extracción eficaz. Aunque se requirió de un segundo paso de limpieza después de la elución empleando la columna de purificación para obtener ADN de mayor calidad y de esta manera, disminuir en promedio tres ciclos el valor de la amplificación del gen de referencia *HMG-A.* Concluyó con los mejores resultados en rendimiento, pureza, ciclo de amplificación, presentó la menor cantidad de residuos químico-peligrosos y disminuyó el tiempo de proceso que puede ser comparable a un kit de

extracción comercial sin representar un costo equivalente. Por lo tanto, se concluye que fue el mejor método para los cinco parámetros evaluados.

6.1.5. Estandarización del método de extracción de urea modificado

La estandarización del método de extracción se realizó únicamente para la matriz de maíz en tejido de hoja.

- Fase I: Pesado de muestra y lisis celular

Cantidad de muestra: Con base en los resultados mostrados en el presente estudio se demostró que la concentración requerida para concluir con todos los ensayos cualitativos y cuantitativos se obtenía a partir 200 mg. Por lo tanto, se eligió esta cantidad como la óptima en muestras de hoja y harina de maíz.

Volumen de buffer de lisis (buffer A): El volumen indicado para muestras de hoja fue 500 µL; mientras que para muestras de harina fue 1,000 µL. Lo anterior debido a que con esta cantidad de volumen se logran cubrir los 200 mg de muestra tanto para hoja, como para harina y el rendimiento de ADN aumentaba con el incremento del volumen de buffer de lisis.

Tiempos de incubación: Establecer una temperatura adecuada es fundamental, diversos estudios realizan incubación a 65°C (Castillo, García y Reyes, 2004) basados en estos antecedentes se eligió esta temperatura como la óptima en este ensayo. Experimentalmente se demostró que el tiempo de incubación inicial a 65°C, no presentó diferencia significativa para la incubación en muestras de hoja a 20 y 30 minutos; de esta manera, se eligió 20 minutos pues reducía el tiempo de proceso analítico. Por otra parte, el sobrenadante de las muestras de harina en contacto con el buffer de lisis y la incubación a 65°C comenzaba a presentar una consistencia viscosa que imposibilitaba la recolección del sobrenadante, dificultando la extracción de ADN. Adicionalmente, la cuantificación del ADN extraído mostró una mayor absorbancia a una longitud de onda de 230 nm, lo que indicaba una alta contaminación de polisacáridos y compuestos fenólicos (Rodríguez, 2023).

Velocidad de centrifugación: El comportamiento de las muestras se observó diferente en cada una de las velocidades de centrifugación. Se eligió continuar el proceso con 10 minutos a 14,000 rpm, puesto que la recuperación del sobrenadante era más sencilla y rápida, y solo en caso de haber recuperado el sobrenadante con alguna partícula de muestra, el sobrenadante se centrifugaba nuevamente y se trasladaba a un nuevo microtubo.

- Fase II: Precipitación

Concentración de aceto de potasio: Experimentalmente, tal como se describió; a una concentración de 5 M, el acetato de potasio se precipitaba y se observaban sales en el fondo del recipiente en la disolución 1:10 acetato de potasio: isopropanol. El acetato de potasio ha sido ampliamente usado para la precipitación de ADN, Paz y colaboradores (2023), realizaron la extracción en grano de algodón a una concentración 5 M, empleando adicionalmente ácido acético glacial, incubando en hielo durante 20 minutos y, posteriormente precipitando con isopropanol, proceso que se realizó de la misma manera en este proyecto.

Tiempos de incubación a -20°C: El precipitado de ADN se presenta generalmente, a una alta concentración de sales en compañía de un alcohol que interactúa con los puentes hidrógeno y precipita el pellet al fondo del microtubo. En el presente estudio, el tiempo de incubación de 20 minutos seleccionado es similar al empleado por Paz y colaboradores (2023), por otro lado, Ramírez (2023) indica que es recomendable evitar la congelación y descongelación durante el proceso de extracción, pues estos inducen daño al ADN, por lo tanto, durante este paso, es necesario emplear un solvente con un punto de fusión alto, el punto de congelación del isopropanol es -89.5°C. De esta manera, lo convierte en un solvente óptimo para la incubación a -20°C.

- Fase III: Secado y re-suspensión del pellet

Tiempo de secado de pellet: El correcto secado del pellet es un paso fundamental en un método de extracción, ya que si se llega a secar en exceso el pellet se puede representar efectos adversos el ADN en ensayos posteriores (la amplificación de gen en PCR tiempo real), nuestros resultados muestran que a 3 minutos aún se presentaban restos de etanol en la pared del microtubo mientras que a 5 minutos el pellet se seca por completo.

Volumen de H_2O: Se estableció la resuspensión ideal del pellet en 100 µL.

Una vez establecidas las condiciones necesarias para estandarizar el método de extracción y que los resultados cumplieron con los criterios de aceptación del DAMNT, se prosiguió a realizar las extracciones necesarias para garantizar la extracción de ADN bajo condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.

6.2. Desarrollo del material de referencia interno

6.2.1. Extracción de ADN con el método de urea modificado

Los promedios de los resultados de concentración y relación A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} de las 250 extracciones de ADN de hoja de maíz se muestran en el cuadro 22. El promedio de concentración de las 10 muestras presentó un valor de 697.35212

ng/µL, este resultado es muy favorecedor en cuanto al rendimiento obtenido en la extracción. En cuanto a la relación A_{260}/A_{280} el promedio de todas las muestras se encuentra en un rango 1.8-2.0.

Cuadro 22. *Rendimiento y pureza de extracciones realizadas con el método de urea modificado del material*

Muestra	Concentración	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
1	530.28	1.9904	2.1236
2	719.9666	1.96166	1.7929
3	634.0666	1.9625	1.8733
4	489.976	1.9604	1.9376
5	376.96	2.0016	2.0724
6	614.272	1.918	1.8674
7	824.532	1.9788	1.9668
8	868.496	1.9744	1.6808
9	1029.716	2.0504	1.8348
10	885.256	2.0228	2.0116
Promedio	**697.35212**	**1.982096**	**1.91612**

n= 10 muestras
N= 250 extracciones de ADN

6.2.1. 2. Rendimiento del material de referencia negativo

Como se observa en el cuadro 22, se obtuvieron **250 extracciones** de ADN de hoja de maíz, a partir de la extracción de las **25 réplicas** de cada una de las muestras. El promedio total de todas las extracciones presentó un valor de 697.35212 ng/µL; sin embargo, se observó que la desviación estándar entre cada una de las muestras es muy alta, obteniendo el valor más bajo en 376.96 ng/µL perteneciente a la muestra V; mientras que el valor más alto se presentó en la muestra 9 con 1029.716 ng/µL.

La calidad del pellet de ADN obtenido está determinada por diversos factores; especialmente por la condición fisiológica o morfológica del material vegetal analizado. Las diferencias de concentración y pureza de ADN se pueden deber a un efecto de la muestra, ya que la varianza entre las réplicas no presentó diferencia significativa. Vásquez *et al*., 2023 registra el mismo comportamiento revelando que la cantidad y calidad de ADN se encontraba directamente asociada con el grado de conservación en semillas de maíz, demostrando que cuanto mejor era la conservación de las semillas, la calidad y cantidad de ADN que se obtenía de la muestra era mejor.

El color de las hojas de las muestras a partir de las cuales se obtuvo el ADN podría estar determinado a través de diversos factores como el déficit de algún nutrimento (Cevallos, 2020); o bien por el grado o madurez de la hoja en el momento que fue

recolectada. La senescencia foliar se produce junto con los cambios de color en las hojas y es un fenómeno visible en el ciclo de vida de la planta. Múltiples factores influyen en la progresión de la senescencia foliar, como la edad de la hoja y de la planta, el crecimiento y el desarrollo, las hormonas vegetales, la luz, la sequía, el estrés salino, la infección por patógenos o el ataque de herbívoros (Koyama, 2014; Zhang et al., 2024). La senescencia implica una degradación de clorofila, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos, de esta manera se puede deducir que al extraer ADN a partir de hojas de muestras de temprana edad se obtendrán mejores resultados que al extraer ADN de hojas de etapa tardía.

Experimentalmente se demostró este fenómeno, en la figura 15 se muestra una imagen de tubos con diversas muestras durante su extracción. Los resultados más altos en concentración se obtuvieron de las muestras en las que el sobrenadante obtenido después de la lisis celular presentaba una coloración verde oscuro. Obtener un alto rendimiento era un objetivo primordial en este proyecto, ya que esto permitiría realizar todos los ensayos cualitativos y cuantitativos a partir de una sola extracción de ADN sin la necesidad de extraer nuevamente durante el proceso analítico. Acosta (2021) establece que para generar una alta unidad productiva de rendimiento es necesario para mejorar la operación de diversos factores, con la finalidad de reducir los impactos ambientales por dicha actividad. Delgado y colaboradores (2019) mencionan que un Sistema de Gestión Integral permite la una dirección basada en la optimización de procesos con la disminución de los impactos ambientales generales.

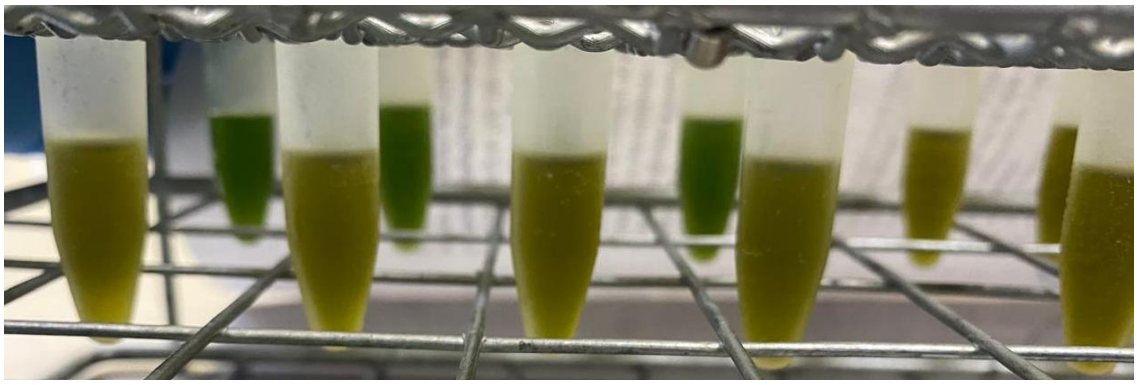

Figura 15. *Extracción de ADN con tratamiento F en hoja de maíz*

6.2.2. Evaluación de la especificidad en material de referencia negativo

El ensayo de especificad demostró la amplificación de los genes de referencia únicamente en las muestras de maíz. La especificidad se refiere a la aptitud para responder exclusivamente al analito que se debe realizar, se evalúa contra compuestos similares dentro de un grupo. El ensayo se realizó en distintos blancos de matriz para observar posibles interferencias debidas a la variedad de la matriz. Los resultados presentados en el cuadro 23, verificaron que no existió amplificación cruzada entre todos los elementos ensayados determinando que los

oligonucleótidos y sondas utilizados son específicos para los diferentes genes de referencia *HMG-A, ADH1 y Zeina*.

Cuadro 23. *Evaluación de la especificidad*

ADN de diferentes matrices	Resultado *HMG-A*	Resultado *ADH1*	Resultado *Zeina*
Soya	Negativo	Negativo	Negativo
Algodón	Negativo	Negativo	Negativo
Canola	Negativo	Negativo	Negativo
Arroz	Negativo	Negativo	Negativo
Alfalfa	Negativo	Negativo	Negativo
Maíz	Positivo	Positivo	Positivo

6.2.3. Eficiencia de amplificación en material de referencia negativo

En el cuadro 24 se presenta el promedio de 50 datos de pendiente, eficiencia de amplificación y coeficiente de correlación. La eficiencia de amplificación y la ausencia de la prueba de inhibidores cumplió con los parámetros establecidos por la Red Europea de Laboratorios de OGM (*ENGL*), por sus siglas en inglés. Donde se establecen los valores de aceptación para pendiente (-3.1 a -3.6), coeficiente de relación (≥0.98) y eficiencia de amplificación (90 a 110%) (Marchesi *et al.,* 2015). Por otra parte, la inhibición de la PCR se analizó contemplando la guía "Directrices para la validación de métodos de extracción de ADN aplicados en el análisis PCR posterior de alimentos y piensos para detectar la presencia de material modificado genéticamente" de Hans-Ulrich y Grohmann (2014), donde se verificó la amplificación del gen de referencia en cada nivel de dilución (ISO 21570:2005). En el cuadro 24 se muestra la media de los cuatro puntos de las curvas (100, 50, 25 y 12.5%). Las figuras 16 y 17 representan las curvas estándar recuperadas a partir del software del termociclador QuantStudio 6 Pro®.

Siguiendo la ecuación de la PCR, se indica que en una dilución 1:2, la amplificación de la secuencia blanco es uno, por lo tanto, se espera que la amplificación entre cada punto de la curva estándar sea aproximadamente cada ciclo. En el cuadro 24, se observa que el promedio de los cuatro puntos de las curvas cumple con este criterio. La muestra 8 presentó un comportamiento un poco diferente respecto a las demás muestras, se observa entre el punto B (50 ng/µL) y el punto C (25 ng/µL) una diferencia de 1.3 ciclos de amplificación. Sin embargo, todas las curvas de la muestra cumplieron con los criterios de aceptación en cuanto a pendiente, eficiencia de amplificación y coeficiente de correlación.

Cuadro 24. *Eficiencia de amplificación del gen de referencia HMG-A en hoja de maíz*

Muestra	Concentración de ADN ng/µL /ciclo de amplificación				Pendiente	Eficiencia	Coeficiente de correlación (R^2)
	100	50	25	12.5		%	
1	25.998	26.974	28.022	29.182	-3.4725	94.1325	1
2	27.62	28.554	29.416	30.324	-3.345	98.925	0.996
3	26.592	27.428	28.494	29.542	-3.51	92.8325	1
4	27.358	28.444	29.374	30.418	-3.36	98.86	0.990
5	27.662	28.79	29.866	30.828	-3.528	92.086	0.998
6	28.03	29.048	30.086	31.18	-3.486	93.748	0.996
7	26.068	27.132	28.38	29.032	-3.432	95.894	0.988
8	26.56	**27.67**	**28.932**	29.974	-3.472	94.112	0.988
9	27.57	28.666	29.73	30.69	-3.472	94.242	0.994
10	26.93	28.01	28.996	30.022	-3.412	96.42	1
PROMEDIO	27.0388	28.0716	29.1296	30.1192	-3.44895	95.1252	0.988

n=600 debido a que se generaron curvas estándar con 4 puntos por triplicado para alcanzar concentraciones finales equivalentes a 100, 50, 25 y 12.5 ng/µL.

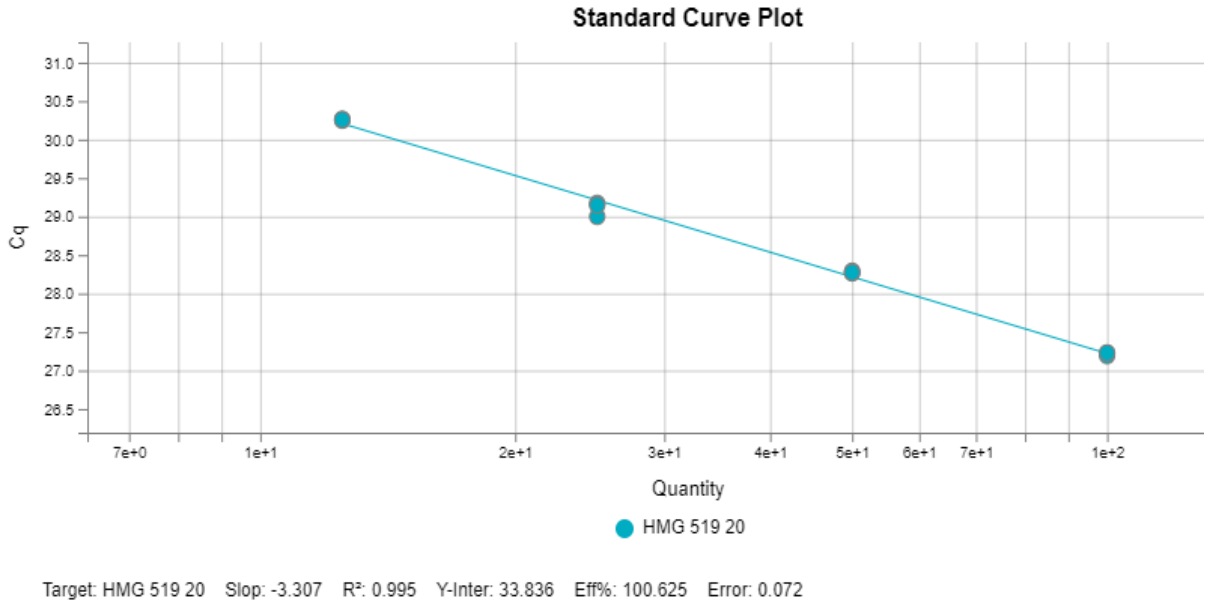

Figura 16*. Curva estándar de presencia de inhibidores con la amplificación del gen de referencia HMG-A en una dilución 1:2. La curva cumple con todos los criterios de aceptación de pendiente, eficiencia y R2.*

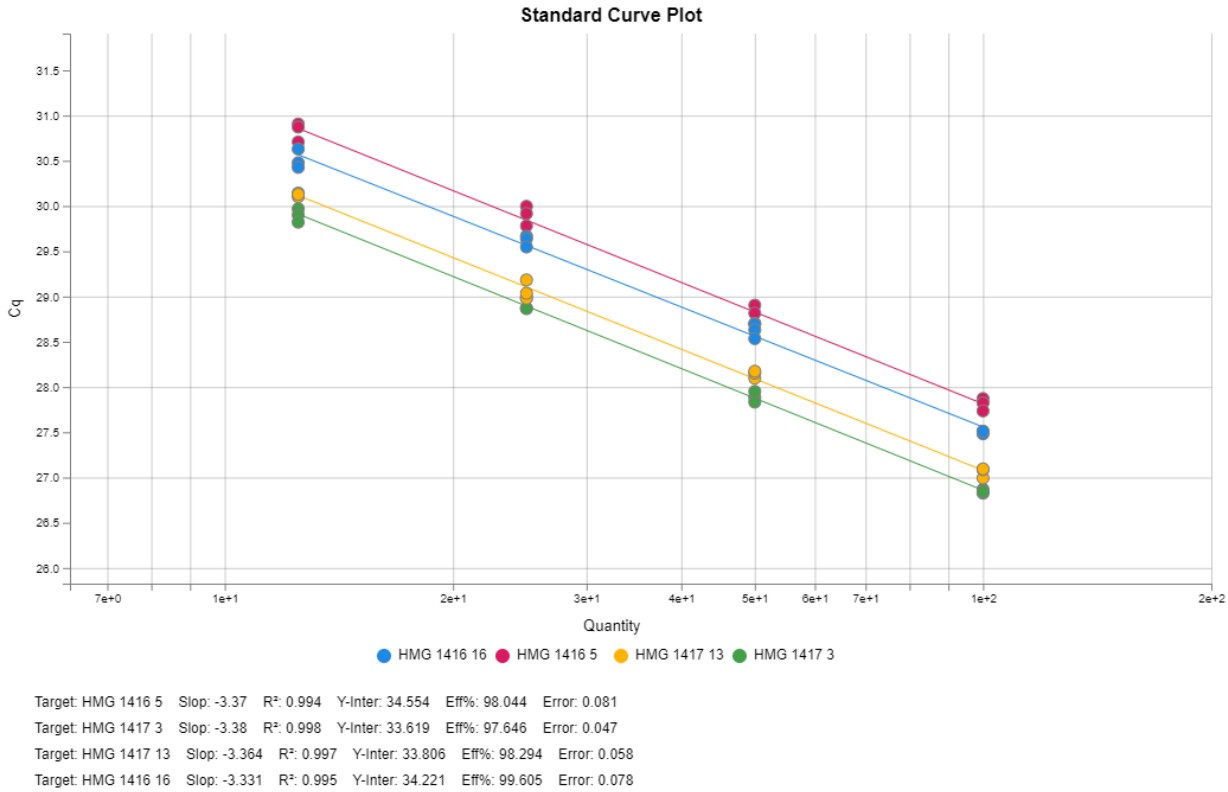

Figura 17. *Curvas estándar de presencia de inhibidores con la amplificación del gen de referencia HMG-A en una dilución 1:2. Las curvas cumplen con todos los criterios de aceptación de pendiente, eficiencia y R2.*

6.2.4. Evaluación de la presencia de inhibidores en material de referencia negativo

La evaluación de la presencia de inhibidores se realizó debido a que la PCR es una técnica enzimática, por lo tanto, es susceptible de elementos que puedan inhibir la reacción, existen una gran variedad de sustancias que pueden ser inhibidores; algunas son propias del material con el que se trabaja o bien, pueden ser restos de la extracción de ADN, entre las sustancias que pueden presentarse como inhibidores se encuentran compuestos orgánicos como inorgánicos. En el caso propio de las plantas pueden presentarse polifenoles, polisacáridos y distintos colorantes. Se han realizado diversos estudios que comprueban la presencia de inhibidores, no únicamente durante extracción de ADN genómico, Alcaide y colaboradores en el 2020 reportaron que específicamente en algunos casos, la electroforesis capilar no permite el dimensionamiento preciso y una estimación razonable de la concentración absoluta de las muestras, este ensayo es ciego a la presencia de impurezas que pueden interferir en los análisis posteriores. La prueba de inhibidores permite determinar la calidad del ADN obtenido, así como verificar que no existe presencia de elementos que puedan resultar en una amplificación deficiente (Sidstedt *et al.,* 2019).

En el cuadro 25 se muestran los ciclos de amplificación para determinar la presencia de inhibidores mediante el cálculo del ΔCp sustentado en el valor de pendiente, intercepto y el ct teórico obtenido de algoritmos de cálculo. Todos los valores de ΔCp, se encuentran dentro del criterio aceptable (Marchesi *et al.,* 2015), por lo que se determina que las extracciones están libres de sustancias que pudiesen retrasar el ciclo de amplificación. Estos criterios están basados en la guía de referencia en materia de OGMs de la Joint Research Centre (JRC), las medidas de la Unión Europea en materia de OGMs son un marco de referencia internacional. Los datos obtenidos para la eficiencia de amplificación y la presencia de inhibidores de este proyecto cumplieron con los requerimientos establecidos en el MPR de la Red de Laboratorios de OGM, por lo tanto, son válidos a nivel internacional.

Cuadro 25. *Prueba de presencia de inhibidores de qPCR*

Muestra	Réplica de extracción	Intercepto	Cq medido	Cq teórico	Δ Cq
3	I	33.9500	27.8638	27.9102	-0.046
	II	33.2722	27.5702	27.5018	0.068
	III	33.9531	27.8770	28.0081	-0.131
	IV	34.6300	27.8070	28.5426	-0.736
4	I	34.0163	28.6470	28.7033	-0.056
	II	34.6970	28.7560	28.7550	0.001
	III	34.0780	28.6507	28.4153	0.235
	IV	33.8547	27.8841	27.8653	0.019
5	I	34.4138	28.7243	28.7499	-0.026
	II	34.6460	28.8666	28.9336	-0.067
	III	34.7860	28.6100	28.8889	-0.279
	IV	34.6590	28.6507	28.9946	-0.344
6	I	34.5655	28.9146	28.9295	-0.015
	II	35.6813	29.6367	29.6457	-0.009
	III	34.9091	28.8632	28.8331	0.030
	IV	34.8047	28.9719	28.9631	0.009
9	I	34.5541	28.8072	28.8291	-0.022
	II	34.2214	28.6209	28.5615	0.059
	III	34.4607	28.6100	28.5070	0.103
	IV	34.5376	28.4259	28.4563	-0.030
10	I	33.6185	27.8897	27.8767	0.013
	II	33.8707	28.1132	28.0884	0.025
	III	33.7161	27.9522	27.9308	0.021
	IV	33.8566	27.9635	27.8980	0.066

6.2.5. Amplificación de genes de referencia en material de referencia negativo

Los resultados de la amplificación de los tres genes de referencia evaluados se muestran en el siguiente cuadro, se presenta la media aritmética de 400 datos de cada gen de referencia. En la figura 18 se muestra la amplificación de los tres genes de referencia en una misma muestra, se observa gráficamente que el gen de referencia *HMG-A* es el que cuenta con el ciclo más temprano. Al analizar los resultados de amplificación de cada gen de referencia, se determinó que el gen de referencia *HMG-A* es con el que se obtiene un ciclo de amplificación más temprano (Cuadro 26). Por lo tanto, se seleccionó este gen como el óptimo para la validación del método.

Cuadro 26. *Resultados de concentración, pureza y amplificación de gen HMG-A, ADH1 y zeina sin columna de purificación DNA Clean and Concentrator™, Zymo Research*

	Media de ciclo de ampliación		
Muestra	*HMG-A*	*ADH1*	*Zeina*
1	25.5944912	27.4741875	26.6833854
2	26.9321357	28.1300499	27.6532121
3	26.3158828	27.6496668	26.4515139
4	27.0048478	29.3949314	28.2732434
5	27.3141589	30.7641447	28.9411062
6	27.5026652	29.2806301	28.8589776
7	25.5548074	26.8158607	25.6864246
8	26.138181	27.9186107	26.5551231
9	27.1863411	29.0290564	28.6311453
10	26.3838069	28.2292941	28.0645182
Promedio	**26.5927318**	**28.4686432**	**27.579865**

n=1,200 réplicas de amplificación de los tres genes de referencia. 400 datos corresponden a HMG-A, 400 para ADH1 y 400 para zeina.

Es importante la amplificación del gen de referencia debido a que, en la actualidad, la cuantificación del contenido de material genéticamente modificado en productos de comida y piensos alimenticios se realiza por medio de PCR en tiempo real o PCR digital, para ello se requiere de la amplificación de un gen de referencia. Diversos estudios se han encargado de realizar la amplificación de diferentes genes de referencia en maíz (Gutiérrez-Angoa *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2022; Savini *et al.*, 2023). La ventaja que se presenta en el método empleando qPCR es su alta sensibilidad, en teoría un ensayo de qPCR puede detectar el transgén insertado independientemente de su ubicación en el genoma (Liu *et al.,* 2021).

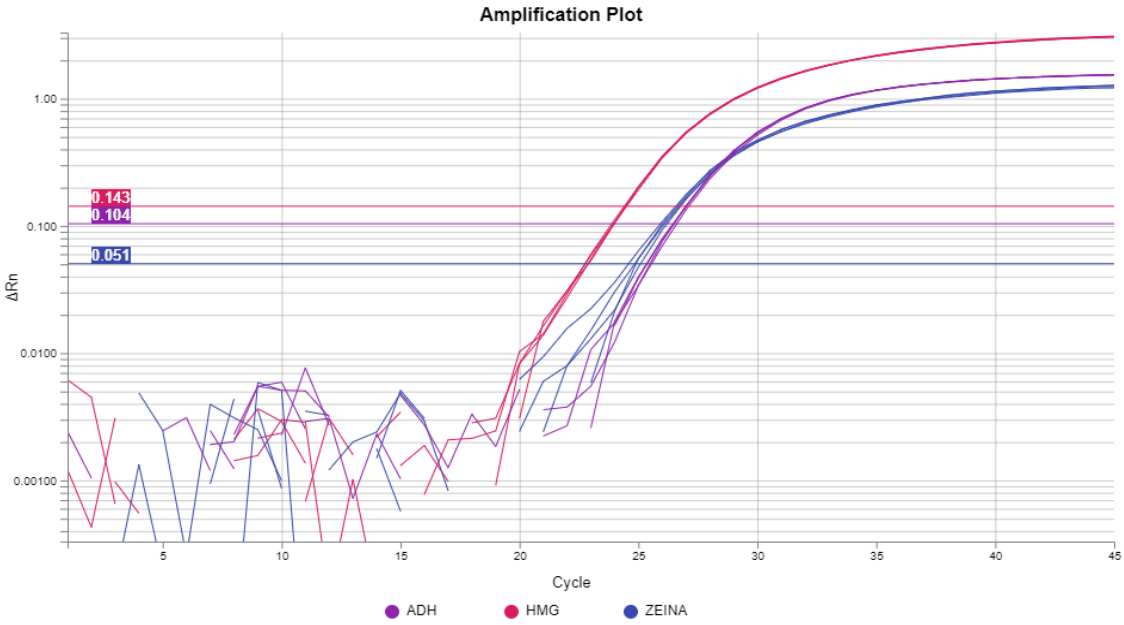

Figura 18. *Amplificación de genes de referencia en hoja de maíz. En color rojo se presenta la amplificación de HMG-A, en color morado la amplificación de ADH1 y en azul se presenta la amplificación del gen Zeina*

.

6.2.5.1. Amplificación de gen de referencia empleando columna de purificación

La amplificación del gen de referencia *HMG-A* empleando la columna de purificación se realizó con el objetivo de obtener un ciclo de amplificación más temprano. Los resultados se presentan en el cuadro 27. En la figura 19 se muestra el gráfico obtenido del espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c en una muestra de ADN de hoja de maíz con la columna de purificación DNA Clean and Concentrator™, Zymo Research. Como se observa en el cuadro 16, los valores de A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} se encuentran dentro de los rangos establecidos en la norma ISO21570:200519 (Anexo B1 sobre ADN monocatenario). Los resultados de ciclo de amplificación mostrados en el cuadro 25, demuestran que mediante la purificación del ADN el ciclo de amplificación disminuyó 2.6 ciclos.

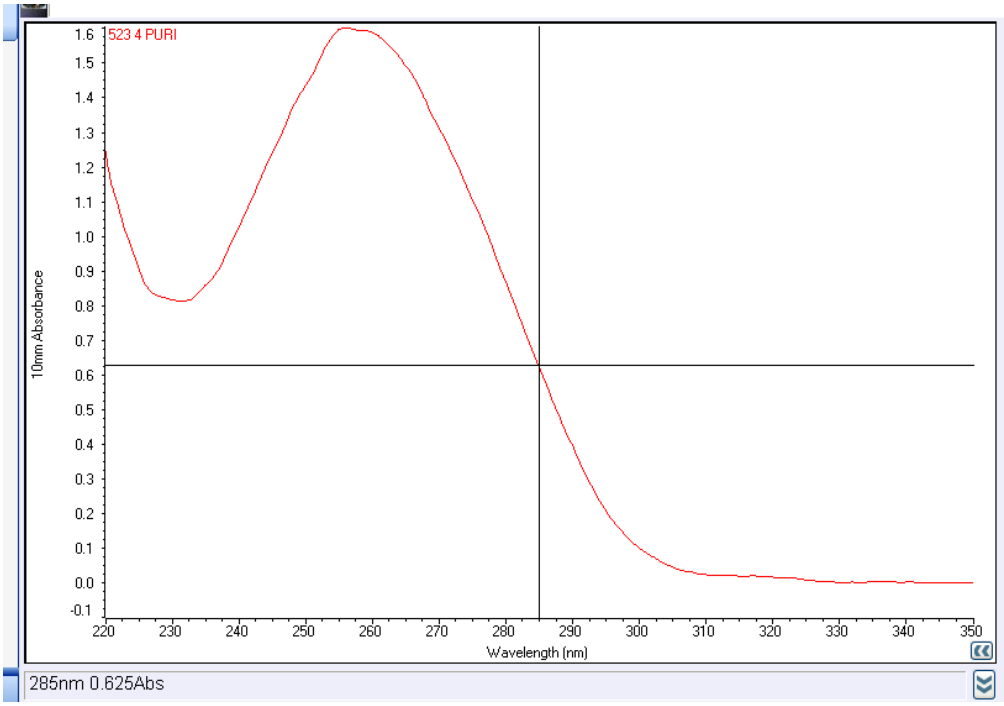

Figura 19. *Imagen de gráfico del espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c en muestras de ADN de hoja de maíz con la columna de purificación DNA Clean and Concentrator™, Zymo Research*

Cuadro 27*. Muestras estandarizas de ADN de hoja de maíz purificadas mediante la columna DNA Clean and Concentrator™, Zymo Research*

Muestra	Concentración	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Ciclo de amplificación
1	51.58	1.89	2.12	23.7130
2	52.46	1.87	1.97	24.3559
3	52.12	1.86	1.97	24.0941
4	52.52	1.84	1.93	24.3690
5	52.72	1.84	1.97	24.3098
6	53.92	1.85	1.92	24.6006
7	52.86	1.84	2.11	23.2705
8	52.02	1.85	1.95	23.1889
9	52.54	1.87	2.06	23.5972
10	51.32	1.87	2.17	23.5203
Media	**52.406**	**1.858**	**2.017**	**23.9019**

Para concentración y pureza n=50; para ciclo de amplificación n=200 repeticiones

6.3. Generación y extracción de ADN del material de referencia positivo

Los resultados de la concentración obtenida de las mezclas del material de referencia positivo se muestran en los cuadros 28 y 29. La concentración de las mezclas demuestran nuevamente el comportamiento establecido en la extracción del material de referencia

negativo. Donde se obtuvo el mayor rendimiento de concentración en las réplicas donde el sobrenadante obtenido después de la lisis celular presentaba un color verde oscuro. Los resultados de concentración más altos se obtuvieron en el porcentaje 10%, se registró un promedio de 1133.45 ng/µL. En el cuadro 28, se muestra cómo disminuyó el promedio de la concentración en las mezclas generadas a partir de la muestra testigo. En la mezcla 1.0%, se obtuvo un promedio de 445.925 ng/µL. Esta mezcla fue generada a partir de 4,500 mg del material de referencia negativo y 500 mg del material de referencia positivo. A partir de este porcentaje, la concentración siguió un comportamiento similar en el resto de las mezclas, ya que cada vez se agregó menor cantidad del material de referencia positivo y mayor cantidad del material de referencia negativo.

Cuadro 28. *Concentración y pureza de ADN extraído del material de referencia positivo. Porcentajes: 10, 1.0 y 0.10%.*

	Material de referencia positivo de hoja OGM (%)								
	10%			**1%**			**0.10%**		
Réplica	Concentración (ng/µL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Concentración (ng/µL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Concentración (ng/µL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
I	1174.4	2.02	1.64	466.4	1.92	1.93	440.8	1.92	1.97
II	1087.5	2	1.68	446.3	1.94	1.83	444.8	1.93	1.95
III	1064.7	2.04	1.77	389.3	1.94	1.7	399.3	1.94	1.83
IV	1207.2	2.01	1.72	481.7	1.94	1.85	454.3	1.93	1.91
Media	**1133.45**	2.0175	1.7025	**445.925**	1.935	1.8275	**434.8**	1.93	1.915
D.E.	68.2005	0.0171	0.0556	40.4376	0.01	0.0954	24.3345	0.0082	0.0619

Cuadro 29*. Concentración y pureza de ADN extraído del material de referencia positivo: 0.5, 0.025 y 0.010%.*

	Material de referencia positivo de hoja OGM (%)								
	0.05%			**0.025%**			**0.010%**		
Réplica	Concentración (ng/µL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Concentración (ng/µL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Concentración (ng/µL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
I	479.5	1.96	1.67	472	1.92	1.96	521.8	1.87	1.87
II	480.1	1.95	1.88	508.4	1.94	1.85	534.6	1.94	1.91
III	480	1.96	1.68	515.6	1.94	1.85	487	1.94	1.96
IV	482.6	1.93	1.93	516.8	1.96	1.87	509.8	1.95	1.88
Media	**480.55**	**1.95**	**1.79**	**503.2**	**1.94**	**1.8825**	**513.3**	**1.925**	**1.905**
D.E.	1.3916	0.0141	0.1344	21.1282	0.0163	0.0525	20.2475	0.0370	0.0404

6.3.1. Purificación de ADN del material de referencia positivo

La mezcla 0.010% estuvo constituida por 4,995 mg del material de referencia negativo y únicamente 5 mg de material de referencia positivo. El valor de la relación A_{260}/A_{280} en todas las mezclas se presentó en valores óptimos (1.9-2.0). Sin embargo, la relación A_{260}/A_{230} presentó valores bajos (1.7-1.9). Estos valores indican la presencia de compuestos como carbohidratos, proteínas, etc. Por lo tanto, se decidió purificar las mezclas, en los cuadros 28 y 29 se muestra el promedio de concentración y pureza de las mezclas purificadas con la columna.

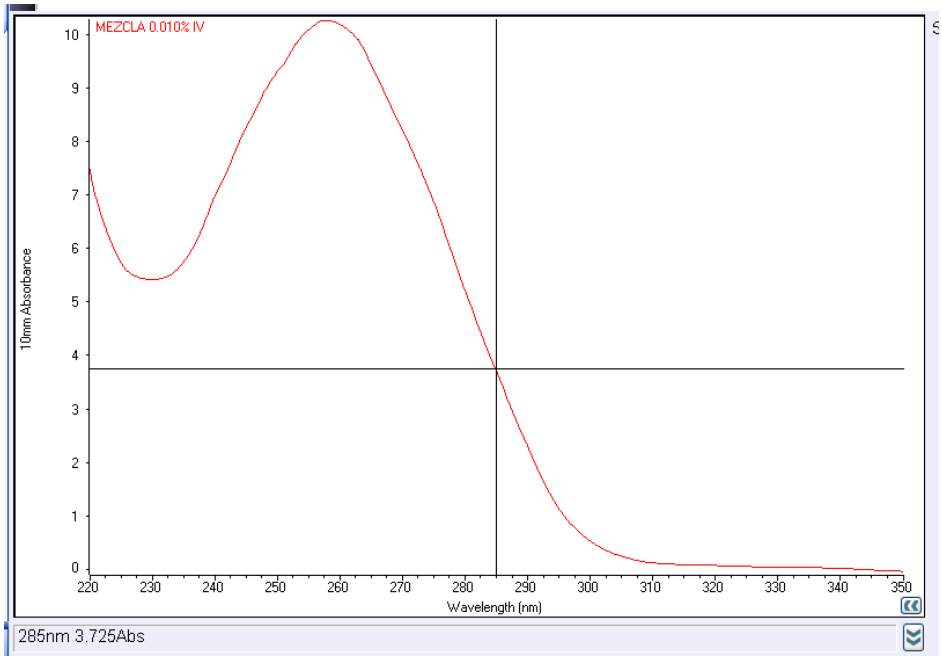

Figura 20. *Imagen de gráfico en espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c donde se evaluó la concentración y pureza para establecer el LOD y el LOQ.*

Cuadro 30. *Concentración y pureza del material de referencia positivo 10, 1 y 0.1% purificadas*

	Material de referencia positivo de hoja OGM (%)								
	10%			**1%**			**0.10%**		
Réplica	Concentración (ng/µL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Concentración (ng/µL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Concentración (ng/µL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
I	118.7	1.92	2.13	103.8	1.88	2.12	84.3	1.92	2.13
II	117	1.95	2.12	117.7	1.87	2.11	98.7	1.89	2.11
III	112.4	1.9	2.08	95.7	1.9	2.08	92.1	1.88	2.17
IV	124.6	1.91	2.18	108.5	1.88	2.2	95.5	1.88	2.17
Promedio	**118.175**	**1.92**	**2.1275**	**106.425**	**1.8825**	**2.1275**	**92.65**	**1.892**	**2.145**
D.E.	5.04273405	0.0216	0.04113	9.18962	0.01258	0.0512	6.18465	0.0189	0.03

Cuadro 31. *Concentración y pureza del material de referencia positivo 0.05, 0.025 y 0.01% purificadas*

	Material de referencia positivo de hoja OGM (%)								
	0.05%			**0.025%**			**0.010%**		
Réplica	Concentración (ng/µL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Concentración (ng/µL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Concentración (ng/µL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
I	95.5	1.92	2.13	96.1	1.88	2.12	95.7	1.92	2.13
II	101.6	1.95	2.12	97.4	1.87	2.11	94.5	1.89	2.11
III	94.5	1.9	2.08	82.6	1.9	2.08	94.5	1.88	2.17
IV	116	1.91	2.18	78.9	1.88	2.2	102	1.88	2.17
Promedio	**101.9**	**1.92**	**2.1275**	**88.75**	**1.8825**	**2.1275**	**96.675**	**1.8925**	**2.145**
D.E.	9.90992768	0.0216	0.04113	9.37532222	0.012583	0.051235	3.59478789	0.01893	0.03

6.4. Límite de detección

6.4.1. Límite de Detección bajo condiciones de repetibilidad

En el cuadro 32 se muestran los resultados promedio del límite de detección bajo las condiciones de repetibilidad, se obtuvieron 64 réplicas de detección para cada porcentaje generado. Se detectó el 100% de las repeticiones del evento DAS-Ø15Ø7-1 en todos los porcentajes. Se compararon las réplicas de los ciclos contra la media de cada porcentaje, en el cuadro 30 se muestra el mínimo, el máximo y el promedio de las mezclas. Se verificó que no existiera una diferencia de +/-0.5 ciclos entre el promedio y las réplicas del evento transgénico. Sin embargo, a partir del porcentaje 0.05% se presentó una diferencia en algunos datos entre el promedio y el máximo de (≥1 ciclo) en todas las diluciones. Por lo tanto, se estableció como LOD práctico 0.1% bajo condiciones de repetibilidad.

Según la fórmula de la PCR, en una dilución 1:2 se espera una diferencia de 3.3 ciclos. Las primeras tres mezclas generadas se realizaron con ese factor de dilución. El promedio del ciclo del evento para el porcentaje 10% fue 25.8882, el porcentaje 1% presentó un valor de 28.8079 y 32.3251 para la mezcla 0.1%. Es decir, entre la primera y segunda muestra existió una diferencia de 2.9 y entre la segunda y tercera 3.5 ciclos. Las últimas tres mezclas se realizaron con una dilución 1:10, partiendo nuevamente con la fórmula de la PCR, se espera una diferencia de un ciclo de diferencia entre una mezcla y la siguiente. La mezcla 0.05% presentó un ciclo de 33.3131, lo cual indica una diferencia de 0.988 ciclos, mientras que la mezcla 0.05 y 0.010 presentaron una diferencia de 1.6 ciclos. Entre las últimas dos mezclas se presentó una diferencia de 0.3662 ciclos. Se realizó el ensayo bajo condiciones de repetibilidad debido a que se requería comparar el grado de concordancia entre

resultados sucesivos e independientes obtenidos por el mismo método empleando un material idéntico bajo las mismas condiciones (aparatos, operadores, laboratorio e intervalos de tiempo cortos) (DSG, 2024). Los 16 valores obtenidos entre cada réplica en las mezclas cumplieron en concordancia entre los resultados del ensayo de LOD bajo condiciones de repetibilidad tal como se indica en el procedimiento MEC-PR-VAL "GUÍA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS".

Cuadro 32. *Límite de detección bajo condiciones de repetibilidad*

Réplica de porcentaje	Mínimo	Máximo	Media	Media de réplicas
10%I evento	25.6035	25.9722	25.8197	25.8882
10%II evento	25.5231	26.2030	25.8671	
10%III evento	25.6654	26.2827	25.9477	
10%IV evento	25.6169	26.1738	25.9184	
1%I I evento	28.4860	29.0218	28.8459	28.8079
1%II I evento	28.5416	28.9907	28.7789	
1%III I evento	28.3713	29.0607	28.7718	
1%IV I evento	28.3875	28.9679	28.8350	
0.1%I evento	32.0834	33.3144	32.6630	32.3251
0.1%II evento	32.1616	32.8790	32.4083	
0.1%III evento	32.0031	33.0323	32.5227	
0.1%IV evento	31.3067	32.4800	31.7065	
0.05%I I evento	**32.2233**	**33.4718**	**32.5753**	33.3131
0.05%II I evento	**32.6530**	**34.1490**	**33.2384**	
0.05%III I evento	33.3292	34.5261	33.8215	
0.05%IV I evento	32.7572	34.7552	33.6171	
0.025%I evento	33.7784	36.4538	34.9008	34.9385
0.025%II evento	33.9393	35.5902	34.6586	
0.025%III evento	34.8665	37.8040	35.5821	
0.025%IV evento	32.8384	36.5284	34.6124	
0.010%I evento	34.5820	36.8583	35.3101	35.3017
0.010%II evento	34.5820	36.8583	35.3101	
0.010%III evento	34.6865	36.9153	35.3064	
0.010%IV evento	33.9164	41.5172	35.2802	

6.4.2. Límite de detección bajo condiciones de reproducibilidad intermedia

En todos los porcentajes se detectó el 100% de las repeticiones del evento DAS-Ø15Ø7-1. Para considerar una muestra positiva se consideró que no existiera una diferencia +/- 0.5 ciclos entre las cuatro réplicas de la amplificación del evento. En el cuadro 33 se presentan los valores obtenidos en el ensayo de LOD bajo condiciones de reproducibilidad intermedia. Este ensayo presentó valores similares a los obtenidos en el LOD bajo condiciones de repetibilidad. Nuevamente, a partir del del porcentaje 0.05% se presentó una diferencia en algunos datos entre el promedio y el mínimo o máximo de (≥1 ciclo) e incluso entre los promedios de las cuatro réplicas de cada porcentaje; este comportamiento se presentó en el resto de las diluciones. Por lo tanto, se estableció como LOD práctico 0.01%.

***Cuadro 33**. Límite de detección bajo condiciones de reproducibilidad intermedia*

Réplica de porcentaje	Mínimo	Máximo	Media	Media de réplicas
10%I evento	25.7008	26.3537	26.0086	26.0150
10%II evento	25.7010	26.1827	25.9982	
10%III evento	25.7679	26.2155	25.9989	
10%IV evento	25.7406	26.3679	26.0542	
1%I I evento	28.5850	29.3081	29.0260	28.9516
1%II I evento	28.4497	29.1959	28.8904	
1%III I evento	28.4998	29.2736	28.9315	
1%IV I evento	28.6649	29.2651	28.9586	
0.1%I evento	32.2976	33.3163	32.7610	32.5031
0.1%II evento	31.9146	33.0516	32.5009	
0.1%III evento	32.3362	33.3616	32.7466	
0.1%IV evento	31.6049	32.2830	32.0039	
0.05%I I evento	32.2447	33.2176	32.6858	33.5184
0.05%II I evento	**32.5436**	**33.9654**	**33.3552**	
0.05%III I evento	**33.4545**	**35.3414**	**34.1632**	
0.05%IV I evento	33.0624	34.7197	**33.8692**	
0.025%I evento	34.1595	37.2429	**35.2934**	35.2504
0.025%II evento	34.3846	36.4769	35.4206	
0.025%III evento	33.5441	35.8340	34.6763	
0.025%IV evento	34.8044	37.7190	35.6115	
0.010%I evento	34.4023	38.5610	35.6528	35.7099
0.010%II evento	34.9316	37.6758	36.0696	
0.010%III evento	34.6955	37.4739	35.7289	
0.010%IV evento	34.5844	36.1178	35.3882	

En las primeras tres mezclas, nuevamente se esperaba una diferencia de 3.3 ciclos. El promedio del ciclo del evento para el porcentaje 10% fue 26.0150, el porcentaje 1% presentó un valor de 28.9516 y 32.5031 para la mezcla 0.1%. Es decir, se presentó una diferencia de 2.9 entre las dos primeras mezclas, mientras que entre la segunda y tercera existieron 3.55 ciclos. En las últimas tres mezclas realizadas con una dilución 1:10, se esperaba una diferencia de un ciclo de diferencia entre una mezcla y la siguiente. La mezcla 0.05% presentó un ciclo de 33.5184, lo cual indica una diferencia de 1.01 ciclos, mientras que la mezcla 0.05 y 0.010 presentaron una diferencia de 1.6 ciclos. Entre las últimas dos mezclas se presentó una diferencia de 0.4595 ciclos. Estos valores comprueban nuevamente el comportamiento de las mezclas obtenido en el ensayo de repetibilidad, debido a que presentaron exactamente las mismas diferencias de ciclos.

6.4.3. Límite de detección bajo condiciones de robustez

Este ensayo se realizó en un equipo de termociclador diferente (LC-480). En el cuadro 34 se muestran los resultados obtenidos para este ensayo. **Sin embargo, a pesar de que se detectó el 100% de amplificaciones, a partir del porcentaje de 0.05% existió una diferencia significativa (≥1.0 ciclos en todas las repeticiones). Los tres

ensayos realizados para establecer el LOD se comportaron de manera similar, las primeras tres mezclas presentaron repetibilidad entre los ciclos de amplificación del gen del evento transgénico DAS-Ø15Ø7-1 en cada uno de los ensayos.

En las primeras tres mezclas se esperaba una diferencia de 3.3 ciclos de diferencia entre una y otra. El ciclo de amplificación del gen del evento para la mezcla 10% fue 27.1344, entre esta mezcla y la siguiente se presentó una diferencia de 3.4 ciclos, entre la mezcla 1% y 0.10% existió una diferencia de 2.8 ciclos. En las últimas tres mezclas se esperaba una diferencia de un ciclo de diferencia, entre la mezcla 0.05% y 0.01% se presentó una diferencia de 2.5 ciclos; finalmente las últimas dos mezclas presentaron una diferencia de 0.9 ciclos. Estos datos indica una diferencia comparados contra los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad intermedia, específicamente entre las últimas cuatro mezclas. Donde, en los ensayos anteriores los valores fueron 1.6 y aproximadamente 0.4 ciclos. En el equipo de termociclador LC-480 aumentaron notablemente las diferencias.

La robustez es definida como la capacidad de un proceso analítico de no ser afectado por variaciones deliberadas de las condiciones del método, en este sentido el objetivo de la prueba de robustez es optimizar el método analítico desarrollado o implementado por el laboratorio, y describir en qué condiciones analíticas (incluidas sus tolerancias), se pueden obtener resultados confiables. Una de las pruebas para evaluar la robustez es con base en la prueba de robustez de Youden y Steiner (Bedregal *et al.,* 2007). Sin embargo, en el MEC-PR-GVM "GUÍA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS" (DSG, 2024) se establece que el laboratorio puede utilizar cualquier método siempre y cuando esté plasmado en su protocolo de informe de validación. Adicionalmente, se sugiere que la robustez no deberá ser empleada como un alcance al método de rutina.

En el presente estudio el ensayo de robustez se evaluó mediante la variabilidad de instrumentos y equipo, se llevó a cabo en el equipo LightCycler1 480® (bloque de 384 pozos). Un estudio realizado por Watanabe y colaboradores (2021) ejemplifican que durante la detección de SARS-Cov-2 en Japón, el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas recomendaban el uso del LightCycler1 480®, reportan que a pesar de ser un equipo que se reducía el tiempo de proceso, las operaciones medición son complejas y requieren personal con la competencia pertinente. El empleo de este equipo optimiza el tiempo de proceso lo cual lo hace eficiente cuando se requieren analizar diversas muestras en un periodo corto, sin embargo, no en todos los laboratorios es posible su uso debido a que su manipulación es complicada, reto que se logró superar en este trabajo ya que todos los resultados cumplieron con los criterios de aceptación de la Unión Europea.

Cuadro 34. *Límite de detección bajo condiciones de robustez*

Réplica de porcentaje	Mínimo	Máximo	Media	Media de réplicas
10%I evento	26.7400	27.2400	27.0244	27.1344
10%II evento	26.9100	27.2700	27.1169	
10%III evento	26.9400	27.4900	27.1875	
10%IV evento	26.9700	27.4400	27.2088	
1%I I evento	30.4900	30.8900	30.6125	30.6113
1%II I evento	30.2500	30.9400	30.6019	
1%III I evento	30.0700	30.8900	30.6150	
1%IV I evento	30.2600	30.8500	30.6156	
0.1%I evento	32.8300	33.9400	33.4244	33.4694
0.1%II evento	32.9900	34.0800	33.5044	
0.1%III evento	33.0000	33.7500	33.4888	
0.1%IV evento	33.1300	33.8400	33.4600	
0.05%I I evento	33.4400	34.3000	33.7631	34.5152
0.05%II I evento	33.9200	34.7700	34.4275	
0.05%III I evento	**34.6100**	**35.7400**	**35.0663**	
0.05%IV I evento	**31.2200**	**35.8000**	**34.8038**	
0.025%I evento	35.7500	36.8400	36.3750	37.0536
0.025%II evento	36.6300	38.1900	37.3981	
0.025%III evento	35.6300	37.4700	37.0169	
0.025%IV evento	36.7900	38.7500	37.4244	
0.010%I evento	36.6200	38.7700	37.6550	37.9819
0.010%II evento	37.6200	40.0000	39.0906	
0.010%III evento	36.6900	39.4900	37.7131	
0.010%IV evento	36.6600	39.0900	37.4688	

6.4.4. Análisis general del LOD

Específicamente en lo que respecta al límite de detección el criterio de aceptación establecido en el laboratorio indica que debe ser igual o mayor al 95% de la amplificación del gen de interés. Es decir, se debe presentar la amplificación del analito de interés en al menos el 95% de los datos. En los ensayos de LOD bajo repetibilidad, reproducibilidad intermedia y robustez se presentó el 100% de la amplificación para el evento DAS-Ø15Ø7-1 en todos los porcentajes de las mezclas. Sin embargo, no se cumplió para todas las mezclas el criterio de diferencia de 0.5 ciclos entre el mínimo y máximo de las réplicas de cada mezcla.

Con base en los resultados anteriores (cuadros 32, 33 y 34), la detección del evento DAS-Ø15Ø7-1, se comportó de manera similar en ambos equipos de termociclado entre las primeras tres mezclas. Sin embargo, existió diferencia significativa en todos los porcentajes de las mezclas generadas. Los ensayos y mediciones dentro de un laboratorio requieren de patrones de medición reproducibles y los resultados siempre se encuentran sujetas a cierta incertidumbre, de acuerdo con la norma ISO/IEC 17025:2006, se establece que todo laboratorio de calibración o ensayo debe tener procedimientos de control de calidad para realizar el seguimiento de la validez de los ensayos (Delgado *et al.,* 2019; Portuondo y Portuondo, 2010).

Se puede determinar el límite de detección teórico a través de la cuantificación de blancos de matriz mediante una curva de calibración del analito; esta determinación sirve como referencia de partida para conocer la concentración candidata del límite de detección. Dicha concentración candidata debe ser comprobada experimentalmente, en caso de que no cumpla con los criterios de aceptación, se deben probar otras concentraciones menores al límite de cuantificación.

Los datos obtenidos para el LOD mediante repetibilidad y reproducibilidad presentaron un comportamiento similar, adicionalmente se registró la variabilidad de mediciones de instrumentos (robustez) (cuadro 34), donde cumplieron los criterios establecidos bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad. Se estableció como el LOD práctico 0.01%, puesto que en este porcentaje el 100% de los datos obtenidos cumplieron con los criterios de aceptación del laboratorio. Si se retoman las regulaciones establecidas por la Unión Europea, donde a partir del 0.9% los productos deben llevar etiquetado, se cumple por debajo del 10% el LOD establecido en este proyecto.

6.5. Límite de cuantificación

6.5.1. Límite de Detección bajo condiciones de repetibilidad

En el cuadro 35 se muestran los datos obtenidos del LOQ bajo condiciones de repetibilidad, que se realizó en el termociclador QuantStudio 6 Pro®, se obtuvieron 64 datos de ciclo de amplificación del gen de referencia *HMG-A* para cada porcentaje (10, 1.0 y 0.1%). Por otra parte, el software del equipo arroja un porcentaje de concentración que se obtiene a partir de la curva estándar. Cuando se realiza una dilución 1: 10, quedando las concentraciones de los puntos de la curva estándar en 10, 1.0 y 0.1%, se espera una diferencia aproximadamente de 3.3 ciclos de diferencia del elemento de interés (el evento transgénico). El promedio del ciclo de amplificación del evento para el porcentaje 10% presentó un valor de 25.776, para 1.0 se presentó en 28.943, donde existieron 3.1 ciclos de diferencia; para el último porcentaje 0.1% existieron 3.254 ciclos de diferencia con respecto a la dilución anterior. Estos datos indican que las mezclas se generaron de manera correcta puesto que cumplen con los ciclos de diferencia para cada dilución.

Sin embargo, el ciclo de amplificación del evento del gen de referencia *HMG-A* siempre se presentó antes en las mezclas realizadas con hoja que en la curva estándar realizada con el MRC 1529. Para el primer porcentaje (10%), el LOQ práctico arrojó un valor de 8.8560% y presentó una desviación estándar de 0.4891. Lo que significa que no se logró empatar el ciclo de amplificación del gen de referencia con el ciclo de amplificación del transgén. En el porcentaje 1.0%, se logró comportar de mejor manera el ciclo de amplificación del gen de referencia contra el

ciclo del evento. Donde se presentó un ciclo promedio de amplificación de 23.980 para el gen de referencia y una desviación estándar de 0.3054 para el evento; es decir, disminuyó a comparación de la primera mezcla. Finalmente, en el porcentaje 0.1%, el promedio del ciclo de amplificación del gen de referencia resultó en 24.08 con una desviación estándar de 0.0982. La cuantificación corresponde a la interpolación de los porcentajes generados dentro de los puntos de la curva estándar, esto con base en el cociente de las secuencias para DAS-Ø15Ø7-1 *HMG-A* multiplicado por cien (Hougs *et al*., 2017; DSG, 2022). En el cuadro 35, se muestran los resultados experimentales en la que se establece el 0.1% como el límite de cuantificación bajo condiciones de repetibilidad.

6.5.2. Límite de cuantificación bajo condiciones de reproducibilidad intermedia

En el cuadro 36 se presentan los resultados del LOQ práctico bajo reproducibilidad intermedia. Los ciclos de amplificación del evento transgénico para la dilución 1: 10 de la curva estándar en los puntos 10, 1.0 y 0.1% presentaron los siguientes valores 26.126, 29.021 y 32.491 respectivamente. El ciclo de amplificación del gen de referencia *HMG-A* se mantuvo en los mismos ciclos que en el ensayo de repetibilidad, con 22.950 para la mezcla 10%, 23.592 para 1.0% y 24.022 para 0.1%. Los datos obtenidos presentan un comportamiento similar al ensayo del LOQ práctico bajo condiciones de repetibilidad, lo que indica que el ADN extraído de las mezclas generadas mantiene su pureza incluso con días de diferencia de presentar el ensayo. Nuevamente, se observa que el gen de referencia amplificó antes en las muestras que en el MRC 1529.

6.5.3. Límite de cuantificación bajo condiciones de robustez

Este ensayo fue realizado en el equipo LightCycler 480® para evaluar la diferencia de ciclos que existe cuando las muestras son tratadas con otro equipo de termociclador. Los resultados (cuadro 37) mostraron aproximadamente un ciclo de diferencia frente a los resultados obtenidos con el equipo QuantStudio 6 Pro. Se registró un ciclo promedio para el gen de referencia *HMG-A* de 24.548 para 10%, 25.169 para 1.0% y 25.564 para 0.1%. El porcentaje del LOQ práctico bajo condiciones de robustez presentó un porcentaje menor para la primera mezcla (7.2430%), por otro lado, los porcentajes de la segunda (1.0%) y tercera mezcla (0.1%) obtuvieron valores más cercanos al LOQ teórico, registrado 1.2529% y 0.1765% respectivamente.

Cuadro 35. *Límite de Cuantificación bajo condiciones de repetibilidad*

Réplica	**Material de referencia de hoja OGM (%)**											
	10%				**1%**				**0.10%**			
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4
I	8.74847	9.8035	7.777	8.53598	2.11982	2.03939	2.10331	1.64133	0.11593	0.22192	0.4041	0.36607
II	8.86285	9.2406	8.5428	8.75602	2.32154	2.40539	2.23975	1.9209	0.20069	0.23286	0.3711	0.45502
III	9.06638	9.5727	8.624	8.69984	2.67456	2.49245	2.5951	2.20653	0.31919	0.27327	0.3891	0.46378
IV	9.27935	8.8908	8.2082	9.08914	2.80395	2.56919	2.61936	2.55882	0.2728	0.27166	0.3542	0.4562
Promedio	**8.98926**	**9.3769**	**8.288**	**8.77024**	**2.47997**	**2.3766**	**2.38938**	**2.0819**	**0.22715**	**0.24993**	**0.3796**	**0.43527**
D.E.	**0.23386**	**0.398**	**0.3853**	**0.23219**	**0.31498**	**0.23455**	**0.25783**	**0.39286**	**0.08874**	**0.02641**	**0.0217**	**0.0463**

Cuadro 36. *Límite de Cuantificación bajo condiciones de reproducibilidad intermedia*

Réplica	**Material de referencia de hoja OGM (%)**											
	10%				**1%**				**0.10%**			
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4
I	11.1168	12.428	12.517	12.2214	2.06969	2.35322	1.97379	2.16352	0.19702	0.26788	0.236	0.37301
II	11.9136	12.678	11.919	12.6132	2.12664	2.31829	2.23699	2.16875	0.14669	0.27986	0.245	0.42103
III	11.8614	11.356	11.501	12.5483	2.24257	2.48474	2.28472	2.2949	0.16326	0.22168	0.2685	0.35308
IV	11.2768	13.336	12.661	12.4308	2.33743	2.71357	2.43924	2.47262	0.21785	0.30346	0.2472	0.34574
Promedio	**11.5421**	**12.449**	**12.15**	**12.4534**	**2.19408**	**2.46746**	**2.23369**	**2.27495**	**0.18121**	**0.26822**	**0.2491**	**0.37322**
D.E.	**0.40466**	**0.8235**	**0.5385**	**0.17212**	**0.11961**	**0.17904**	**0.19357**	**0.1451**	**0.03218**	**0.03437**	**0.0138**	**0.0339**

Cuadro 37. Límite de Cuantificación bajo condiciones de robustez

Réplica	Material de referencia de hoja OGM (%)											
	10%				**1%**				**0.10%**			
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4
I	9.49891	8.3836	8.5481	8.28904	1.30427	1.52953	1.4228	1.32767	0.10584	0.16549	0.1865	0.1669
II	9.45534	7.7802	6.0604	7.39203	1.20394	1.55729	1.22874	1.14927	0.13362	0.1635	0.2398	0.27963
III	4.95861	7.403	6.9821	6.97674	1.35184	1.25442	1.44181	1.22087	0.24191	0.32795	0.1159	0.15456
IV	6.25817	6.1142	5.7977	5.99003	0.97068	1.07042	0.97696	1.03641	0.14243	0.15419	0.1132	0.13284
Promedio	**7.54276**	**7.4203**	**6.8471**	**7.16196**	**1.20768**	**1.35292**	**1.26758**	**1.18356**	**0.15595**	**0.20278**	**0.1639**	**0.18348**
D.E.	**2.29583**	**0.9598**	**1.2426**	**0.95411**	**0.1696**	**0.23272**	**0.21635**	**0.12246**	**0.05939**	**0.08359**	**0.0609**	**0.06563**

6.5.4. Análisis general del Límite de cuantificación

El LOQ práctico no coincidió con los valores establecidos en el LOQ teórico, el comportamiento de los ciclos de amplificación presentó diferencias para ambos equipos de termociclador. La concentración y los ciclos de amplificación presentaron comportamiento similar en el ensayo del LOQ bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad. Sin embargo, la concentración obtenida a partir de las mezclas presentó valores diferentes en los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad comparados con el ensayo de robustez.

En un estudio realizado por Hoebeeck y colaboradores (2007) en donde emplearon el equipo de termociclado LightCycler 480® para la detección de genes con series estándar de soluciones equimolares (concentraciones muy bajas) realizaron un ensayo con eficiencia casi perfecta, explican que una fuente de variación que a menudo se subestima es el propio instrumento de termociclado, dando a conocer que además del control de calidad de la placa y del ensayo, el rendimiento del instrumento también puede afectar el resultado de la cuantificación. Se encargaron de evaluar la homogeneidad de los resultados contra otros instrumentos basados en bloques (datos no mostrados). Finalmente, concluyeron que sus resultados demostraron una alta reproducibilidad de las reacciones replicadas, lo que se asocia al hecho de que el equipo pudo detectar de manera confiable una diferencia muy pequeña entre las moléculas. Argumentaron que su experimento abría la posibilidad de detectar mediante este equipo diferencias sutiles en los ácidos nucleicos.

En 2012, Przybylski *et al.,* compararon dos equipos de termociclado de bloque de Roche, LightCycler 2.0® y LightCycler 480®. En ambos equipos se obtiene el valor del Cp (*Cross point*, por sus siglas en inglés). En su estudio, observaron un umbral de 1.5-1.8 ciclos en ventaja del LightCycler 480®. Explicaron esta diferencia debido a los diferentes sistemas de excitación y detección de fluorescencia utilizados en ambos analizadores. El sistema de excitación en el termociclador LightCycler 2.0® se basa en un diodo LED con un fotomultiplicador como elemento de medición, mientras que en el instrumento LightCycler 480® la excitación se consigue mediante una lámpara de xenón, y la fluorescencia se mide con una cámara CCD sensible.

En el presente estudio se realizó la amplificación en dos equipos de termociclado de bloque, mientras que en el equipo LightCycler 480®, las concentraciones de las muestras se extrapolan a partir de una curva estándar creada con muestras estándar a lo largo de un gradiente de concentración con valores de concentración específicos asignados. Utiliza el *Cross point* (Cp) para determinar las concentraciones de muestras desconocidas a partir de una curva estándar aplicando un método de segunda derivada (Roche Diagnostics, 2005; Roche Diagnostics, 2010, QUIAGEN,

Roche y SYBR; 2012). Por otro lado, el equipo QuantStudio 6 Pro registra el *threshold cycle* (Ct), el gráfico de amplificación se establece a partir de los datos de fluorescencia recogidos durante la etapa de extensión, el software utiliza la línea base y el umbral para calcular el ciclo umbral (Ct) (Thermo Fisher Scientific, 2024).

Verginelli y colaboradores (2023) reportan un estudio muy completo donde comparan cuatro métodos de extracción y establecen el límite de detección y cuantificación de distintas matrices (maíz, soya, arroz y algodón). En el estudio extrajeron ADN de muestras comunes y de materiales de referencia certificados de cada matriz. En cuanto a rendimiento, el método que obtuvo mejores resultados en la extracción de ADN a partir de hojas de maíz fue Maxwell, seguido de CTAB. A pesar de que la extracción registró valores de concentración con diferencia significativa tanto en la extracción de hojas y el MRC MON810 2%, la pureza del material de referencia registró valores muy similares, caso contrario, del ADN extraído en muestras comunes de hojas. En cuanto al LOD y LOQ prácticos señalan similitud para todos los métodos de extracción aplicados a la misma matriz, con excepción de las hojas de maíz y galletas de maíz.

Datos similares se registraron en este proyecto, obtener ADN con alto rendimiento y buena calidad representa un reto, específicamente cuando se trabaja con muestras provenientes de materiales fibrosos como semillas y hojas. Todos los compuestos químicos presentes en este tipo de tejidos y estructuras vegetales crean un alto grado de variabilidad que puede resultar en que ciertos métodos de extracción funcionen muy bien en hoja, otros en semilla. Sin embargo, el reto más grande se encuentra en el momento de establecer el LOD y el LOQ. Los Materiales de Referencia Certificados (MRC) para OGM juegan un rol muy importante para garantizar la comparabilidad y trazabilidad de los resultados de detección y cuantificación obtenidos (Li *et al.,* 2015). Los resultados de medición obtenidos a través de un ensayo de PCR en tiempo real son obtenidos a partir de un material de referencia certificado (MRC), y se expresan en la unidad de medida en la que el material de referencia está certificado (Corbisier *et al.,* 2022).

Los resultados mostraron lo ocurrido en otros estudios (Ahmed, 2004; Shookere *et al.,* 2009), en donde se presentó un desfase en el ciclo de amplificación en el MRC versus la muestra. Esto pudo deberse a diferentes factores, el primero es que en los materiales de referencia certificados la homogeneidad está garantizada por dos procesos de molienda (JRC, 2024); sin embargo, en el presente estudio se realizó el material de referencia interno a partir de tejido de hoja, donde se agregó otro factor relevante, la "humedad" de las muestras. De esta manera, cuando se homogeneizaron a pesar de que el tamaño de partícula fue el más fino que se pudo obtener, las partículas de hojas se adherían a la pared del recipiente; situación que no sucede cuando se trabaja con harina ya que al retirar la estática se logra

homogeneizar de manera perfecta. Otro factor para tomar en cuenta son las características fisicoquímicas del MRC y la muestra.

Estos contratiempos se pueden solucionar de diferentes formas, estandarizar métodos de extracción precisos que permitan obtener ADN de alta cantidad y calidad en diferentes estructuras y matrices vegetales, es decir; estandarizar métodos específicos para hoja y métodos específicos para harina. Sin embargo, no siempre suele funcionar de esta manera, ya que como se observó los ciclos de amplificación del gen de referencia *HMG-A* de las muestras de hoja siempre se presentaron en ciclos más tempranos que el primer punto de la curva, incluso cuando se extrajo el ADN con métodos diferentes. Una de las formas más eficaces de enfrentar estos fenómenos sería la generación de materiales de referencia en hoja. No obstante, esto representa un gran reto. En la actualidad, tanto el Instituto de Materiales y Medidas de Referencia (IRMM) de la Unión Europea, así como la American Oil Chemist' Society (AOCS) producen y venden MR en todo el mundo (Li *et al.,* 2015). A nivel nacional, el CENAM es el encargado de producir MRC, hasta este momento no se presenta ningún MRC en hoja.

7. Conclusiones

Se logró la optimización del mejor método de extracción de ADN proveniente de hoja y harina de maíz a partir de la evaluación de tres métodos de extracción.

El método de extracción optimizado permitió obtener ADN de alta concentración, de pureza adecuada, con el menor ciclo de amplificación del gen de referencia HMG-A, menor tiempo de proceso y la menor cantidad de residuos químico-peligrosos tanto para el medio ambiente como para salud de los analistas.

Se logró la seleccionar el gen de referencia HMG-A como el gen con el menor ciclo de amplificación a partir de la evaluación tres genes de referencia mediante su amplificación en PCR tiempo real.

Se logró establecer las características para desarrollar un material de referencia interno negativo y otro positivo al evento transgénico DAS1-1507, ambos de hoja de maíz del Departamento de Análisis Moleculares y Nuevas Tecnologías.

Se logro establecer el Límite de Detección práctico 0.010% bajo condiciones de repetibilidad, reproducibilidad intermedia y robustez del evento DAS-Ø15Ø7-1.

Se estableció el Límite de Cuantificación práctico bajo condiciones de repetibilidad, reproducibilidad intermedia y robustez. Sin embargo, el LOQ teórico no coincidió con el LOQ práctico.

Se estableció como el límite de detección práctico 0.05% para el material de referencia interno desarrollado. El límite de cuantificación práctico y teórico bajo condiciones de repetibilidad, reproducibilidad intermedia y robustez no se comportó de acuerdo con el límite de cuantificación teórico.

8. Literatura citada

1. Abdel-Latif, A., y Osman, G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. Plant Methods, 13(1). https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4
2. Acosta Chinchilla, J. M., Acosta Rodriguez, G. A., y Arias, J. P. (2021). Estandarización del proceso de extracción de aceite de Mauritia flexuosa del Guaviare, Colombia. Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales, 8(2), 80–92. https://doi.org/10.23850/24220582.3249
3. Acosta, R., y Acosta, M. C. R. (2009). Reseña el cultivo del Maíz, su origen y clasificación. El Maíz en Cuba. In Cultivos Tropicales (Vol. 30, Issue 2), 113-120.
4. Acuña Balbuena, A. B., Nuñez Giménez, M. C., Ortiz, N., Santander Díaz, L., Coronel Cristaldo, R. de las N., Cardozo, L., Torres Nunes, A. G., Duarte, C., Rojas, M., Quiñonez Álvarez, L. C., Benítez Rodas, G. A., Fernández Ríos, D., y Arrúa, A. A. (2023). Comparación de dos métodos para la evaluación de la calidad del ADN obtenido mediante la técnica del CTAB para muestras de plantas medicinales de Paraguay. Revista Sobre Estudios e Investigaciones Del Saber Académico, 17(17), 1–8.
5. Agilent. (2024). *Estándares analíticos, materiales de referencia estándar/certificados | Agilent*. https://www.agilent.com/en/product/chemical-standards
6. Ahmed, F. E. (2004). Testing of genetically modified organisms in foods. New York, London, Oxford: Food Products Press, The Haworth Press, Inc.
7. Alcaide, M., Cheung, M., Hillman, J., Rassekh, S. R., Deyell, R. J., Batist, G., Karsan, A., Wyatt, A. W., Johnson, N., Scott, D.W., y Morin, R. D. (2020). Evaluating the quantity, quality and size distribution of cell-free DNA by multiplex droplet digital PCR. Scientific Reports, 10(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-69432-x
8. Ali, Q., Salisu, I. B., Raza, A., Shahid, A. A., Rao, A. Q., y Husnain, T. (2019). A modified protocol for rapid DNA isolation from cotton (Gossypium spp.). MethodsX, 6, 259–264. https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.01.010
9. Álvarez-Buylla, E. (2018). *Información Histórica sobre Actividades de Monitoreo*. Información Histórica Sobre Actividades de Monitoreo. https://conahcyt.mx/cibiogem/index.php/info-monitoreo.
10. Ávila, M., Moratinos, H., Flores, Z., Querales, P., Hernández, A., Jiménez, J., Peñaloza, M., Romero, M., González-Vera, A., Méndez, N., y Pérez, O. (2017). Confiabilidad en ensayos de calidad física y fisiológica de semilla de soya en Venezuela. Revista de La Facultad de Agronoamía, Marzo. Edición Especial.
11. AOCS. (2024). *Certified Reference Materials (CRMs)*. https://www.aocs.org/technical-products/certified-reference-materials-crms/. Recuperado el 12 de Diciembre de 2024.
12. Arias, V. F. (2019). Impacto de los tratamientos con microondas o ultrasonidos sobre las fracciones de pseudocereales y Maíz. Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid.
13. Bánkuti, B., Tudós, Z., Szathmary, S., Stipkovits, L., Sipos-Kozma, Z., Ásványi, B., Józsa, Á., Rajčáni, J., Szenthe, K., y Bánáti, F. (2020). CompaMolerison of Economically Favourable and Further Development Friendly DNA Isolation Methods from Microbial Cultures. Advances in Microbiology, 10(01), 1–13. https://doi.org/10.4236/aim.2020.101001

14. Barrera-Guzmán, L. A., Legaria-Solano, J. P., y Ortega-Paczka, R. (2020). Diversidad genética en poblaciones de razas mexicanas de Maíz. Revista Fiteotecnia Mexicana, 43(1), 121–125.
15. Bayer. (2024). Biotecnología - Asuntos Científicos Bayer Crop Science. https://aclatam.cropscience.bayer.com/areas-de-investigacion/biotecnologia/
16. BCH. (2019). DAS-Ø15Ø7-1 BCH. In Living Modified Organism (LMO). Convention on Biological Diversity. https://bch.cbd.int/en/database/record?documentID=14841
17. BCH. (2023). Convention on Biological Diversity. *The Cartagena Protocol on Biosafety*. https://bch.cbd.int/protocol.
18. BCH. (2024). Convention on Biological Diversity. *The Cartagena Protocol on Biosafety*. https://bch.cbd.int/protocol/cpb_art15.shtml
19. Bedregal, P., Torres, B., Ubillús, M., & Mendoza, P. (2007). *Aplicación de la prueba de Youden y Steiner para la evaluación de la robustez en el análisis por activación neutrónica instrumental: Reporte final*.
20. Bogožalec Košir, A., Muller, S., Žel, J., Milavec, M., Mallory, A. C., y Dobnik, D. (2023). Fast and Accurate Multiplex Identification and Quantification of Seven Genetically Modified Soybean Lines Using Six-Color Digital PCR. Foods, 12(22). https://doi.org/10.3390/foods12224156
21. Bohle, F., Schneider, R., Mundorf, J., Zühl, L., Simon, S., y Engelhard, M. (2024). Where does the EU-path on new genomic techniques lead us? Frontiers in Genome Editing, 6. https://doi.org/10.3389/fgeed.2024.1377117
22. Bone Aquino, A. J. (2023). Diagnóstico y estudio de la eficiencia en los procesos de calidad del análisis de orina.
23. Cadet-Díaz, S., y Guerrero-Escobar, S. (2018). Factores que determinan los rendimientos de la producción de maíz en México: evidencia del censoagropecuario 2007. Agricultura, Sociedad y Desarrollo, 15(3), 311–3g37.
24. Carson, S. M. B. M. A. I. (2024). Section 2. Novel technologies in food production. In *Back to the future* (pp. 80–J86). Brill|Wageningen Academic 2024. https://doi.org/10.3920/978-90-0471-550-9_10
25. Carvajal Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: Formación, función y estrés oxidativo. Revista Medcina Legal de Costa Rica, 36(1), 91–100.
26. Carvajal, P., Ureña, H., Umaña, J., Sancho, C., Solano, F., Arleo, M., Martínez, C., y Umaña, R. (2017). Detección molecular de secuencias de ADN transgénico en alimentos de consumo humano y animal en Costa Rica. Agronomía Costarrices , 41(1), 53–68.
27. Castillo Reyes, F., García Villanueva, P. A., Gómez Martínez, M., y Reyes Valdés, H. M. (2004). Comparación de Tres Métodos para el Aislamiento de ADN en Girasol. Revista Agraria, 1(2), 24–28.
28. Centro Nacional de Metrología | Gobierno | gob.mx. (2025). https://www.gob.mx/cenam
29. Cevallos, C. (2020). Monitoreo y análisis de las hojas de las plantas de jitomate a partir de un sistema de visión, un algoritmo supervisado y un sistema de control semiautomático.
30. Chakraborty, S., Saha, A., y Neelavar Ananthram, A. (2020). Comparison of DNA extraction methods for non-marine molluscs: is modified CTAB DNA extraction method

more efficient than DNA extraction kits? 3 Biotech, 10(2). https://doi.org/10.1007/s13205-020-2051-7

31. Chambergo Zúñiga, K. (2021). Variabilidad fenotípica de maíz amiláceo (Zea mays L.). Universidad Nacional del Centro de Perú. Facultad de Agronomía. El Mantero, Jauja.
32. Chen, X., Li, K., Ji, Y., Zhang, Z., Qi, X., Lu, L., Wang, X., Peng, C., Wang, M., Xu, J., y Li, L. (2024). Development of DNA Reference Materials of Citrus Huanglongbing Candidatus Liberibacter asiaticus. ACS Agricultural Science and Technology, 4(4), 500–506. https://doi.org/10.1021/acsagscitech.4c00001
33. ChileBIO. (2024). Genómica. https://chilebio.cl/genomica/
34. CIMMYT y IDP. (2021, Septiembre 27). Hechos de maíz. Divulgación CIMMYT. https://idp.cimmyt.org/hechos-de-maiz/
35. CONABIO. (2022, April 27). Razas de maíz de México | Biodiversidad Mexicana. https://biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices/razas-de-maiz
36. Corbisier, P., Buttinger, G., Savini, C., Sacco, M. G., Gatto, F., y Emons, H. (2022). Expression of GM content in mass fraction from digital PCR data. Food Control, 133. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108626
37. Crop Trust. (2022). Maize. Retrieved October 11, 2022, from https://www.croptrust.org/pgrfa-hub/crops-countries-and-genebanks/crops/maize/
38. Dairawan, M., y Shetty, P. J. (2020). The Evolution of DNA Extraction Methods. American Journal of Biomedical Science y Research, 8(1), 39–45. https://doi.org/10.34297/ajbsr.2020.08.001234
39. Delgado, S. M., Cabrera, M., y Pérez, G. (2019). Análisis para la implementación del sistema de gestión ambiental para el laboratorio Instrumental de la Escuela Politécnica Nacional. Revista Politécnica, 42(2).
40. Delgado-Valerio, P., Ramón-Amado, A., Piñeyro-Nelson, A., Álvarez-Buylla, E. R., Ayala-Angulo, N. M., y Molina-Sánchez, A. (2022). PRESENCE OF TRANSGENIC SEQUENCES IN TORTILLA DOUGH FROM URBAN AND RURAL COMMUNITIES OF THE MESETA PURÉPECHA, MICHOACÁN, MEXICO. Revista Fitotecnia Mexicana, 45(3), 283–292. https://doi.org/10.35196/rfm.2022.3.283
41. Demeke, T., Lee, S. J., y Eng, M. (2022). Increasing the Efficiency of Canola and Soybean GMO Detection and Quantification Using Multiplex Droplet Digital PCR. Biology, 11(2). https://doi.org/10.3390/biology11020201
42. Diario Oficial de la Federación. (2009, Marzo 6). Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. https://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/html/wo88414.html
43. Ding, H. C., Tang, L. C., Gao, D. H., y Yan, X. H. (2023). The involvement of an HMG-box gene in germ cell genesis in Pyropia haitanensis. Algal Research, 70. https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.102978
44. El Conhacyt a favor del mantenimiento de la suspensión a la siembra de maíz transgénico en México, (2021).
45. El país. (2025, Febrero). *México prohíbe el cultivo de maíz transgénico | Economía | EL PAÍS México*. Noticia En Periódico Electrónico. https://elpais.com/mexico/economia/2025-02-26/mexico-prohibe-el-cultivo-de-maiz-transgenico.html

46. Eugster, A., Murmann, P., Kaenzig, A., y Breitenmoser, A. (2014). Development and validation of a P-35S, T-nos, T-35S and P-FMV tetraplex real-time PCR screening method to detect regulatory genes of genetically modified organisms in food. Chimia, 68(10), 701–704. https://doi.org/10.2533/chimia.2014.701
47. Eyhérabide, G. H., y Totis de Zeljkovich, L. E. (2012). Requerimientos agroclimáticos del cultivo de maíz. In Bases para el Manejo del Cultivo de Maíz Manejo del Cultivo de Maíz (pp. 9–22). INTA.
48. EUR-Lex. (2016, Abril 12). *Organismos modificados genéticamente: identificadores únicos*. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=LEGISSUM:l21120&frontOfficeSuffix=%2F. Recuperado 12-12-2024.
49. FAGRON. (2014). Ficha técnica de Sodium lauroyl sarcosinate. Número de versión 6.
50. FAO (2014). El cultivo del Maíz Cholero y Dulce www.fao.org/docrep/t0395s/
51. FAO. (2016). Ahorrar para crecer en la Práctica: maíz, arroz, trigo. In S. Pandey (Ed.), Guía para la producción sostenible de cereales (1st ed.).
52. FAO. (2017). La alimentación y la agricultura. In Organizacion de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. http://www.fao.org/3/i7454s/i7454s.pdf
53. FAO. (2022, Abril 8). FAO GIEWS Country Brief on Mexico. Global Information and Early Warning System. https://www.fao.org/giews/countrybrief/country.jsp?code=MEX
54. FAO. (2024, June 3). FAO GIEWS Country Brief on Mexico. https://www.fao.org/giews/countrybrief/country.jsp?code=MEX
55. Feix, G., y Quayle, T. (1993). Structure and Expression of Zein Genes of Maize. Critical Reviews in Plant Sciences, 12(1–2), 111–127. https://doi.org/10.1080/07352689309382358
56. Fernández Campos, M., Silva, D., y Debat, M. (2012). Análisis de transgénesis mediante PCR de 20 harinas de maíz (polentas) que se encuentran a la venta en el mercado uruguato. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 13(1), 92–104. http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81324433012
57. Fu, W., Wang, C., Zhu, P., Xu, W., Li, X., y Zhu, S. (2020). A universal analytical approach for screening and monitoring of authorized and unauthorized GMOs. LWT, 125. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109176
58. Fundación Antama. (2024, Enero 18). *Los cultivos MG alcanzaron un nuevo récord de superficie sembrada con más de 206 millones de hectáreas en 2023*. https://fundacion-antama.org/los-cultivos-mg-alcanzaron-un-nuevo-record-de-superficie-sembrada-con-mas-de-206-millones-de-hectareas-en-2023/
59. González Merino, A., y Ávila Castañeda, J. F. (2014). El maíz en Estados Unidos y en México. Hegemonía en la producción de un cultivo. Argumentos, 75, 215–237.
60. Gupta, P., Salava, H., Sreelakshmi, Y., y Sharma, R. (2020). A low-cost high-Troughput method for plant genomic DNA isolation. In L. M. Vaschetto (Ed.), Cereal Genomics Methods and Protocols Methods in Molecular Biology (pp. 1–8). Springer Protocols. http://www.springer.com/series/7651
61. Gutiérrez-Angoa, L. E., Castillo-Durán, L. C., Gómez-Castelo, B. E., y Acatzi-Silva, A. I. (2015). Cuantificación de maíz genéticamente modificado mediante las técnicas de qPCR y dPCR. AGROCIENCIA, 49, 373–394.

62. Han, X., Zhou, B., & Xu, W. (2023). Transcriptome analysis revealed sh2 gene mutation leads reduced zein protein accumulation in maize endosperm. Genetic Resources and Crop Evolution, 70(6), 1663–1676. https://doi.org/10.1007/s10722-022-01526-z
63. Hans-Ulrich, W., y Grohmann, L. (2014). Guidelines for validation of DNA extraction methods applied in subsequent PCR analysis of food and feed products for the presence of genetically modified material. Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit, 9(2), 183–190. https://doi.org/10.1007/s00003-014-0862-3
64. Hariharan, G., y Prasannath, K. (2021). Recent Advances in Molecular Diagnostics of Fungal Plant Pathogens: A Mini Review. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 10. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.600234
65. Herbario de la Universidad Pública de Navarra. (s.f.). Zea mays L. Retrieved July 22, 2024, from https://www.unavarra.es/herbario/pratenses/htm/Zea_mays_p.htm
66. Hernández, M., Río, A., Esteve, T., Prat, S., y Pla, M. (2001). A rapeseed-specific gene, Acetyl-CoA carboxylase, can be used as a reference for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes from mixed food samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(8), 3622–3627. https://doi.org/10.1021/jf010173n
67. Heuermann, M. C., Rosso, M. G., Mascher, M., Brandt, R., Tschiersch, H., Altschmied, L., y Altmann, T. (2019). Combining next-generation sequencing and progeny testing for rapid identification of induced recessive and dominant mutations in maize M2 individuals. Plant Journal, 100(4), 851–862. https://doi.org/10.1111/tpj.14431
68. Hoebeeck, J., Pattyn, F., Yigit, N., de Smet, E., Speleman, F., y Vandesompele, J. (2007). Real-Time PCR Quality Control for Gene Expression Profiling Using the LightCycler ® 480 System. Biochemica, 2, 7–9. www.medgen.ugent.be/rtprimerdb
69. Hougs, L., Gatto, F., Goerlich, O., Grohmann, L., Lieske, K., Mazzara, M., Narendja, F., Ovesná, J., papazova, N., Scholtens, I., y Žel, J. (2017). Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods (EUR 29015, Ed.; 2nd ed.). Office of the European Union. https://doi.org/10.2760/645114
70. Huang, H., Cheng, F., Wang, R., Zhang, D., y Yang, L. (2013). Evaluation of Four Endogenous Reference Genes and Their Real-Time PCR Assays for Common Wheat Quantification in GMOs Detection. PLoS ONE, 8(9), e75850. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075850
71. Imai, S., Tanaka, K., Nishitsuji, Y., Kikuchi, Y., Matsuoka, Y., Arami, S.-I., Sato, M., Haraguchi, H., Kurimoto, Y., Mano, J., Furui, S., y Kitta, K. (2012). An Endogenous Reference Gene of Common and Durum Wheat An Endogenous Reference Gene of Common and Durum Wheat for Detection of Genetically Modified Wheat. Food Hyg. Saf. Sci, 53(5), 203–210. https://doi.org/10.3358/shokueishi.53.203
72. ISAAA. (2024). Agricultural Biotechnology (A lot more than just GM crops). In ISAAA SEAiaCenter (Ed.), Encyclopedia of Geography (Vol. 18). https://doi.org/10.4135/9781412939591
73. ISAAA. (2024). GM Approval Database. https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp
74. ISAAA Inc. (2025). *Maize(Zea mays L.) GM Events | GM Approval Database*. https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/crop/default.asp?CropID=6

75. Ishii, T., y Araki, M. (2017). A future scenario of the global regulatory landscape regarding genome-edited crops. GM Crops y Food, 8(1), 44–56. https://doi.org/10.1080/21645698.2016.1261787
76. ISO. (2005). *ISO/IEC 17025:2005(es), Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración*. Online Browsing Platform (OBP). https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-2:v1:es
77. ISO. (2015). *ISO 9001:2015(es), Sistemas de gestión de la calidad — Requisitos*. Online Browsing Platform (OBP). https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9001:ed-5:v1:es
78. ISO. (2020). *ISO 21570:2005 - Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Quantitative nucleic acid based methods*. Guidelines, Minimum Requirements and Performance Criteria Laid down in ISO 21570:2005. https://www.iso.org/es/contents/data/standard/03/46/34615.html
79. Jabeen, R., Habiba, U., Khalid, S., y Shirazi, J. H. (2022). Extraction and comparison of quality and purity of DNA of medicinal plants by CTAB and kit method. Journal of Contemporary Pharmacy, 6(1), 19–22. https://doi.org/10.56770/jcp2022613
80. Justiniano Aysanoa, E. (2010). Fenología e intensidad de color en corontas de maíz morado (Zea mays L.) en sus diferentes estados de desarrollo en la localidad de la Molina.
81. JRC. (2024). Certified Reference Materials catalogue of the JRC. https://crm.jrc.ec.europa.eu/
82. Kato-Yamakake, T. A. (2004). Variedades transgénicas y el maíz nativo en México. Agricultura, Sociedad y Desarrollo, 1(2), 101–109.
83. Kazantseva, J., Malv, E., Kaleda, A., Kallastu, A., y Meikas, A. (2021). Optimisation of sample storage and DNA extraction for human gut microbiota studies. BMC Microbiology, 21(158), 1–13. https://doi.org/10.1186/s12866-021-02233-y
84. Khan, N. U., Sheteiwy, M., Lihua, N., Khan, M. M. U., y Han, Z. (2019). An update on the maize zein-gene family in the post-genomics era. Food Production, Processing and Nutrition, 1(13), 1–12. https://doi.org/10.1186/s43014-019-0012-5
85. Klosterman, S. J., Choi, J. J., y Hadwiger, L. A. (2003). Analysis of pea HMG-I/Y expression suggests a role in defence gene regulation. Molecular Plant Pathology, 4(4), 249–258. https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00171.x
86. Koyama, T. (2014). The roles of ethylene and transcription factors in the regulation of onset of leaf senescence. Frontiers in Plant Science, 5(NOV), 1–8. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00650
87. Kranaskis, E. (2019). A tale of two inventions: Monsanto, Biotechnology, and Geography of postmodern science. Isis, 110(4), 654–672. https://doi.org/10.1086/430657
88. Kurian, N. S., y Das, B. (2021). Comparative analysis of various extraction processes based on economy, eco-friendly, purity and recovery of polyhydroxyalkanoate: A review. In International Journal of Biological Macromolecules (Vol. 183, pp. 1881–1890). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.007
89. Leach, K. A., McSteen, P. C., y Braun, D. M. (2016). Genomic DNA Isolation from Maize (Zea mays) Leaves Using a Simple, High-Throughput Protocol . Current Protocols in Plant Biology, 1(1), 15–27. https://doi.org/10.1002/cppb.20000

90. Lei, X., Liu, Z., Li, X. P., Tan, B., Wu, J., y Gao, C. (2021). Screening and functional identification of salt tolerance HMG genes in Betula platyphylla. Environmental and Experimental Botany, 181. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104235
91. León Arce, y García-Bustelo Martínez, M. (2003). Análisis Institucional de la seguridad aimentaria en la Unión Europea: Las agencias de seguridad alimentaria.
92. LEY DE BIOSEGURIDAD DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS, 1 (2020). Gobierno de México.
93. LEY DE BIOSEGURIDAD DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS, 1 (2022). Gobierno de México.
94. Li, F., Wei, F., Huang, W. L., Lin, C. C., Li, L., Shen, M. M., Yan, Q., Liao, W., Chia, D., Tu, M., Tang, J. H., Feng, Z., Kim, Y., Su, W. C., y Wong, D. T. W. (2020). Ultra-short circulating tumor dna (UsctDNA) in plasma and saliva of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. Cancers, 12(8), 1–15. https://doi.org/10.3390/cancers12082041
95. Li, F., Wei, F., Huang, W. L., Lin, C. C., Li, L., Shen, M. M., Yan, Q., Liao, W., Chia, D., Tu, M., Tang, J. H., Feng, Z., Kim, Y., Su, W. C., y Wong, D. T. W. (2020). Ultra-short circulating tumor DNA (UsctDNA) in plasma and saliva of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. Cancers, 12(8), 1–15. https://doi.org/10.3390/cancers12082041
96. Li, J., Gao, H., Li, Y., Xiao, F., Zhai, S., Wu, G., y Wu, Y. (2022). Event-specific PCR methods to quantify the genetically modified DBN9936 maize. Journal of Food Composition and Analysis, 105. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104236
97. Li, J., Wu, Y., Li, X., Wang, Y., Zhang, L., Li, Y., y Wu, G. (2015). Developing a matrix reference material for screening of transgenic rice. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 407(30), 9153–9163. https://doi.org/10.1007/s00216-015-9081-8
98. Li, N., Liao, Z., He, S., Chen, X., Huang, S., Wang, Y., y Yang, G. (2021). Demonstration of pH-controlled DNA-surfactant manipulation for biomolecules. RSC Advances, 11(25), 15099–15105. https://doi.org/10.1039/d1ra01420j
99. Liu, F., Cheng, J., Liu, X., y Wang, X. Q. (2021). High-throughput and accurate determination of transgene copy number and zygosity in transgenic maize: From DNA extraction to data analysis. International Journal of Molecular Sciences, 22(22). https://doi.org/10.3390/ijms222212487
100. Macedo-Márquez, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de Saccharomyces cerevisae. Revista Especializada En Ciencias Quimico-Biológicas, 15(2), 97–103.
101. Marchesi, U., Mazzara, M., Broll, H., de Giacomo, M., Grohmann, L., Herau, V., Holst-Jensen, A., Houngs, L., Hübert, P., Laurensse, E., Papzova, N., Pla, M., Sandberg, M., Savini, C., y Freiburg, V. (2015). European Network of GMO Laboratories (ENGL) 2 0 1 5 Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. https://ec.europa.eu/jrc
102. Márquez-Luna, Á. de L., Lugo-Melchor, O. Y., Marino-Marmolejo, E. N., y Rentería-Ledesma, M. A. (2021). ddPCR OPTIMIZATION AND DEVELOPMENT OF MULTIPLEX MODULES FOR ANALYZING EVENTS OF GENETIC MODIFICATION IN MAIZE. Agrociencia, 55(8), 663–680. https://doi.org/10.47163/agrociencia.v55i8.2660
103. Martínez Chartuny, Y. (2021). Determinación de la diversidad genética y estructura poblacional del maíz criollo (Zea mays L.) de Sahagún, Córdoba mediante marcadores microsatélites.

104. Masoomi-Aladizgeh, F., Jabbari, L., Khayam Nekouei, R., Aalami, A., Atwell, B. J., y Haynes, P. A. (2023). A universal protocol for high-quality DNA and RNA isolation from diverse plant species. PLoS ONE, 18(12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0295852
105. Massieu Trigo, Y. C. (2009). Cultivos y alimentos transgénicos en México: El dedate, los actores y las fuerzas sociopolíticas. Nueva Época, 22(59), 217–243.
106. Matthes, N., Westphal, K., Haldemann, C., Egert, M., Jokisch, C., y Speck, B. (2020). Validation of a modified CTAB method for DNA extraction from protein-rich maize feedstuffs. Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit, 15(4), 331–340. https://doi.org/10.1007/s00003-020-01285-y
107. Matus Ortega, G., Pardo, J. P., Guerra Sánchez, G., Buendía Carrillo, K., Matus Ortega, M., Gonzáles, J., Luqueño Bocardo, O. I., Vázquez Carrada, M., y Romero Aguilar, L. (2021). Un vistazo a la morfología y dinámica de la mitocondria y a los sitios de producción de las especies reactivas de oxígeno. Revista de Educación Bioquímica, 40(3), 11–127.
108. Mazzara, M., Savini, C., y Grazioli, E. (2006). Event-specific method for the quantitation of rice line LLRICE62 using real-time PCR : validation report (European Commission, Directorate-General Joint Research Centre, y Institute for Health and Consumer Protection, Eds.). Publications Office of the European Union.
109. Medina García, G., Zegbe Domínguez, J. A., Reveles Hernández, M., Mena Covarrubias, J., Reveles Torres, L., y Echavarría Cháirez, F. G. (2016). Tecnología para la producción de cultivos (Primera edición). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
110. Medina-Hoyos, A., Narro-León, L. A., y Chávez-Cabrera, A. (2020). Purple corn (Zea mays L.) crop in the Peruvian Highlands: Adaptation and identification of high-yield and high anthocyanin content cultivars. Scientia Agropecuaria, 11(3), 291–299. https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.01
111. Medio Ambiente e INECC. (2023). *Evaluación de la presencia de secuencias genéticamente modificadas en el Maíz nativo de México*. https://www.gob.mx/inecc. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. Ciudad de México, México.
112. Middleton, L. Y. M., Dou, J., Fisher, J., Heiss, J. A., Nguyen, V. K., Just, A. C., Faul, J., Ware, E. B., Mitchell, C., Colacino, J. A., y M. Bakulski, K. (2022). Saliva cell type DNA methylation reference panel for epidemiological studies in children. Epigenetics, 17(2), 161–177. https://doi.org/10.1080/15592294.2021.1890874
113. Molero, T., Atencia, C., González, K., Zambrano, M., Cruz, S., Pan
114. Montoya, C., Ávila, K. J., Reyes, P., Navia, M., y Romero, H. M. (2014). Secuenciación del genoma de las especies vegetales: implicaciones y perspectivas * Genome Sequencing in Plant Species: Implications and Perspectives. Palmas, 35(3), 11–22.
115. O'Leary, M. (2016, May 20). Maíz: De México para el mundo. CIMMYT. https://www.cimmyt.org/es/uncategorized/maiz-de-mexico-para-el-mundo/
116. Olvera Berruecos, J. (2023). Diseño y estandarización de protocolos de extracción de ácidos nucleicos de especies de la familia Cactaceae.
117. Orjuela Yepes, D. (2013). Estudio comparativo de las normas relevantes a nivel internacional para la definición, clasificación, exclusión, desclasificación e identificación de residuos peligrosos. Publicación Científica En Ciencias Biomédicas, 11(19), 72–92.

118. Ortega, J. G., Carch, C. C., Nieto, K. M., Salazar Salazar, L., y Castro Quijije, P. (2020). El consumo de alimentos transgénicos (ATs) en el sur de Manabí, Ecuador. UNESUM-Ciencias: Revista Científica Multidisciplinaria.
119. Oviedo-Bolaños, K., García-González, J., Solano-González, S., Martínez-Debat, C., Sancho-Blanco, C., & Umaña-Castro, R. (2020). Detection of the 35S promoter by real-time PCR as a transgenicity indicator in food and Gossypium sp. Agronomía Mesoamericana, 31(1), 209–221. https://doi.org/10.15517/AM.V31I1.37151
120. Paul, R., Ostermann, E., y Wei, Q. (2020). Advances in point-of-care nucleic acid extraction technologies for rapid diagnosis of human and plant diseases. Biosensors and Bioelectronics, 169. https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112592
121. Paz, F. A., Parellada, E. A., Cornacchione, V., Palma, G. A., y Coria, M. S. (2023). Comparative analysis for DNA extraction methods from cotton seeds (Gossypium hirsutum). Rev. Agron. Noroeste Argent, 43(1), 56–62.
122. Pérez Cruz, O. A. (2020). La Competitividad y la Seguridad Alimentaria en México. Economía Coyuntural. Revista de Temas de Coyuntura y Perspectivas, 5(1), 119–141. https://doi.org/https://doi.org/10.5281/zenodo.3746608
123. Pochteca. (2021). Hoja de datos de seguridad de N-lauril sal sódica: Versión 2 (pp. 1–9).
124. Portuondo, Y., y Portuondo, J. (2010). La repetibilidad y reproducibilidad en el aseguramiento de la calidad de los procesos de medición. Tecnología Química, XXX(2), 117–121.
125. Przybylski, M., Dzieciatkowski, T., Les, K., Mucha, M. A., Wroblewska, M., y Mlynarczyk, G. (2012). Comparison of real-time PCR quantitative analysis of the cytomegalovirus DNA level using LightCycler 2.0 and LightCycler 480 instruments. Journal of Clinical Virology, 55(3), 270–273. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.08.005
126. Purnhagen, K. P., Kok, E., Kleter, G., Schebesta, H., Visser, R., y Wesseler, J. (2018). Eu court cast new plant breending techniques into regulatory limbo. Nature Biotechnology, 36, 799–800.
127. QUIAGEN, Roche, SYBR (Life Technologies Corporation), y Windows (Microsoft Corporation). (2012). Roche ® LightCycler ® 480 instrument setup instructions for qPCR.
128. QUIAGEN, Roche, SYBR (Life Technologies Corporation), y Windows (Microsoft Corporation). (2012). Roche ® LightCycler ® 480 instrument setup instructions for qPCR.
129. Raghunathan, S., Jaganade, T., y Priyakumar, U. D. (2020). Urea-aromatic interactions in biology. Biophysical Reviews, 12(1), 65–84. https://doi.org/10.1007/s12551-020-00620-9
130. Reeves, R., y Beckerbauer, L. (2001). HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. Biochemica et Biophysica Acta, 1519, 13–29. www.bba-direct.com
131. Roche Diagnostics. (2010). LightCycler ® 480 Instrument Absolute Quantification Quick Reference Card (pp. 1–4).
132. Roche Diasgnostics. (2005). LightCycler ® 480 Instrument Operator's Manual 16pt/20pt wenig Text Imago medium Software Version 1.0.
133. Rodríguez Alonso, G. (2023). Diseño y estandarización de protocolos de extracción de ácidos nucleicos de especies de la familia Cactaceae.

134. Rostoks, N., Grantiņa-Ieviņa, L., Ieviņa, B., Evelone, V., Valciņa, O., y Aleksejeva, I. (2019). Genetically modified seeds and plant propagating material in Europe: potential routes of entrance and current status. Heliyon, 5(2), 1–21. https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2019.E01242
135. Roth Carl. (2016). Ficha de datos de seguridad β-mercaptoetanol. www.carlroth.de
136. Roth. (2016). Ficha de datos de seguridad de acetato de potasio. www.carlroth.de
137. Roth. (2017). Ficha de datos de seguridad de Triclorometano/ Cloroformo. www.carlroth.de
138. Ruíz Corral, J. A., Medina García, G., Ramírez Díaz, J. L., Flores López, H. E., Ramírez Ojeda, G., Manríquez Olmos, J. D., Zarazúa Villaseñor, P., González Enguiarte, D. R., Díaz Padilla, G., y de la Mora Orozco, C. (2011). CLIMATE CHANGE AND ITS IMPLICATIONS IN FIVE PRODUCING AREAS OF MAIZE IN MEXICO. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 2(1), 309–323.
139. Saling, P., Kicherer, A., Dittrich-Kriimer, B., Wittlinger, R., Zombik, W., Schmidt, I., Schrott, W., y Schmidt, S. (2002). Eco-efficiency Analysis by BASF: The Method. Eco-Efficiency, 7(4), 203–218.
140. Sánchez González, J. de J. (2011). Diversidad del Maíz y el Teocintle. Informe preparado para el proyecto: "Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México."
141. Saavedra, G. (2014). El cultivo del Maíz Cholero y Dulce, (Vol. 1, pp. 1-146). Instituto de Investigaciones Agropecuarias. www.fao.org/docrep/t0395s/.
142. Savini, C., Sacco, M. G., Mazzara, M., y Vicent, U. (2023). Event-specific Method for the Quantification of Maize DP915635 Using Real-time PCR Validation Report. https://joint-research-centre.ec.europa.eu
143. Schenk, J. J., Becklund, L. E., Carey, S. J., y Fabre, P. P. (2023). What is the "modified" CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol. Applications in Plant Sciences, 11(3). https://doi.org/10.1002/aps3.11517
144. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2020, septiembre). *Maíz forrajero, también es maíz*. https://www.gob.mx/agricultura/articulos/maiz-forrajero-tambien-es-maiz.
145. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2023, Julio 4). Crecerá en más de dos millones de toneladas la producción nacional de maíz grano en 2023: Agricultura| Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural|Gobierno|gob.mx. https://www.gob.mx/agricultura/prensa/crecera-en-mas-de-dos-millones-de-toneladas-la-produccion-nacional-de-maiz-grano-en-2023-agricultura?idiom=es.
146. Secretaría del Campo. (2021). ES EDOMÉX UNO DE LOS PRINCIPALES PRODUCTORES AGRÍCOLAS EN EL PAÍS. https://secampo.edomex.gob.mx/eventos-comunicados/es-edomex-uno-principales-productores-agricolas-en-el-pais
147. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2006). *NORMA Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasifica*. Diario de La Federación. https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/1055/SEMARNA/SEMARNA.htm

148. Semenov, M. v. (2021). Metabarcoding and Metagenomics in Soil Ecology Research: Achievements, Challenges, and Prospects. Biology Bulletin Reviews, 11(1), 40–53. https://doi.org/10.1134/s2079086421010084
149. SENASICA. (2016, August 4). *Regulación Nacional de Organismos Genéticamente Modificados*. https://www.gob.mx/senasica/documentos/regulacion-nacional-de-ogm
150. SENASICA. (2021). Bioseguridad para Organismos Genéticamente Modificados OGM. https://www.gob.mx/senasica/documentos/bioseguridad-para-organismos-geneticamente-modificados-ogm
151. SENASICA. (2023). Catálogo de Servicios del Departamento de Análisis Molecular y Nuevas Tecnologías y del Área de Secuenciación y Bioinformática. https://www.gob.mx/senasica/documentos/servicios-del-departamento-de-analisis-molecular-y-nuevas-tecnologias-y-del-area-de-secuenciacion-y-bioinformatica?state=published
152. SENASICA. (2023). Diar Departamento de Análisis Molecular y Nuevas Tecnologías y el Área de Secuenciación y Bioinformática. https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/departamento-de-analisis-molecular-y-nuevas-tecnologias-y-el-area-de-secuenciacion-y-bioinformatica
153. Shokere, L. A., Holden, M. J., y Ronald Jenkins, G. (2009). Comparison of fluorometric and spectrophotometric DNA quantification for real-time quantitative PCR of degraded DNA. Food Control, 20(4), 391–401. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.07.009
154. SIAP (2024). Expectativas Agroalimentarias 2024. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. México.
155. SIAP (2024). Panorama Agroalimentario. La ruta de la Transformación Agroalimentaria 2018-2024. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. México.
156. Sidstedt, M., Rådström, P., & Hedman, J. (2020). PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *412*(9), 2009–2023. https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2
157. Shu, L., Ludwig, A., y Peng, Z. (2020). Standards for methods utilizing environmental dna for detection of fish species. Genes, 11(3). https://doi.org/10.3390/genes11030296
158. SNICS, y SNAREFI. (2013). Resúmenes Ejecutivos: Ejercicio fiscal 2010 (Primera edición). Universidad Autónoma de Chapingo.
159. Spanea, E., Tsironi, T., Tsakali, E., Batrinou, A., Stefanou, V., Antonopoulos, D., Koussissis, S., Tsaknis, J., Impe, J. van, y Houhoula, D. (2020). Evaluation of a Real Time PCR Assay Method for the Detection of Genetically Modified Organisms in Food Products. Journal of Food Research, 9(2), 1. https://doi.org/10.5539/jfr.v9n2p1
160. Su, W., Ren, Y., Wang, D., Su, Y., Feng, J., Zhang, C., Tang, H., Xu, L., Muhammad, K., y Que, Y. (2020). The alcohol dehydrogenase gene family in sugarcane and its involvement in cold stress regulation. BMC Genomics, 21(1). https://doi.org/10.1186/s12864-020-06929-9
161. Tamari, F., y Hinkley, C. S. (2016). Extraction of DNA from Plant Tissue: Review and Protocols. In Sample Preparation Techniques for Soil, Plant, and Animal Samples (pp. 245–263). Springer Protocols Handbooks. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3185-9_17

162. Thermo Fisher Scientific. (2024). QuantStudio 6 Pro Real-Time PCR System and QuantStudio 7 Pro Real-Time PCR System User Guide (Pub. No. MAN0018045 Rev. L).
163. Tomás, A. (2005). La Unión Europea y la regulación de la biotecnología aplicada a la agricultura. Instituto de Negociaciones Agrícolas Internacionales. pp 1-81.
164. Tourancheau, A., Mead, E. A., Zhang, X. S., y Fang, G. (2021). Discovering multiple types of DNA methylation from bacteria and microbiome using nanopore sequencing. Nature Methods, 18(5), 491–498. https://doi.org/10.1038/s41592-021-01109-3
165. 168. unzio, A., Parra, I., y Sánchez, J. (2017). Gestión de la calidad en la fase analítica en laboratorios clínicos del estado Zulia. Investigación Clínica, 58(1), 473–481.
166. Uslu, T. (2021). Advantages, risks and legal perspectives of GMOs in 2020s. In Plant Biotechnology Reports (Vol. 15, Issue 6, pp. 741–751). Springer. https://doi.org/10.1007/s11816-021-00714-0
167. Vahdani, M., Sahari, M. A., y Tanavar, M. (2024). Quantitative and qualitative analysis of three DNA extraction methods from soybean, maize, and canola oils and investigation of the presence of genetically modified organisms (GMOs). Food Chemistry: Molecular Sciences, 8. https://doi.org/10.1016/j.fochms.2024.100201
168. Vásquez, V. F., Arceo, J., Rosales, T. E., Koschmieder, K., Caballero, J. L., Dorado, G., y Ii, P. (2023). Razas nativas arqueológicas y contemporáneas de maíz (Zea mays) del norte del Perú: filogenia mediante toma de huellas dactilares por microsatélites (STR). Revista ARCHAEOBIOS No, 18. www.arqueobios.org
169. Velázquez Castro, A. J. (2018). Agricultura multifuncional: relevancia para el turismo en México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 9(7), 1494–1507.
170. Velázquez Castro, J. A. (2018). Agricultura multifuncional: relevancia para el turismo en México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 9(7), 1494–1507. https://doi.org/10.29312/remexca.v9i7.1178
171. Ventura, I., Brunello, L., Iacopino, S., Valeri, M. C., Novi, G., Dornbusch, T., Perata, P., y Loreti, E. (2020). Arabidopsis phenotyping reveals the importance of alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase for aerobic plant growth. Scientific Reports, 10(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-73704-x
172. Vergaray, G., Méndez, C. R., Miguel Guevara, J. M., Gambia, R. A., y Béjar, V. R. (2023). Determination of transgenicity and verification in the labelling of industrialized corn foods in retail outlets in metropolitan Lima. An Fac Med, 84(3), 279–285. https://doi.org/10.15381/anales
173. Verginelli, D., Spinella, K., la Rocca, D., Bonini, P., Fusco, C., Misto, M., Quarchioni, C., Peddis, S., Peroni, L., y Marchesi, U. (2023). Validation and comparison of four DNA extraction methods for genetically modified Organisms analysis: From DNA quality control to quantification of genetically modified content in real-life samples matrices. JSFA Reports, 3(11), 519–535. https://doi.org/10.1002/jsf2.151
174. Vicente Collantes, P. (2021). Aplicación de glucosa oxidasa y catalasa para la reducción del grado alcohólico en vinos blancos.
175. Vielle Calzada, J.P. (2007). Decodificando el Genoma del Maíz en Guanajuato. Ideas CONCYTEG, 29, 824–831.

176. Wang, X., Hong, X. Z., Li, Y. W., Li, Y., Wang, J., Chen, P., y Liu, B. F. (2022). Microfluidics-based strategies for molecular diagnostics of infectious diseases. Military Medical Research, 9(1). https://doi.org/10.1186/s40779-022-00374-3

177. Watanabe, R., Asai, S., Kakizoe, H., Saeki, H., Masukawa, A., Miyazawa, M., Ohtagawa, K., Ravzanaaadii, M. A., Doi, M., Atsumi, H., Umezawa, K., y Miyachi, H. (2021). Evaluation of the basic assay performance of the GeneSoc® rapid PCR testing system for detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. PLoS ONE, 16(3 March). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248397

178. Weng, C. L., Yazid, H., Appalasamy, S., Geng, B. J., Nasir, W. M. N. W. M., Muhammad, N. M. N., Iman, A. H. M., y Kumaran, J. V. (2020). Optimization of Binding, Washing and Elution Buffer for Development of DNA Isolation Kit. In International Conference on Science and Technology (Ed.), IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 596, Issue 1, pp. 1–7). IOP Publishing Ltd. https://doi.org/10.1088/1755-1315/596/1/012008

179. Wu, D., Dong, J., Yao, Y., Zhao, W., y Gao, X. (2015). Identification and evaluation of endogenous control genes for use in quantitative RT-PCR during wheat (Triticum aestivum L.) grain filling. Genetics and Molecular Research, 14(3), 10530–10542. https://doi.org/10.4238/2015.September.8.15

180. Zhang, K., Xie, H., Wen, J., Zhang, J., Wang, Z. Y., Xu, B., y Chai, M. (2024). Leaf senescence in forage and turf grass: progress and prospects. Grass Research, 4. https://doi.org/10.48130/grares-0024-0002

9. Anexos

9.1. Métodos de extracción de ADN

9.1.1. Método I: Glucosa y PVP

1. Precalentar el buffer de extracción A y B a 60°C (Hasta que esté completamente solubilizado)
2. Para la extracción de muestra de hoja, pesar 100 mg de muestra en un microtubo de 1.5 mL. Pipetear 500ul de buffer A y 400µl de buffer B dentro del mismo tubo. En caso de harina, pesar 100 mg de muestra, 400 µl de buffer A y 400 µl de buffer B.
3. Vórtex la mezcla por 10s
Incubar los tubos a 65°C por 30 min a baño de agua y da un pulso de vórtex cada 10 minutos para homogeneizar
4. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente y agregar RNasa A (25mg/mL).
5. Homogeneizar en vórtex e incubar a 37°C por 20 minutos en una incubadora (homogeinizando cada 10 minutos)
5. Adicionar 400µl of CIA y homogeneizar en vórtex por 5 segundos para formar una emulsión.
6. Centrifugar a 14,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente para separar las fase orgánica y acuosa.

Nota: si la fase acuosa no es transparente, repetir el paso 5
7.Cuidadosamente transferir a un nuevo microtubo la fase acuosa (transparente) usando una micropipeta en un nuevo tubo. En este momento tratarlo con mucho cuidado
8. Adicionar 2/3 volumen de isopropanol y 1/10 volumen de 3.5 M Acetato de sodio (pH 5.2).
9. Cerrar los tubos fuertemente, invertir gentilmente por 5–6 veces y después precipitar el DNA incubando a 20°C por 15 minutos.

Nota: Para incrementar la precipitación del DNA, el tubo debe ser incubado toda la noche.

10. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos para precipitar el pellet de DNA.
11. Cuidadosamente remover el sobrenadante sin perturbar el pellet y adicionar 400µl de 70% (v/v) frío (20°C) etanol

Desplazar el pellet moviendo un dedo
12. Centrifugar a 13,000 g por 5 minutos y descartar el sobrenadante decantando.
13. Remover los residuos de etanol secando el pellet de ADN.

Note: Asegurarse de no sobre secar el pellet porque será difícil disolverlo.

14. Disolver el pellet de DNA en 100ul de agua grado biología molecular
Note: El buffer TE debe ser usado para disolver el pellet de DNA para mantenerlo en almacenamiento.

9.1.2. Método II: Fenol y β-mercaptoetanol

1. Transferir 2 gramos de muestra en un tubo de 50 mL

2. Agregar 5 mL de tampón de extracción
3. Añadir 1.5 mL de SDS al 20%, mezclar bien en vórtex
4. Incubar a 65°C durante 40 minutos

Nota: Mezclar las muestras cada 10 minutos en vórtex

5. Centrifugar 10 minutos a 5,000 g
6. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo Falcon de 15 mL
7. Agregar 1.0mL de Acetato de potasio 5M, agite vigorosamente durante 1 minuto
8. Incubar en hielo durante 30 minutos

Nota: Mezclar las muestras cada 10 minutos en vórtex

9. Centrifugar durante 10 minutos a 5,000 g
10. Transferir la mayor cantidad del sobrenadante a un nuevo tubo
11. Añadir 2mL de isopropanol, mezclar durante 1 minuto
12. Incubar en hielo durante 5 minutos
13. Centrifugar durante 10 minutos a 5, 000 g
14. Eliminar el sobrenadante y secar al aire o a 65°C
15. Disolver el sedimento en 1 mL de TE (1X)

Nota: Calentar si no se disuelve

16. Transferir la solución de ADN a un tubo Eppendorf de 2.0 mL
17. Añadir 10 µL de RNAsa A (10 mg/1L), mezclar suavemente e incubar durante 20 minutos a 37°C
18. Añadir 800uL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1)
19. Mezclar con vórtex durante 1 minuto
20. Centrifugar durante 10 minutos a 14, 000 rpm
21. Transferir la fase acuosa superior (900 µL) a un tubo de 2 mL

Nota: no tocar la interfase

22. Adicionar 800 µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1)
23. Mezclar durante 1 minuto en vórtex
24. Centrifugar por 10 minutos a 14,000 rpm
25. Transferir la parte superior acuosa (800 µL a un nuevo tubo) Eppendorf que contenga 90 µL de Acetato de sodio 3M 7.2 pH

Nota: cuidar de no tocar la interfase

26. Adicionar 600 µL de isopropanol
27. Mezclar suavemente por inversión durante 1 minuto
28. Centrifugar 10 minutos a 14,000 rpm para sedimentar el ADN
29. Retirar todo el sobrenadante
30. Agregar 1mL de etanol 70% para lavar el sedimento de ADN. Asegurarse de que el sedimento de ADN no esté estancado. Agitar las muestras.
31. Centrifugar durante 5 minutos en una microcentrífuga a 14,000 rpm
32. Secar el sedimento hasta que se evapore todo el residuo de etanol
33. Agregar 100 µL de buffer TE 0.1X 8.3 pH al pellet de DNA
34. Agitar hasta resuspender, calentar si es necesario a 65°C

Purificación

35. Purificar las muestras de ADN utilizando el kit de DNA *Clean and Concentrator* según las instrucciones del fabricante
36. Eluir el ADN de la columna dos veces con 50 µL de buffer de elución

9.1.3. Método III: Urea modificado

Lisis y precipitación
1. Pesar en tubos de 2 mL, 200 mg de muestra de hoja o harina
2. Agregar 800 µL de buffer de extracción de urea en muestras de hoja; 1000 µL para harina
3. Homogeneizar la muestra en vórtex aproximadamente durante 15 segundos
4. Únicamente para muestras de hoja, incubar 20 minutos a 65°C, realizando homogeneización cada 10 minutos. En caso de muestras de harina evitar este paso y continuar con el paso 5.
5. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 2mL (aproximadamente 550 µL)
6. Pipetear la misma cantidad que se obtuvo de sobrenadante de la solución 1:10 acetato de potasio: isopropanol
Nota: Tener mucho cuidado al transferir el sobrenadante, evitando tomar fragmentos de muestra, en caso de observar fragmentos de muestra en el fondo del tubo pipetear la mayor cantidad de sobrenadante cuidando de no tocar el precipitado y transferir a un nuevo tubo
7. Incubar a -20°C durante 20 minutos
8. Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos
9. Invertir el tubo rápidamente para verter el sobrenadante en un contenedor adecuado para residuos. Secar los tubos con papel absorbente para eliminar cualquier residuo de líquido
Lavado del pellet
10. Pipetear 300 µL de etanol al 70% dentro de los tubos
11. Homogeneizar la muestra en vórtex aproximadamente durante 15 segundos
12. Centrifugar a 14, 000 rpm durante 10 minutos
13. Volver a invertir los tubos para descartar el sobrenadante
14. Secar el pellet (retirar cualquier residuo de etanol). Si es necesario incubar los tubos abiertos a 65°C hasta que no existan restos de etanol. (aproximadamente 5 minutos, en caso de no estar seco completamente, secar hasta que sea necesario)
Nota: Es muy importante asegurarse de que todo el etanol se ha evaporado, o inhibirá las aplicaciones posteriores. También es importante no secar demasiado el pellet, ya que esto dificulta la resuspención de la muestra.
Resuspensión de ADN, almacenamiento y uso
15. Cuando el etanol se ha evaporado por completo agregar 100 µL de agua grado biología molecular
16. Incubar 5 minutos a 65°C.
17. Centrifugar a 6°C durante 10 minutos a 14,000 rpm
18. Recuperar 80 µL del sobrenadante, cuidando de no tocar el pellet (en caso de que se muestren fragmentos verdes de muestra de hoja).
Purificación: Purificar las muestras de ADN utilizando el kit DNA Clean & Concentraror TM según las instrucciones del fabricante

9.2. Certificado de Material de Referencia Certificado 1529

UR 1529

European Commission

ERM European Reference Materials

JOINT RESEARCH CENTRE
Directorate F - Health, Consumers and Reference Materials

CERTIFICATE OF ANALYSIS

ERM”- BF418d N°. 2086

DRIED MAIZE POWDER		
	Mass Fraction	
	Certified value [1] [g/kg]	Uncertainty [2] [g/kg]
1507 maize	98.6	-J.7, +2.0

1) The certified value is based on the mass fraction of dried nQn-genetically modified powder and dried genetically modified powder mixed and corrected far the water content. The certified value is traceable to SI.
2) The certified uncertainty is the expanded uncertainty estimated in accordance with the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) with a coverage factor *h* -- 2, corresponding to a level of confidence of about 95 %.

This certificate is valid for one year after purchase. Sales date:

4 DEC 2022

The minimum amount of sample to be used is 100 mg.

Accepted as an ERM”, Geel,
August 200£i Latest
Revision:May 2019

Signed: D. Flo

Or Doris Florian
Head of Unit Reference Materials
European Commission, Joint Research Centre
Directorate F — Health, Consumers and
Reference Materials Retieseweg 111
B-2440 Geel, Belgium

Registration No. 268-RM
ISO Guide 34 for fhe
production of reference materials

All following pages are an integral part of the certificate

DESCRIPTION OF THE SAMPLE

ERM-BF418d is part of a set of four maize powder CRMs containing different mass fractions of genetically modified (GM) 1507 maize.

The materials were prepared by quantitative mixing of dried non-GM maize powder and 1507 GM dried maize powder, and subsequent homogenisation with the help of a dry-mixing technique. ERM-BF418d is available in glass bottles containing approximately 1 g of maize powder closed under argon atmosphere.

This reference material has been produced from whole kernels of non-modified maize and 1507 maize both of seed quality and delivered by Pioneer Hi-Bred International (Johnston, IA, USA). According to European Commission regulation (EC) No 65/2004 the event 1507 maize received the unique identifier DAS-IZ15B7-1. According to the inforrriation provided by Pioneer the genetically modified donor for the heterozygous 1507 maize was the female parent.

ANALYTICAL METHOD USED FOR CERTIFICATION

Gravimetrical preparation confirmed by real-time Polymerase Chain Reaction (rt-PCR).

PARTICIPANTS

EC-DG JRC-IRMM, Geel, BE*

" Measurements within the scope of accreditation to ISO/IEC 17025.

SAFETY INFORMATION

not applicable

INSTRUCTIONS FOR USE

CRM ERM-BF418d shall only be used for the quality control or calibration of methods for the detection of genetically modified food.

The dry CRM powder is hygroscopic.

A difference in DNA extractability between the two base materials has been observed when applying the CTAB extraction method. The application of method with different DNA extraction efficiencies contributes additionally to the uncertainty. Therefore laboratories are reminded to check and validate the extraction methods used in order to minimise influences

STORAGE

Bottles should be stored dry and in the dark at maximum + 4 °C. However, the European Commission cannot be held responsible for changes that happen during storage of the material at the customer's premises.

LEGAL NOTICE

Neither IRMM, its contractors nor any person acting on their behalf:

(a) make any warranty or representation, express or implied, that the use of any information, material, apparatus, method or process disclosed in this document does not infringe any privately owned intellectual property rights;

Of

(b) assume any liability with respect to, or for damages resulting from, the use of any information, material, apparatus, method or process disclosed in this document save for loss or damage arising solely and directly from the negligence of the European Commission's Joint

Research Centre.

No right other than what is explicitly granted herein may be deemed to have been granted by implication. Any use other than for the purpose specified under the instructions for use, including but not limited to acts impinging on the intellectual property rights of third parties, shall be under the sole responsibility of the recipient/purchaser.

NOTE

A detailed certification report is available at https://erm.arc.ec.europa.eu/. A paper copy is obtainable from the Joint Research Centre, Directorate F — Heath, Consumers and Reference Materials on request.

European Commission — Joint
Research Centre Directorate F — Health.
Consumers and Reference Materials
Retieseweg 111. B - 2440 Geel
(Belgium) Telephone: +32-(0)14-571.705
- Fax: +32-(0)14-590.406
Email: jrc rm-distribution.6ec.europa.eu