



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE
JALISCO, A.C.**



**OPTIMIZACIÓN DE ENSAYOS ddPCR Y
DESARROLLO DE MÓDULOS MULTIPLEX PARA
EL ANÁLISIS DE DIEZ EVENTOS DE
MODIFICACIÓN GENÉTICA EN MAÍZ**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRÍA EN INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
OPCIÓN TERMINAL: BIOTECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA**

PRESENTA

L.N. ÁNGEL DE LEÓN MÁRQUEZ LUNA

Directora de tesis: Dra. Ofelia Yadira Lugo Melchor

Asesora: Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo

Asesor: Dr. Jacobo Rodríguez Campos

GUADALAJARA, JALISCO, AGOSTO, 2021

Guadalajara, Jalisco a 12 de Julio de 2021
(Fecha 30 días previos a la realización del examen.)

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del (la) estudiante **Ángel de León Márquez Luna**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “OPTIMIZACIÓN DE ENSAYOS ddPCR Y DESARROLLO DE MÓDULOS MULTIPLEX PARA EL ANÁLISIS DE DIEZ EVENTOS DE MODIFICACIÓN GENÉTICA EN MAÍZ” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el/la estudiante para aspirar al grado de Doctor/Maestro en ciencias en innovación biotecnológica con opción terminal en biotecnología agroalimentaria durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 12 del mes de Julio del año dos mil veintiuno.



Dra. Ofelia Yadira Lugo Melchor

Directora de tesis/tutora académica



Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo

Asesora



Dr. Jacobo Rodríguez Campos

Asesor



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Guadalajara, Jalisco, a 27 de julio de 2021
CP/871/2021

ÁNGEL DE LEÓN MÁRQUEZ LUNA
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA
NÚMERO DE MATRÍCULA 1803MB6420
PRESENTE

Por este medio le informo que el trabajo de tesis "**Optimización de ensayos ddPCR y desarrollo de módulos multiplex para el análisis de diez eventos de modificación genética en maíz**" desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dra. Ofelia Yadira Lugo Melchor. Directora de tesis
Dr. Jacobo Rodríguez Campos. Asesor de tesis
Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo Asesora de tesis

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Mtra. Fatima Gabriela Ordóñez de la Cruz
Coordinadora de Posgrados



Junta directiva

Directora de Tesis:

Dra. Ofelia Yadira Lugo Melchor

Asesores:

Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo

Dr. Jacobo Rodríguez Campos

Agradecimientos

A CONACYT por la beca otorgada durante la realización de este posgrado.

A CIATEJ por el financiamiento del proyecto.

A la Dra. Ofelia Yadira Lugo Melchor por fungir como directora de tesis, por todo su apoyo y asesoría.

A los Dres. Erika Nahomy Marino Marmolejo y Jacobo Rodríguez Campos por su asesoría.

A mis familiares y amigos por el apoyo brindado en esta etapa de mi vida.

Abreviaturas y símbolos

ADN: ácido desoxirribonucleico

ddPCR: reacción en cadena de la polimerasa digital por gotas (por sus siglas en inglés)

OGM: organismo genéticamente modificado

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (por sus siglas en inglés)

μ L: microlitros

nM: nano molar

índice

Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
Marco teórico	10
Maíz	10
Variedad y flujo genético	12
Organismos genéticamente modificados	13
Maíz resistente a insectos (Bt)	14
Maíz tolerante a herbicidas	15
Maíz transgénico en México y comercio internacional	15
Detección de organismos genéticamente modificados	19
Detección de proteínas	19
Detección de ADN	20
Análisis bioinformático	26
PCR in <i>silico</i>	26
Antecedentes	27
Ensayos de vigilancia en maíces mexicanos	27
ddPCR como método de detección y cuantificación de OGMs	29
Planteamiento del problema	30
Justificación	31
Hipótesis	32
Objetivos	32
Objetivo general:	32
Objetivos específicos:	32
Metodología	33
Métodos o procedimientos	35
Análisis bioinformático	35
Extracción ADN	36
Desarrollo y optimización de la ddPCR	36

-Ensayos dúplex	37
-Ensayos <i>Multiplex</i>	38
Análisis de resultados	38
Resultados y discusión	40
Análisis bioinformático	40
Especificidad	40
Estructuras secundarias	40
PCRs in silico	43
Extracción de ADN	44
Estandarización de las ddPCR	45
Concentración de oligonucleótidos y sondas	45
Gradiente de temperatura	46
Conteo de gotas	49
“Lluvia”	49
Ensayos <i>dúplex</i>	50
ddPCR <i>multiplex</i>	53
Ensayo Tetraplex: <i>Hmg</i> , Nk603, Bt11 y Mon810	53
Ensayo triplex: <i>Hmg</i> , Mon88017 y Mon863	56
Ensayos triplex: <i>Hmg</i> , Mir604 y Das1507 y <i>Hmg</i> , Ga21 y Das59122	58
Conclusión	61
Perspectivas a futuro	62
Referencias:	63

Índice de tablas

Tabla 1.	17
Tabla 2.	34
Tabla 3.	36
Tabla 4.	37
Tabla 5.	41

Tabla 6.	41
Tabla 7.	42
Tabla 8.	42
Tabla 9.	43
Tabla 10.	44
Tabla 11.	45
Tabla 12.	51

Índice de figuras

Figura 1.	10
Figura 2.	11
Figura 3.	12
Figura 4.	13
Figura 5.	14
Figura 6.	221
Figura 7.	23
Figura 8.	24
Figura 9.	25
Figura 10.	25
Figura 11.	26
Figura 12.	47
Figura 13.	48
Figura 14.	53
Figura 15.	54
Figura 16.	55
Figura 17.	56
Figura 18.	57
Figura 19.	58
Figura 20.	59
Figura 21.	59

Resumen

La siembra, comercialización y consumo de maíz transgénico es motivo de debate en México, ya que se considera centro de origen y distribución de grano nativo. La reacción en cadena de la polimerasa digital por gotas (ddPCR por sus siglas en inglés) ha demostrado ser más eficiente que el estándar de oro para el análisis de maíz genéticamente modificado. La hipótesis de este trabajo fue que la optimización de estos ensayos permitirá usarlos como método de rutina para el análisis de OGMs. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue optimizar ensayos de ddPCR para el análisis de transgenes en maíz y generar módulos *multiplex* de detección. Por medio de un análisis bioinformático se evaluó la aplicabilidad de los oligonucleótidos, posteriormente con gradientes se determinó una temperatura de hibridación/elongación óptima, así mismo, se evaluó la concentración de oligonucleótidos, la recuperación de gotas y el efecto "lluvia". La optimización se verificó por medio de ensayos *dúplex*, y finalmente se desarrollaron módulos *multiplex*. La temperatura que permitió una separación clara entre clústeres de gotas positivas y negativas para los 11 ensayos *simplex* fue 58.5°C, con concentraciones relativamente bajas de oligonucleótidos y sondas. Las gotas recuperadas resultaron adecuadas según el propósito de los análisis y la "lluvia" obtenida resultó irrelevante. En los ensayos *dúplex* se confirmó el potencial para la cuantificación sin usar curvas de calibración, ya que la mayoría de los ensayos estuvieron en concordancia con los reportes de validación o con los porcentajes teóricos de variabilidad genética. Por último, en los módulos *multiplex* se realizaron variaciones en la concentración de oligonucleótidos y sondas para diferenciar clústeres de gotas positivas en un solo canal detector. Las mejores diferencias se lograron con concentraciones con diferencias de 1:3. Los resultados mostraron que los ensayos optimizados son adecuados para la detección y posible cuantificación de 10 transgenes en maíz.

Abstract

The planting, commercialization and consumption of transgenic corn is a matter of debate in Mexico since it is considered the center of origin and distribution of native grain. Digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) has been shown to be more efficient than the gold standard for the analysis of modified corn. The hypothesis of this work was that the optimization of these tests will allow them to be used as a routine method for the analysis of GMOs. Therefore, the objective was to optimize ddPCR assays for the analysis of transgenes in corn and to generate multiplex detection modules. Through a bioinformatic analysis the applicability of the oligonucleotides was evaluated, later an optimal hybridization / elongation temperature was determined through temperature gradients, likewise, the concentration of oligonucleotides, the recovery of drops and the "rain effect" were evaluated. The optimization was verified through duplex tests, and finally multiplex modules were developed. The temperature that allowed a clear separation between positive and negative droplet clusters for the 11 *simplex* assays was 58.5 ° C, with relatively low concentrations of oligonucleotides and probes. The recovered droplets were adequate according to the purpose of the analysis and the "rain" obtained was irrelevant. In the duplex assays, the potential for quantification without using calibration curves was confirmed, since most of the assays agreed with the validation reports or with the theoretical percentages of genetic variability. Finally, in the multiplex modules, variations were made in the concentration of oligonucleotides and probes to differentiate clusters of positive droplets in a single detector channel. The best differences were achieved with concentrations with differences of 1: 3. The results showed that the optimized assays are suitable for the detection and possible quantification of 10 transgenes in corn.

Introducción

El avance biotecnológico y el desarrollo de técnicas como el ADN recombinante ha generado un sin fin de posibilidades, entre ellas la de generar organismos genéticamente modificados (OGMs), a los cuales se les ha insertado un fragmento de ADN con el fin de que expresen proteínas que les confieran cualidades de interés agrícola, industrial, nutricional, etc.

En el caso de las plantas modificadas genéticamente estas cualidades se reflejan principalmente en la resistencia a herbicidas, plagas o ambientes desfavorables, o bien para aumentar su rendimiento y producción.

Una de las plantas que más se ha modificado es el maíz, ya que se consume ampliamente a nivel mundial en sus distintas variedades y sus subproductos tienen gran importancia en muchos sectores de la industria.

Sin embargo, la generación de tantas variedades de maíz transgénico y el comercio internacional de las mismas es motivo de debate, principalmente en México que al ser centro de origen y de distribución del maíz, debe tener un buen y amplio sistema de vigilancia para monitorear zonas donde se siembran variedades nativas.

Para estos fines uno de los métodos más utilizados para la detección de organismos genéticamente modificados es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Esta técnica permite la detección de un fragmento específico de ADN al amplificarlo de manera exponencial, en el caso de los productos modificados genéticamente los que se amplifica es el transgén de interés.

En los últimos años ha destacado la PCR digital por gotas (ddPCR) como una opción para la detección de transgenes, esta técnica ofrece ventajas importantes respecto a la PCR tiempo real (qPCR), por ejemplo, no está limitada por la necesidad de una curva de calibración y es más tolerante a inhibidores.

Ante la necesidad de contar con métodos de detección cada vez más específicos, en este trabajo se desarrollarán métodos de PCR digital para la detección *simplex* y *multiplex* de eventos de modificación genética de maíz.

Marco teórico

Maíz

Es una planta nativa de América cuyo centro original de domesticación se cree fue hace más de 8000 años en Mesoamérica, principalmente en el centro y sur de México (Acosta R, 2009).

Es de aspecto robusto, con un solo tallo de gran longitud, sin ramas, pudiendo alcanzar hasta 4 metros de altura (Figura 1). Al cortar presenta una médula esponjosa. La inflorescencia masculina es un penacho amarillo que puede almacenar hasta 25 millones de granos de polen, contrario de la femenina, que solo puede llegar a contener mil, y se forman en unas estructuras vegetativas llamadas espádices. Las hojas son largas y grandes, con terminación en forma de punta, con extremos afilados y vellosidades en la parte más alta (SAGARPA, SIAP., 2019).



Figura 1. Planta de maíz. (Mendoza-Pérez, 2018).

Es la base de la alimentación mexicana con un consumo anual per cápita de 345.6kg y es considerado como un elemento estratégico en la soberanía y seguridad alimentaria de México (González *et al.*, 2016).

En términos comerciales y de producción, México ocupa el 7° lugar como productor de grano de maíz a nivel mundial, con una producción de 27,169,400 toneladas en el 2018 y una participación nacional en la producción de granos del 89%, sin embargo, esta producción no es suficiente para cubrir la demanda nacional, por lo que es necesaria la importación de maíz. México importa maíz, principalmente de grano amarillo, de Estados Unidos, Brasil, Argentina, Australia, Hungría, e India. Siendo Estados Unidos el principal proveedor con casi el 100%.

Por otro lado, en cuanto a las exportaciones, el principal cliente de México es Venezuela, otros clientes son Estados Unidos, El Salvador, Guatemala, Costa Rica, Canadá, Cuba y países europeos, entre los que destacan Italia, Reino Unido, Dinamarca y Países Bajos (Figura 2) (SAGARPA, SIAP., 2019).

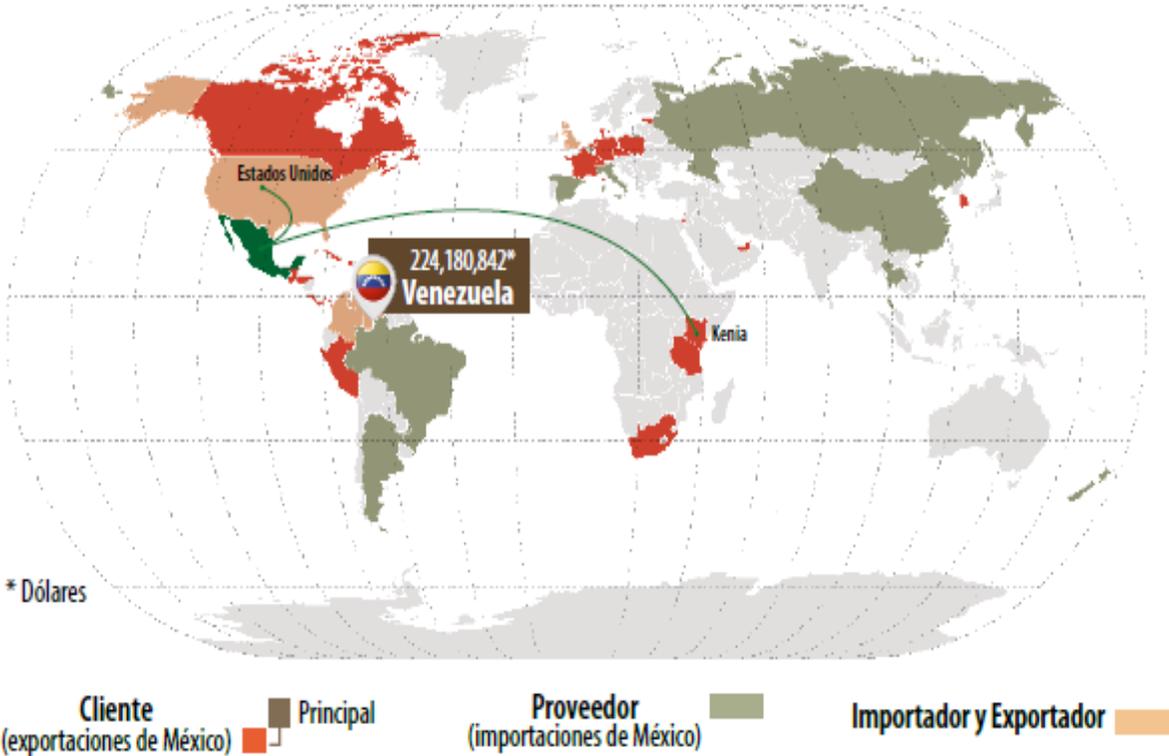


Figura 2. Comercio internacional de maíz en México (SAGARPA, SIAP., 2019).

Variedad y flujo genético

La transferencia y reorganización del material genético en un genoma es un proceso natural que ocurre todos los días en la naturaleza. Este proceso incluye al maíz, el cual es interfértil entre todas sus variedades, sean modificadas genéticamente o no (Álvarez-Buylla, 2013).

En México se tienen documentadas 64 razas de maíz, variedades que se derivan del ancestro común teocinte (figura 3), las modificaciones en su constitución genética se deben a su dispersión por el territorio mexicano, a las distintas condiciones medio ambientales, variedad de siembra, y a las preferencias de consumo de diversos grupos humanos. La diversidad genética de estos maíces criollos en México se ha mantenido principalmente por ser un elemento básico en la alimentación de grupos indígenas y comunidades rurales, así como por su uso en campos agrícolas (Perales., 2008; González *et al.*, 2016).



Figura 3. Teocinte (izq.), híbrido (centro), maíz moderno (der.) (Doebley J, 2001)

No obstante, la interfertilidad entre maíces puede provocar la aparición de material transgénico en el germoplasma de cultivos y productos criollos o silvestres no transgénicos, este flujo genético se da principalmente por dos factores: polinización cruzada y mezcla de semillas (Spendeler L., 2005). Así mismo, la introgresión de transgenes en las variedades criollas depende principalmente de dos factores: deriva genética y selección. El proceso de deriva es aleatorio y puede resultar en la pérdida o bien la ganancia de transgenes en las plantas. Por otro lado, el impacto de la selección en la introgresión dependerá de cómo el nuevo transgén y otros genes relacionados a él contribuyan en la supervivencia de las propias plantas (Mercer et al, 2008).

Organismos genéticamente modificados

A partir del surgimiento de la tecnología del ADN recombinante fue posible aislar e insertar genes específicos que codifican ciertas características de un organismo en otro. Esta manipulación genética tiene principalmente 3 objetivos. 1. Alterar los niveles de expresión de genes endógenos, 2. Cambiar propiedades biológicas de las proteínas endógenas y 3. Introducir nuevos genes de interés (Gutiérrez Galeano *et al.*, 2015). Tomando como ejemplo a las plantas, si la secuencia de ADN insertada proviene de la misma planta se conoce como intragénico, si proviene de otra planta se conoce como cisgénico y si proviene de una especie diferente se conoce como transgénico (Figura 4) (Gutiérrez Galeano *et al.*, 2015).

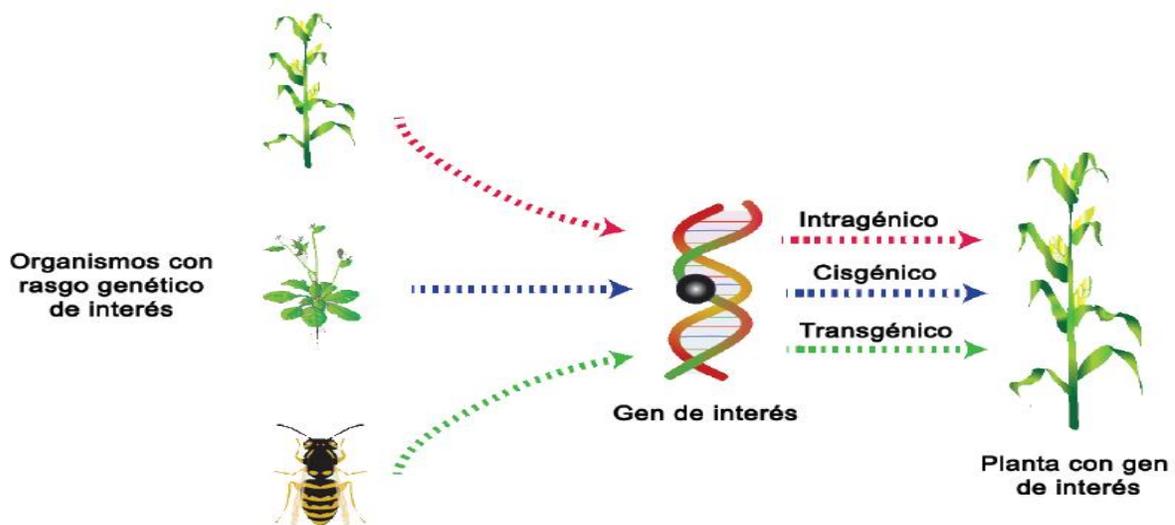


Figura 4. Clasificación de organismos genéticamente modificados (Gutiérrez Galeano *et al.*, 2015)

Para la creación de una planta modificada genéticamente primero se tiene que identificar el gen que confiere la característica de interés, posteriormente el gen tiene que ser aislado, clonado y modificado antes de insertarse en una célula. Para la inserción y expresión de los nuevos genes existen dos maneras. La primera consiste en tecnologías *in vitro* como microinyección de ADN, introducción directa del ADN en el protoplasto y bombardeo con micro proyectiles. La segunda incluye el uso de vectores que introducen el ADN directamente (Figura 5) (Rodríguez *et al.*, 2007).

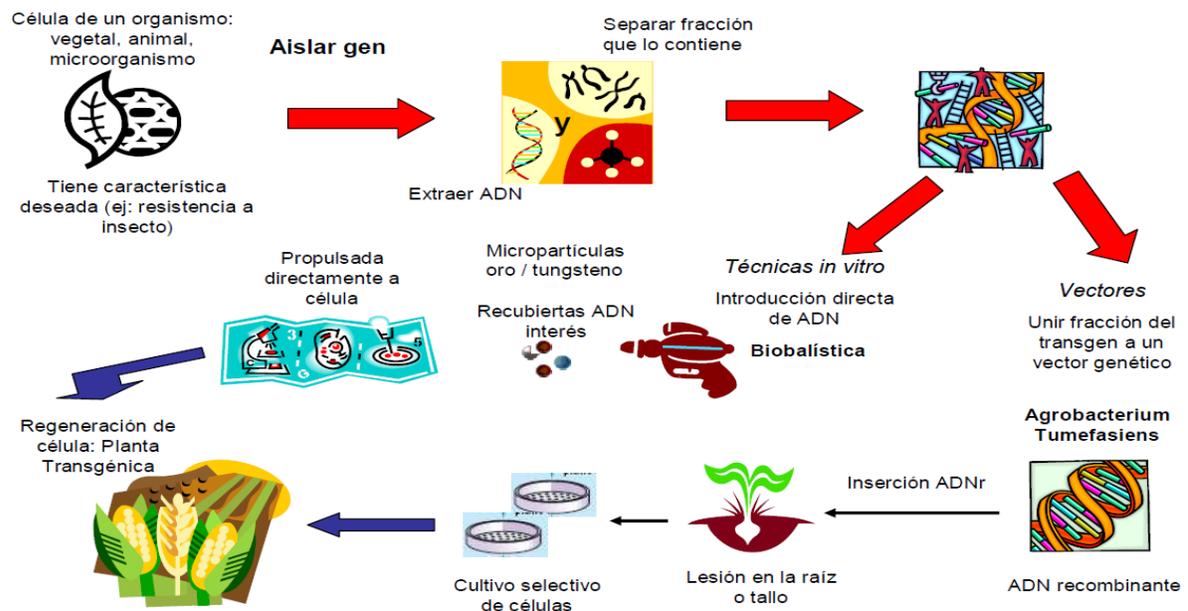


Figura 5. Proceso de desarrollo de plantas modificadas genéticamente (Rodríguez *et al.*, 2007)

Los principales cultivos OGM en el mundo son la soya, el maíz y el algodón, en estos cultivos las principales características que se buscan por ser los de más interés agrícola son la resistencia a plagas y a herbicidas (Trejo *et al.*, 2015). A continuación, se enlistan un par de ejemplos en maíz del mecanismo de acción de las nuevas proteínas expresadas.

Maíz resistente a insectos (Bt)

El maíz Bt es una planta modificada genéticamente a la cual se le ha insertado un gen de la bacteria *Bacillus thuringensis*, que provoca que exprese una proteína Bt tipo cry.

Estas proteínas controlan algunas de las plagas del maíz, como el barrenador del tallo o taladro (*Ostrinia nubilalis*), gusano barrenador del suroeste (*Diatraea grandiosella*), etc. El mecanismo de acción de las proteínas cry es tan específico que solo es efectivo contra las especies antes mencionadas (Agro-Bio, 2005).

Maíz tolerante a herbicidas

El maíz tolerante a herbicidas es un maíz que ha sido mejorado mediante la inserción de transgenes para tolerar la aplicación de ciertos tipos de herbicidas.

Se han desarrollado líneas tolerantes a tres herbicidas, glifosato, glufosinato de amonio e imidazolinonas. Los genes de tolerancia empleados para generar la resistencia a estos herbicidas, en los dos primeros eventos, provienen de bacterias que presentan esta resistencia de manera natural (Agro-Bio, 2005).

Por ejemplo, en el caso de la tolerancia al glifosato, la planta de maíz ha sido modificada con un gen de una bacteria *Agrobacterium* corriente. Estas plantas de maíz producen una proteína EPSPS resistente a la acción de este herbicida. Esto asegura su supervivencia de la planta al continuar la ruta de síntesis de aminoácidos incluso si el glifosato está presente (Monsanto, 2007).

Maíz transgénico en México y comercio internacional

El Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas reporta que, para el consumo humano y procesamiento, se tienen aprobados en México 188 diferentes eventos de modificación genética. De estos, 85 corresponden a maíz, siendo 22 eventos individuales (SYN-E3272-5, DP-ØØ4114-3, SYN-Ø53Ø7-1, DAS-59122-7, DP-Ø9814Ø-6, SYN-BTØ11-1, DAS-4Ø278-9, MON-ØØØ21-9, REN-ØØØ38-3, SYN-IR162-4, SYN-IR6Ø4-5, MON-ØØ81Ø-6, MON-ØØ863-5, MON-87411-9, MON87419-8, MON-8746Ø-4, MON-88Ø17-3, MON-89Ø34-3, SYN-ØØØJG-2, MON-ØØ6Ø3-6, ACS-ZMØØ3-2, DAS-Ø15Ø7-1) y 63 en combinaciones de más de un evento (ISAAA, 2021). Cabe mencionar que para el maíz solo existen aprobaciones para consumo humano y animal, y no así para la siembra de este cereal en territorio mexicano (Gutiérrez *et al.*, 2015).

Referente al comercio internacional, la importación de maíz transgénico para consumo humano y animal fue aprobada desde el 2002 por la COFEPRIS, siendo la resistencia

a herbicidas e insectos los principales eventos de modificación genética aprobados (Rodríguez., 2007). Como se mencionó anteriormente, casi el 100% de este grano importado proviene de Estados Unidos, país que ocupa el primer lugar en producción de OGM a nivel mundial y en el cual estos productos no son sometidos a tratamientos especiales, como etiquetado por la presencia de secuencias de ADN modificadas o la separación de otros granos no transgénicos (Trejo *et al.*, 2015).

Por otro lado, las exportaciones a la Unión Europea tienen especial importancia ya que estas regiones tienen un control estricto en cuanto a la comercialización de productos genéticamente modificados. La regulación 1829/2003 indica que los alimentos que contienen o consisten en OGMs o que se producen a partir de ingredientes que contienen OGMs se deben etiquetar como tales siempre que superen el 0.9% de OGMs por ingrediente (Dobnik *et al.*, 2015). Actualmente existen en la Unión Europea 52 eventos de modificación genética aprobados en maíz, de los cuales 15 son considerados eventos simples y los 37 restantes son combinaciones de eventos (ISAAA, 2021).

En la tabla 1 se describen 10 de los eventos aprobados tanto en la Unión Europea como en México, en la que además se reportan los genes de interés, el organismo del que proceden y el objetivo de la modificación (ISAAA, 2021).

Tabla 1. Eventos de modificación genética de interés para este trabajo

Evento	Genes	Organismo de procedencia	Función
DAS-59122-7	<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Elimina la actividad herbicida de los herbicidas glufosinato
	<i>cry34Ab1</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain PS149B1	Confiere resistencia a los insectos coleópteros
	<i>cry35Ab1</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain PS149B1	Confiere resistencia a los insectos coleópteros
SYN-BTØ11-1	<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Elimina la actividad de los herbicidas glufosinato
	<i>cry1Ab</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	Confiere resistencia a los insectos lepidópteros
MON-ØØØ21-9	<i>mepsps</i>	<i>Zea mays</i>	Confiere tolerancia a herbicidas de glifosato
SYN-IR162-4	<i>vip3Aa20</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain AB88	Confiere resistencia al daño por alimentación causado por insectos lepidópteros
	<i>pmi</i> *	<i>Escherichia coli</i>	Metaboliza la manosa y permite la selección positiva para la recuperación de plantas transformadas
MON-ØØ81Ø-6	<i>cry1Ab</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	Confiere resistencia a los insectos lepidópteros

	<i>goxv247</i> *	<i>Ochrobactrum anthropi</i> strain LBAA	Confiere tolerancia a los herbicidas de glifosato
	<i>cp4 epsps (aroA:CP4)</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain CP4	Disminuye la afinidad de unión por el glifosato
	<i>nptII</i> *	<i>Escherichia coli</i> Tn5	Permite que las plantas transformadas metabolicen los antibióticos neomicina y kanamicina durante la selección
MON-ØØ863-5	<i>cry3Bb1</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i>	Confiere resistencia a los insectos coleópteros
	<i>nptII</i> *	<i>Escherichia coli</i> Tn5	Permite que las plantas transformadas metabolicen los antibióticos neomicina y kanamicina durante la selección
MON-88Ø17-3	<i>cp4 epsps (aroA:CP4)</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain CP4	Disminuye la afinidad de unión por el glifosato
	<i>cry3Bb1</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i>	Confiere resistencia a los insectos coleópteros
MON-ØØ6Ø3-6	<i>cp4 epsps (aroA:CP4)</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain CP4	Disminuye la afinidad de unión por el glifosato
DAS-Ø15Ø7-1	<i>cry1Fa2</i>	Forma sintética del gen <i>cry1F</i> derivado de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	Confiere resistencia a los insectos lepidópteros

Continuación tabla 1.

	<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Elimina la actividad herbicida de los herbicidas glufosinato
SYN-IR6Ø4-5	<i>mcry3A</i>	Forma sintética del gen <i>cry3A</i> derivado de <i>Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis</i>	Confiere resistencia a los insectos coleópteros
	<i>pmi</i> *	<i>Escherichia coli</i>	Metaboliza la manosa y permite la selección positiva para la recuperación de plantas transformadas

*Marcador de selección/reportero

Detección de organismos genéticamente modificados

En muchos países la comercialización de organismos genéticamente modificados esta estrictamente controlada y regulada, por lo tanto, el monitoreo y trazabilidad, así como métodos capaces de detectar OGMs en materias primas y alimentos procesados son necesarios (Datukishvili *et al.*, 2015; Broeders *et al.*, 2014).

Tradicionalmente el análisis de organismos genéticamente modificados incluye un ensayo de detección cualitativa o de presencia/ausencia (*screening*), seguida de identificación y cuantificación del transgén. El análisis cualitativo es crucial en el análisis de OGMs ya que solo las muestras que resultan positivas pasan por análisis de identificación y cuantificación de OGMs (Datukishvili *et al.*, 2015).

Los métodos de detección de organismos genéticamente modificados se basan principalmente en la detección de la secuencia de nucleótidos del transgén insertado o en la detección de las nuevas proteínas expresadas debido al transgén. (Núñez., 2011).

Detección de proteínas

Se basa en la detección de la nueva proteína sintetizada por el gen inducido. Estos métodos de detección se basan principalmente en inmunoensayos. Los

inmunoensayos son técnicas que se basan en la unión de anticuerpos con antígenos específicos. En el caso de plantas transgénicas, el antígeno es la nueva proteína expresada por el transgén. Sus principales ventajas son su gran especificidad y rapidez, sin embargo, requieren el desarrollo de anticuerpos sumamente específicos para la proteína que se pretende detectar, además de que la misma debe tener un nivel alto de integridad y estar presente en niveles que permitan su detección (Bonfini *et al.*, 2001).

Detección de ADN

Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa es una de las técnicas más importantes y revolucionarias en biología molecular, ya que permite obtener millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una sola molécula diana (Figura 6) (Serrato *et al.*, 2014).

El fundamento de esta técnica se basa en la amplificación de una secuencia específica de ADN que es delimitada por un par de oligonucleótidos (*forward* y *reverse*). Esta técnica aprovecha la capacidad de la enzima ADN polimerasa de sintetizar el ADN de las células (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Los elementos necesarios para que la PCR se lleve a cabo son: una cadena de ADN que servirá como molde para sintetizar una nueva cadena; oligonucleótidos, que delimitan el fragmento a replicarse; dNTP's, con los que se sintetizará la nueva cadena a partir de la cadena molde; ADN polimerasa, la cual es una enzima que elonga la cadena naciente con la adición de nucleótidos correspondientes; buffer, como solución amortiguadora y MgCl₂, usado como cofactor de la ADN polimerasa.

En el caso de la PCR tiempo real (qPCR) y PCR digital por gotas (ddPCR) se utilizan sistemas de detección, por ejemplo, sondas específicas basadas en el principio FRET (*Flourescence Resonance Energy Transfer* por sus siglas en inglés), que consiste en la transferencia de energía entre dos fluoróforos: un reportero y un apagador, los cuales emiten fluorescencia a diferente longitud de onda. Cuando el reportero y el apagador están próximos, el apagador absorbe la fluorescencia del primero. Cuando

estas moléculas se separan (por la extensión de la secuencia diana), la fluorescencia del reportero no puede ser absorbida por el apagador y por ende puede ser detectada por el equipo detector de fluorescencia, pudiendo hacer una cuantificación del contenido de OGM a partir de esto (Aguilera *et al.*, 2014)

Una vez realizada la mezcla, esta se somete a una repetición de varios ciclos a diferentes temperaturas que sustituyen a la mayoría de las proteínas requeridas en la replicación celular (Serrato *et al.*, 2014). La reacción suele requerir entre 30 y 40 ciclos, los cuales constan de las siguientes etapas:

Desnaturalización: Esta etapa se lleva a cabo generalmente a 95°C, durante esta etapa las cadenas de ADN se desnaturalizan (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Los puentes de hidrogeno que las unían se rompen, quedando dos cadenas que servirán como molde para la formación de cadenas complementarias de ADN (Serrato *et al.*, 2014).

Alineación: La temperatura óptima oscila entre 50-60°C, a esta temperatura los oligonucleótidos se unen al extremo 3' de la cadena e hibridan con su secuencia complementaria (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Extensión: La Taq polimerasa actúa agregando dNTP's complementarios creando así cadenas completas de ADN (Tamay de Dios *et al.*, 2013). La cadena se sintetiza en el sentido 5' a 3' y la temperatura se incrementa a 72°C, ya que esta es la temperatura óptima de acción de la ADN polimerasa (Serrato *et al.*, 2014).

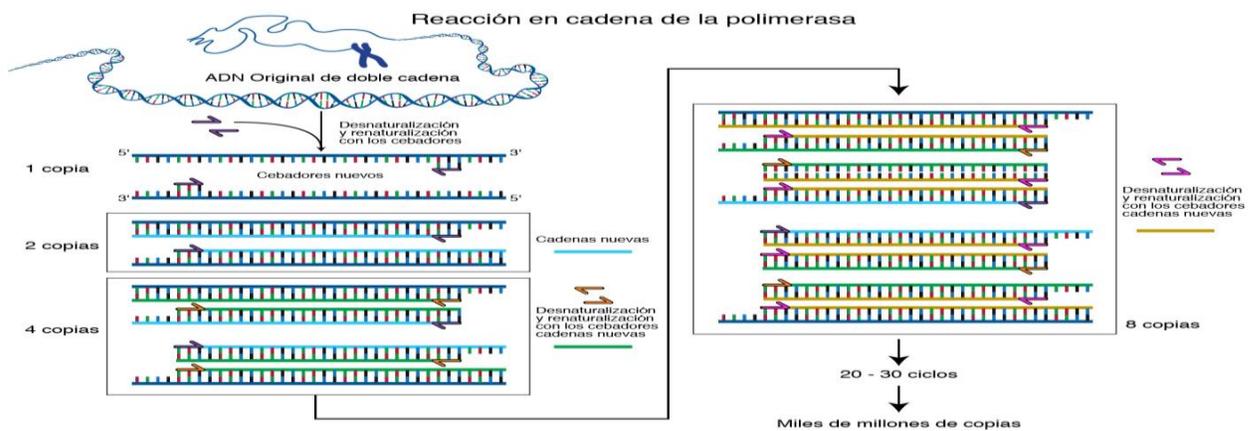


Figura 6. Reacción en cadena de la polimerasa. El gen de interés se amplifica exponencialmente durante distintos ciclos de temperatura (NHGRI, s.f).

Para la identificación y cuantificación de organismos genéticamente modificados, actualmente la qPCR es considerada el estándar de oro (Burns *et al.*, 2010; Broeders *et al.*, 2014).

En la qPCR se utilizan curvas de calibración para estimar el contenido de OGMs de muestras desconocidas. Las curvas de calibración se construyen utilizando diluciones de estándares de referencia de concentración conocida del analito de interés, en este caso el transgén. Sin embargo, el uso de curvas de calibración indica que el enfoque de la qPCR es relativo, ya que la medición de la muestra se comparará con la curva para estimar el contenido OGMs. Otra desventaja del uso de las curvas de calibración es que están limitadas por la disponibilidad de materiales de referencia para su uso en estos fines. Además, el uso de una curva de calibración y materiales de referencia suelen significar que la cuantificación del contenido de OGMs de una muestra desconocida está comprometida por aspectos relacionados a la composición de la matriz. Esto sucede cuando se presenta un sesgo en un resultado porque la matriz en el estándar y la muestra desconocida son diferentes y, esto, por lo tanto, afecta la eficiencia de la PCR y la respuesta de la estimación de esta (Burns *et al.*, 2010).

PCR digital por gotas

La PCR digital por gotas (ddPCR por sus siglas en inglés) permite la cuantificación absoluta al contar las moléculas de ADN encapsuladas en pequeñas gotas de un volumen determinado formadas por una emulsión de mix de reacción y aceite (Bio-Rad, s.f.-a)

La reacción se prepara de manera similar a la qPCR y se utilizan también sondas marcadas con reporteros fluorescentes FAM o HEX/VIC, a diferencia de la qPCR, la mezcla de reacción de la ddPCR es fraccionada en miles de pequeñas gotas que son analizadas individualmente (Gerdes *et al.*, 2016). Cada gota es catalogada como positiva (que contiene el analito de interés) o negativa (no contiene el analito de interés) según su nivel de fluorescencia vs un umbral establecido. Con el volumen promedio de cada gota se puede determinar la concentración de moléculas de ADN en la mezcla de PCR (sin la necesidad de curvas de calibración) utilizando la distribución de Poisson (ecuación 1), la cual toma en cuenta la probabilidad de que cada gota contenga cero,

una, o más de una molécula de ADN diana para estimar el número promedio de moléculas por gota (Hindson *et al.*, 2013; Pinheiro *et al.*, 2018),

Distribución de Poisson

$$\text{ADN objetivo} = -\ln\left(1 - \frac{N_p}{N_t}\right) \frac{1}{V_p} \quad (1)$$

ADN objetivo= número de moléculas de ADN por unidad de volumen de la mix de PCR

N_p= número de particiones positivas

N_t= número total de particiones

V_p= volumen promedio de cada partición

Una ventaja que ofrece esta técnica es que la presencia alta de inhibidores suele tolerarse sin comprometer la precisión del ensayo, ya que esta depende únicamente de la capacidad de distinguir gotas negativas y positivas, y esto suele ser posible incluso si la eficiencia se ve disminuida. Además, la posibilidad de efectos inhibidores debido a reactividad cruzada se reduce en gran medida por el propio proceso de partición en gotas, en otras palabras, se podrán inhibir algunas gotas, pero no el ensayo completo (Pinheiro *et al.*, 2018).

Flujo de trabajo de la ddPCR

Preparación de la reacción: se prepara igual que en un ensayo de PCR tiempo real, sin embargo, las diferencias radican en el uso de sondas con apagadores que no emiten fluorescencia, así mismo se utiliza un “*supermix*” formulado específicamente.

Generación de gotas: el mix de reacción es transferido a un cartucho especial en el que se deposita además un aceite que formara la emulsión con la mezcla de reacción (Figura 7), este cartucho se cubre con un protector plástico y se transfiere al equipo generador de gotas.



Figura 7. Cartucho especial para la formación de nano gotas, en este se deposita el mix de reacción y el aceite especial (Bio-Rad, s.f.-a).

El equipo generador de gotas emulsionará el aceite con la mezcla de reacción, generando así hasta 20,000 gotas por muestra (Figura 8).

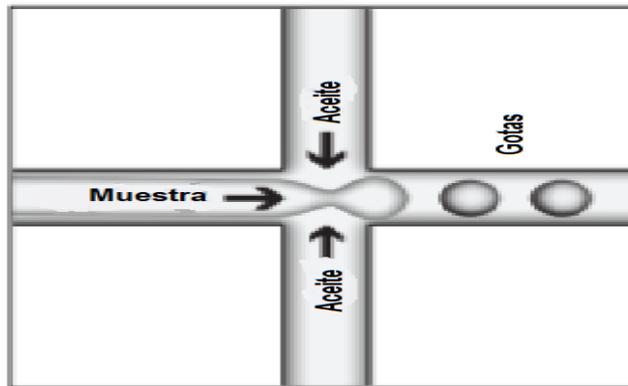


Figura 8. Generación de nano gotas. el equipo generador de gotas realiza una emulsión entre el mix de reacción y el aceite (Bio-Rad, s.f.-a)

Amplificación del ADN blanco: Una vez que las nano gotas han sido formadas se transfieren a una placa de PCR (hasta 96 muestras por placa). Posteriormente la placa se transfiere a un termociclador y se ejecuta un programa térmico de entre 35 y 40 ciclos con temperaturas específicas en los que se realizan pasos de desnaturalización, hibridación y elongación.

Lectura de gotas: Una vez terminado el programa térmico, la placa de PCR es transferida al equipo lector de gotas. Cada gota se analiza de manera individual por el detector óptico del equipo, el cual determina la fluorescencia de cada gota. Las gotas positivas contienen al menos una copia del ADN de interés, por lo que muestran un aumento en el nivel de fluorescencia con respecto a las gotas negativas (Figura 9). El software "*Quantasoft*" cuenta el número de gotas positivas y negativas por fluoróforo, por muestra.

En la figura 10 se observa el proceso simplificado del flujo de trabajo de la ddPCR.

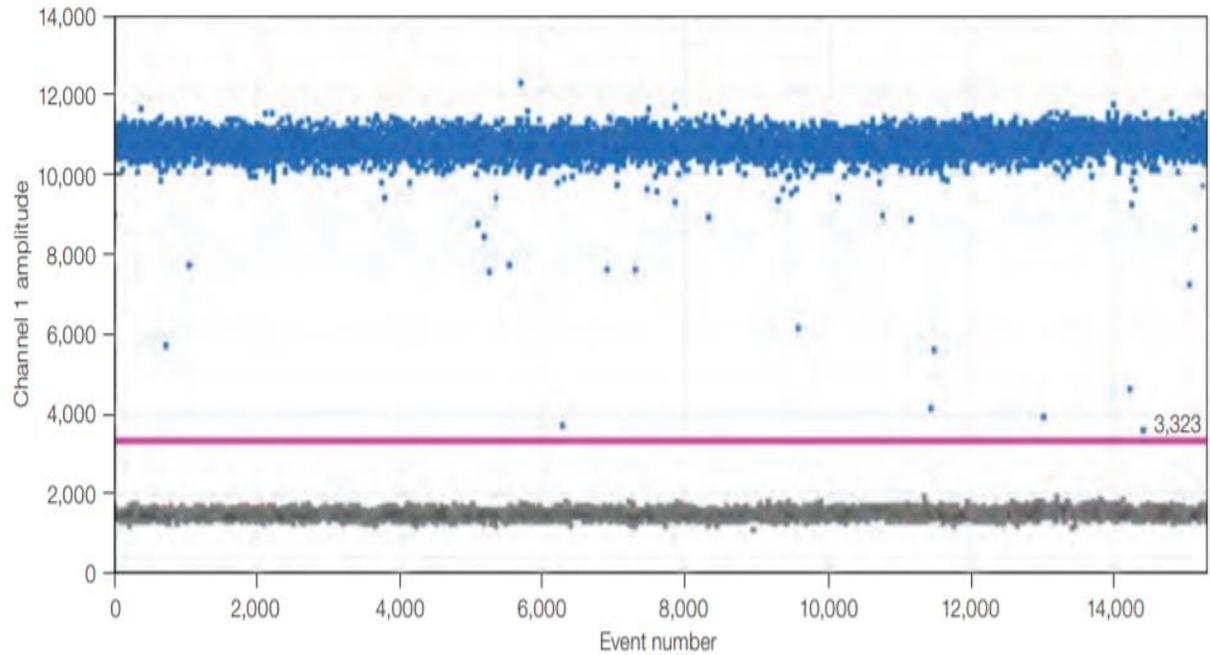


Figura 9. Clasificación de gotas. Las gotas se clasifican según su nivel de fluorescencia. Las gotas positivas (azules) superan el umbral de fluorescencia (línea rosa), mientras que las gotas negativas (grises) no (Bio-Rad, s.f.-a).

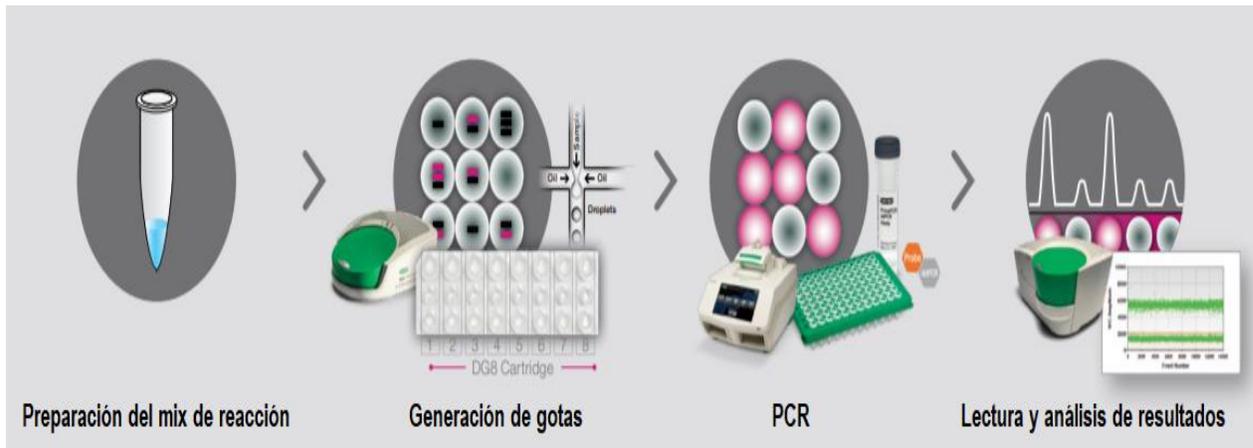


Figura 10. Flujo de trabajo ddPCR (Bio-Rad, s.f.-b).

Multiplexing basado en amplitud

En un ensayo *multiplex* basado en amplitud, los analitos de interés se detectan con oligonucleótidos y sondas conjugadas con un solo marcador fluorescente, pero con

una concentración final distinta entre cada analito. Esta estrategia se puede modificar para analizar tres o más objetivos por reacción (Figura 13) (Whale et al., 2016).

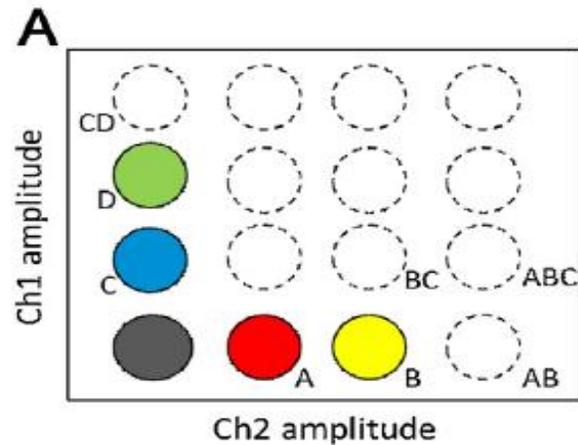


Figura 11. PCR digital por gotas "tetraplex" con concentraciones relativas de sondas de 50 y 100% para ambos canales. "A" tiene una concentración de sonda del 50% para el "Ch2", mientras que "B" tiene una concentración del 100% para el mismo canal. "C" tiene una concentración de sonda del 50% para el "Ch2", mientras que "D" tiene una concentración del 100% para el mismo canal (Whale et al., 2016).

Puesto que la señal corresponde a la acumulación de objetivos (gotas positivas) y no a la longitud de los amplicones, es posible discriminar entre cada clúster de gotas positivas por la amplitud que generan al contener distintas concentraciones de oligos y sondas (Dobnik *et al.*, 2016).

Análisis bioinformático

PCR *in silico*

El análisis de PCR *in silico* es una herramienta adicional para asegurar la especificidad de los oligonucleótidos. En la PCR *in vitro* se usan oligonucleótidos con longitudes entre 18 y 30 nucleótidos, lo que teóricamente confiere una alta especificidad en el ensayo, sin embargo, esta predicción puede no ser real en genomas complejos. Resolver un problema de amplificaciones inespecíficas mediante PCR *in vitro* no es práctico, además de que requeriría de mucho tiempo y dinero (Wu-Yi., 2014).

La PCR *in silico* es una PCR que se ejecuta de manera virtual en un software, en la que se observa la correcta hibridación de uno o más juegos de oligonucleótidos en un genoma deseado o en una base de datos. La PCR *in silico* tiene como objetivo probar

la especificidad de la PCR, así como determinar la ubicación y el tamaño del amplicón esperado, además de identificar posibles desajustes en los sitios de unión del oligo y/o amplicones no deseados (dímeros, heterodímeros, hairpins, etc.) (Yu y Zhang., 2011).

Antecedentes

El desarrollo del marco legal en México inicio en 1986, cuando empezó la investigación de plantas genéticamente modificadas en el país; siendo hasta 1996 cuando inicio la etapa experimental de algodón y soya transgénica (AgroBio México., 2012).

Posteriormente se crea la CIBIOGEM en el año 1999, institución encargada de coordinar las políticas relativas a la bioseguridad y a la producción, comercialización, consumo y en general, uso y aprovechamiento de organismos genéticamente modificados.

En el año 2005 coordina la implementación de la ley de bioseguridad de los organismos genéticamente modificados. Esta ley busca prevenir, evitar y reducir los posibles riesgos que las actividades relacionadas con los organismos genéticamente modificados puedan causar (AgroBio México., 2012).

Internacionalmente, en el año 2003 entra en vigor el protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología, el cual tiene como objetivo establecer las regulaciones y medidas para garantizar que los movimientos transfronterizos de transgénicos se den de manera segura (Academia mexicana de ciencias., 2007).

Más recientemente en los años 2013 y 2014 surgen las normas oficiales mexicanas NOM-164-SEMARNAT/SAGARPA-2013 y NOM-001-SAG/BIO-2014 sobre reporte de resultados de liberaciones de OGMs, así como el etiquetado de semillas modificadas genéticamente respectivamente.

Ensayos de vigilancia en maíces mexicanos

Ante el inmenso debate sobre los potenciales peligros del uso de organismos genéticamente modificados y en especial sobre la liberación de estos en el ambiente, es necesario aportar evidencia científica sólida, especialmente cuando existen casos como los que se mencionan a continuación en donde existen discrepancias entre estudios realizados en las mismas zonas:

En el año 2001 se dio a conocer un estudio sobre la presencia de secuencias transgénicas en variedades de maíz criollas cultivadas en la región Sierra Juárez en Oaxaca. En este estudio se encontraron transgenes en aproximadamente el 1% de los granos recolectados de cuatro campos en dos comunidades (Quist y Chapela., 2001) Posteriormente en los años 2003 y 2004 se hicieron más análisis en esta misma región a un número más grande de muestras (125 campos en 18 localidades). En este estudio no se pudo confirmar la presencia de transgenes en los maíces (Ortiz-García *et al.*,2005).

De estos trabajos surgieron varias conclusiones, se consideró que las discrepancias en los resultados podían ser ocasionadas por la disminución de las semillas transgénicas que ingresan a la región, que el retrocruzamiento entre plantas transgénicas con plantas no transgénicas redujo la frecuencia de transgenes, que los transgenes se perdieron al azar debido a la deriva genética o incluso por diferencias en las metodologías o errores en el muestreo.

Sin embargo, para el año 2009 se publicó un nuevo estudio en el que se analizaron muestras de maíz recolectadas en la sierra Juárez en Oaxaca en los años 2001, 2002 y 2004. Los resultados confirmaron la presencia de transgenes en muestras del año 2001 con una frecuencia relativamente baja (0.011 %). Por otro lado, no se detectó la presencia de transgenes en las muestras del año 2002; pero si se encontró nuevamente en las muestras del 2004 que dos de las localidades positivas de 2001 contenían secuencias transgénicas, lo que sugería la persistencia o reintroducción de transgenes (Piñeyro *et al.*, 2009).

Como se mencionó anteriormente la introgresión de transgenes depende principalmente de la deriva genética y de la selección, por tanto, cada caso tiene que analizarse de manera individual, así mismo la aparición de transgenes en determinada zona no garantiza la persistencia de estos.

Lo que si es necesario es establecer criterios moleculares y de muestreo para garantizar un correcto monitoreo de organismos genéticamente modificados.

ddPCR como método de detección y cuantificación de OGMs

En el contexto internacional, para demostrar la aplicabilidad del método para el análisis de OGMs, Morisset y colaboradores (2013) realizaron un ensayo dúplex de ddPCR y qPCR para la detección del evento MON810 y un gen endógeno de maíz. Con el ensayo de ddPCR obtuvieron mejor repetibilidad a concentraciones bajas y menor susceptibilidad a contaminantes, incluso encontraron esta técnica económicamente más barata al analizar un gran número de muestras de manera simultánea.

Dobnik y colaboradores (2015) implementaron dos métodos ddPCR (*tetraplex* y *decaplex*) de detección y cuantificación *multiplex* para la detección de 12 eventos de modificación genética de maíz autorizados en la Unión Europea. Ambos ensayos produjeron resultados específicos para la detección de los eventos previstos y cumplieron con las recomendaciones internacionales para la detección de OGMs. De igual manera el rendimiento y rentabilidad del método ddPCR fue superior en comparación a ensayos de qPCR.

Por otro lado, en el contexto nacional, se realizó en México por Gutiérrez Angoa y colaboradores (2015) un ensayo de qPCR y un ensayo de ddPCR para la cuantificación del evento MON810 en maíz genéticamente modificado. Aunque ambas técnicas lograron cumplir con los criterios de validación establecidos, la técnica ddPCR mostró resultados más exactos sin la necesidad de una curva de calibración.

Así mismo, en el año 2012 el centro nacional de referencia de detección de OGMs (CNRDOGM) obtuvo el reconocimiento para la técnica de ddPCR como método de detección de OGMs, teniendo 2 ensayos *simplex* (hmgA-tnos y hmgA-GA21) y 2 ensayos *dúplex* (hmgA-DAS59122-7 y hmgA-DAS1507-1) para la detección y cuantificación de eventos de modificación genética en maíz. (SENASICA, 2017).

Planteamiento del problema

El avance de la tecnología ha generado técnicas como la PCR digital, para el análisis de organismos genéticamente modificados, esta nueva técnica ha demostrado ser superior que su antecesora, sin embargo, al ser un método relativamente nuevo, es necesario estandarizar y optimizar los ensayos de detección y cuantificación.

Al momento de desarrollar un método basado en PCR, se tienen que considerar ciertos factores, ya que la capacidad de detección y cuantificación depende en gran medida de los oligonucleótidos, su concentración en la master mix y de las temperaturas de hibridación/elongación en el programa térmico.

Además, en un ensayo de detección multiplex, es imprescindible estandarizar las concentraciones de oligonucleótidos y sondas, y hacer un análisis para confirmar que dichos juegos de oligonucleótidos puedan ser usados en este tipo de ensayos, y con esto eliminar la posibilidad de formación de dímeros o productos secundarios que puedan ser confundidos con falsos positivos.

Justificación

Actualmente en México están aprobados por la COFEPRIS solo 22 eventos simples de maíz genéticamente modificado, únicamente para consumo humano y animal, quedando prohibida la siembra de este grano modificado. Sin embargo, han existido casos de introgresión de transgenes en campos de maíz mexicano, en los que la principal causa parece ser el uso (para siembra) de granos provenientes de países como Estados Unidos y Canadá, dos de los principales productores de organismos genéticamente modificados, y en los que estos productos no están regulados.

Es por esto por lo que a partir de que iniciaron en México los procesos de investigación, desarrollo, liberación al ambiente y comercio de organismos genéticamente modificados, ha sido necesario contar con métodos que permitan la detección, identificación y cuantificación de transgenes en alimentos, ya que se mejora el sistema de rastreabilidad y por ende se refuerzan las medidas de seguridad en caso de presencia de eventos no permitidos en piensos y alimentos, o de introgresión de transgenes. Así mismo, se refuerza el comercio internacional de este grano, ya que México exporta maíz a países de la Unión Europea en los que se deben etiquetar ingredientes y alimentos que superen el 0.9% de contenido de organismos genéticamente modificados, por lo que la presencia de transgenes en maíces mexicanos podría condicionar la exportación de estos.

En relación con los ensayos para el análisis de organismos genéticamente modificados, la ddPCR ha demostrado ser superior a la qPCR (actual estándar de oro para la cuantificación de transgenes), ya que ofrece resultados más exactos, tiene mejor repetibilidad con concentraciones bajas del analito de interés, es menos susceptible a contaminaciones e inhibiciones y no depende de una curva de calibración para efectuar la cuantificación de transgenes.

Así mismo, los ensayos *multiplex* permiten la amplificación simultánea de varios analitos de interés en una sola reacción, por lo que se ahorra tiempo y dinero.

Hipótesis

Los métodos optimizados serán adecuados para la detección y cuantificación de los siguientes eventos de modificación genética en maíz: Das59122, Bt11, Nk603, Mir604, Mir162, Mon810, Das1507, Ga21, Mon863 y Mon88017.

Objetivos

Objetivo general:

Desarrollar métodos de ddPCR (PCR digital por gotas) para la detección y cuantificación de 10 transgenes de interés en maíces.

Objetivos específicos:

- Corroborar mediante análisis bioinformáticos la aplicación de los oligonucleótidos y sondas seleccionadas en ensayos *simplex* y *multiplex*.
- Estandarizar métodos de ddPCR *dúplex* para la detección y cuantificación de 10 eventos específicos de modificación genética en maíces.
- Desarrollar módulos de ddPCR *multiplex* para la detección de transgenes

Metodología

Muestras

Se utilizaron muestras de maíz provenientes de ensayos de aptitud internacionales organizados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA por sus siglas en inglés) que contenían uno o más transgenes de interés en concentraciones distintas, además se utilizaron 2 materiales de referencia certificados (MRC) obtenidos del *Joint Research Centre* (JRC), (Geel, Bélgica), ERM-BF413d e IRMM-412R-5 para Mon810 y Bt11 respectivamente.

Oligonucleótidos

Los juegos de oligonucleótidos y sondas se sintetizaron en Sigma Aldrich con grado HPLC. Las secuencias fueron obtenidas de una colección de la Unión Europea (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/default.htm>). Las sondas se marcaron con FAM o HEX. El apagador en todas las sondas fue un *Black hole* sin emisión de fluorescencia. La secuencia de los oligonucleótidos y sondas se puede observar en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos usados en este trabajo. Se incluye primer forward, primer reverse y sonda.

Nombre	Secuencia (5'-secuencia-3')
Hmg-f	TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA
Hmg-r	GCTACATAGGGAGCCTTGTCT
Hmg-p	HEX-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-BHQ-1
Bt11-f	GCGGCTTATCTGTCTCAGGG
Bt11-r	CAACTGGTCTCCTCTCCGGA
Bt11-p	6-FAM-CGTGTTCCCTCGGATCTCGACATGT-BHQ-1
Nk603-f	ATGAATGACCTCGAGTAAGCTTGTTAA
Nk603-r	AAGAGATAACAGGATCCACTCAAACACT
Nk603-p	HEX-TGGTACCACGCGACACACTTCCACTC-BHQ-1
Mir604-f	GCGCACGCAATTCAACAG
Mir604-r	GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT
Mir604-p	6-FAM-AGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG-BHQ-1
Mir162-f	GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG
Mir162-r	TGCCTTATCTGTTGCCTTCAGA
Mir162-p	HEX-TCTAGACAATTCAGTACATTA AAAACGTCCGCCA-BHQ-1
Mon810-f	TCGAAGGACGAAGGACTCTAACGT
Mon810-r	GCCACCTTCCTTTTCCACTATCTT
Mon810-p	6-FAM-AACATCCTTTGCCATTGCCAGC-BHQ-1
Das59122-f	GGGATAAGCAAGTAAAAGCGCTC
Das59122-r	CCTTAATTCTCCGCTCATGATCAG
Das59122-p	6-FAM-TTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAA -BHQ-1
Das1507-f	TAGTCTTCGGCCAGAATGG
Das1507-r	CTTTGCCAAGATCAAGCG
Das1507-p	6-FAM-TAACTCAAGGCCCTCACTCCG-BHQ-1
Ga21-f	CGTTATGCTATTTGCAACTTTAGAACA
Ga21-r	GCGATCCTCCTCGCGTT
Ga21-p	6-FAM-TTTCTCAACAGCAGTGGGTCCGGGT-BHQ-1
Mon863-f	TGTTACGGCCTAAATGCTGAACT
Mon863-r	GTAGGATCGGAAAGCTTGGTAC

Continuación tabla 2.

Mon863-p	6-FAM-TGAACACCCATCCGAACAAGTAGGGTCA-BHQ-1
Mon88017-f	GAGCAGGACCTGCAGAAGCT
Mon88017-r	GCCGGAGTTGACCATCCA
Mon88017-p	6-FAM-TCCCGCCTTCAGTTTAAACAGAGTCGGGT-BHQ-1

Métodos o procedimientos

Análisis bioinformático

-Especificidad

Para confirmar la especificidad de los oligonucleótidos y sondas se utilizó la herramienta “*PrimerBlast*” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), en la cual se realizaron alineamientos con cada juego de oligonucleótidos para buscar coincidencias de hibridación en templados similares no deseados en la base de datos del Centro Nacional de Información biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés). Posteriormente, con las herramientas “*JRC GMO amplicons*” (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmoamplicons/>) y “*JRC GMO matrix*” (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmomatrix/>) brindadas por la propia Comisión Europea se corroboró esta información. Finalmente se comparó la información con los reportes técnicos de validación de cada juego de oligonucleótidos.

-Estructuras secundarias

Puesto que el objetivo del presente trabajo era realizar módulos *multiplex*, se evaluó con la herramienta “*OligoAnalyzer*” (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) la probabilidad de formación de estructuras secundarias, de manera más específica la formación de heterodímeros, que para este trabajo se refiere a la molécula formada por la hibridación de dos oligonucleótidos diferentes. Cada oligonucleótido (sondas incluidas) se emparejó con el resto de los oligonucleótidos. Considerando que cada juego de oligonucleótidos consta de un primer forward, un primer reverse y una sonda, se está hablando de un total de 33 oligonucleótidos (10 eventos + 1 gen de referencia), por lo tanto, un total de 1,056 combinaciones.

-PCRs *in silico*

Utilizando el software FastPCR (Kalendar *et al.* 2017), se realizaron PCRs *in silico* para corroborar la correcta hibridación y generación de amplicones de tamaños esperados. Cada juego de oligonucleótidos se evaluó en primera instancia en un ensayo *simplex* y posteriormente en ensayos *multiplex*.

Extracción ADN

El ADN se extrajo de 200mg de muestra usando el kit comercial de extracción *Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food (Promega Madison, Wis.)* siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza se determinaron mediante espectrofotometría con el equipo *NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA)*, para la pureza se utilizó como referencia el índice 260/280. Cada muestra se ajustó a una concentración de 50 ng/ μL y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Desarrollo y optimización de la ddPCR

La estandarización se realizó con muestras positivas para cada evento de modificación genética. Se realizaron en primera instancia ensayos *simplex* con el siguiente protocolo:

El *mix* de reacción consistió en 10.5 μL de ddPCR *supermix for probes (Bio-Rad, Pleasanton, CA)*, 300nM de cada oligonucleótido, 180nM de sonda y 100ng de ADN, ajustado con agua estéril hasta un volumen final de 21 μL (Tabla 3).

Tabla 3. Mix de reacción. Concentración y cantidad necesaria de cada reactivo para 1 reacción.

Reactivo	Concentración	Cantidad para 1 reacción (21μL totales)
ddPCR supermix	2x	10.5 μL
Primer forward	300nM	0.63 μL
Primer reverse	300nM	0.63 μL
Sonda	180nM	0.73 μL
Agua		6.51 μL
ADN	50 ng/ μL	2 μL

Se depositaron 20µL de este *mix* y 70µL de aceite generador de gotas en un cartucho de 8 pozos, el cual fue posteriormente trasladado al generador de gotas QX200 (*Bio-Rad, Pleasanton, CA*). 40µL de gotas se depositaron en una placa de PCR y fueron amplificadas en el termociclador T100 (*Bio-Rad, Pleasanton, CA*). El programa térmico consistió en un primer paso de desnaturalización, seguido de 40 ciclos, cada ciclo consistió en un paso de desnaturalización y un paso de hibridación y elongación con gradiente de temperatura de 58.5 a 65°C por 1 minuto (58.5, 59.4, 60.7, 62.3, 63.6, 64.5, y 65°C) para los ensayos Hmg, Bt11, Mir162, Mon810, Mon863, Nk603, Das59122 y Das1507 y un gradiente de temperatura de 53.5 a 60°C por 1 minuto (53.5, 54.3, 55.7, 57.3, 58.5, 59.5 y 60°C para los ensayos Ga21, Mir604 y Mon88017, después de los 40 ciclos se continuó con un paso de incubación y después enfriamiento (Tabla 4).

Tabla 4. Programa térmico ddPCR

	Proceso	Tiempo	Temperatura (°C)
	Desnaturalización inicial	10 min.	95
40	Desnaturalización	15 seg.	95
ciclos	Hibridación/Elongación	1 min.	Gradiente
	Incubación	10 min.	98
	Enfriamiento	∞	4

Posteriormente, las placas de PCR se transfirieron al lector de gotas. En el software se seleccionó el modo de cuantificación absoluta y cada muestra fue etiquetada como FAM o HEX de acuerdo con el fluoróforo utilizado.

-Ensayos dúplex

Para verificar los ensayos optimizados se realizaron ensayos dúplex (gen endógeno + transgén), se utilizó el mismo protocolo de los ensayos *simplex*, pero utilizando la temperatura de hibridación/elongación más optima. El gen endógeno se detectó en el canal HEX en todos los ensayos, mientras que el evento de modificación genética se

detectó en el canal FAM en todos los ensayos con excepción del evento Nk603, el cual se detectó con el gen endógeno en el canal HEX.

En cada mix de reacción se agregó el juego de oligonucleótidos adicional utilizando las mismas concentraciones (300nM de cada oligonucleótido y 180nM de sonda) (Tabla 3), por lo que se redujo la cantidad de agua estéril. En el caso del ensayo Hmg+Nk603 al ser detectados en el mismo canal de fluorescencia se modificaron las concentraciones de cada juego de oligonucleótidos para aumentar la amplitud de las gotas positivas del evento Nk603. En este ensayo las concentraciones para el gen endógeno consistieron en 300nM de cada oligonucleótido y 100nM de sonda, para el evento Nk603 consistieron en 900nM de cada oligonucleótido y 300nM de sonda). Se realizaron un total de 10 ensayos.

La temperatura de hibridación/elongación se modificó para cada ensayo según los resultados obtenidos en los gradientes de temperatura de los ensayos *simplex*.

-Ensayos *Multiplex*

Para los ensayos *multiplex* se utilizaron las mismas condiciones que en los ensayos *dúplex*, sin embargo, se probaron distintas combinaciones de oligonucleótidos y sondas cuando se analizaban 2 genes de interés en un mismo canal (*high* y *low*) con el fin de separar los clústers de gotas positivas correspondientes a cada evento de interés. En ensayos en los que no fue necesario analizar 2 genes por canal se utilizó la concentración de oligonucleótidos y sonda estándar (300nM y 180nM respectivamente) (Tabla 3). En cada grupo *multiplex* se incluyó el juego de oligonucleótidos para el gen Hmg (endógeno de maíz). Las combinaciones probadas fueron: 150nM oligonucleótidos y 90nM sonda (*low*) y 300nM oligonucleótidos y 180 nM sonda (*high*); 300nM oligonucleótidos y 150nM sonda (*low*) y 600 nM oligonucleótidos y 300nM sonda (*high*); y 300nM oligonucleótidos y 100nM sonda (*low*) y 900nM oligonucleótidos y 300nM sonda (*high*).

Análisis de resultados

El análisis de resultados se realizó con el software *QuantaSoft Analysis Pro* (Bio-Rad, s.f.-c), para discriminar las gotas positivas de las gotas negativas por medio un umbral de amplitud de fluorescencia establecido de forma manual.

Resultados y discusión

Análisis bioinformático

Especificidad

Se utilizó la herramienta “*primer blast*” para corroborar la especificidad de los 10 juegos de oligonucleótidos y sondas. Con los siguientes solo se obtuvieron resultados específicos: *Hmg* (gen endógeno), Bt11, Nk603, Mon810 y Mon863. Con 3 pares de oligonucleótidos se obtuvieron hibridaciones con especies no relacionadas y con el resto no se encontraron coincidencias.

Para reforzar el ensayo se utilizaron también las herramientas “*JRC GMO-Matrix*” y “*JRC GMO-amplicons*” de la Comisión Europea. En ambas herramientas se confirmó que los 11 juegos de oligonucleótidos eran específicos.

Así mismo, la Comisión Europea en sus reportes técnicos de validación muestra evidencia sobre la especificidad de cada uno de ellos para la detección del evento para el cual están diseñados (Mazzara *et al.*, 2005a; Mazzara *et al.*, 2005b; Mazzara *et al.*, 2005c; Mazzara *et al.*, 2007; Delobel *et al.*, 2007; Delobel *et al.*, 2008; Mazzara *et al.*, 2009; Delobel *et al.*, 2011).

Estructuras secundarias

Se evaluaron las interacciones entre cada oligonucleótido y sonda (formación de heterodímeros) utilizando la herramienta “*Oligoanalyzer*”. En base a estos resultados, se generaron 4 grupos *multiplex* (Tabla 5), los cuales se construyeron combinando los juegos de oligonucleótidos con la menor probabilidad de generación de estructuras secundarias. El juego de oligonucleótidos para el evento Mir162 se trabajó únicamente en formato *dúplex*, por lo que no se incluyó en ningún grupo *multiplex*.

Tabla 5. módulos *multiplex*

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
<i>Hmg</i>	<i>Hmg</i>	<i>Hmg</i>	<i>Hmg</i>
Mir604	Mon863	Ga21	Nk603
Das1507	Mon88017	Das59122	Bt11
			Mon810

Según los estándares de “*OligoAnalyzer*”, resultados con un valor de delta G con un valor negativo mayor a -9 son considerados problemáticos por la probabilidad de formación de heterodímeros (marcados en rojo).

En las tablas 6, 7, 8 y 9 se pueden observar las interacciones entre los juegos de oligonucleótidos de los módulos *multiplex* formados. Como se puede apreciar la mayoría de las interacciones se relacionó con el gen endógeno. Por otro lado, el juego de oligonucleótidos para el evento Mon810 fue el único que no presentó interacciones dentro de su grupo *multiplex* (Tabla 9).

Tabla 6. Módulo *triplex* (Hmg, Mir604 y Das1507)

	hmg-f	hmg-r	hmg-p	mir604-f	mir604-r	mir604-p	das1507-f	das1507-r	das1507-p
hmg-f		-5.99	-10.1	-10.05	-5.12	-6.53	-5.48	-6.97	-4.64
hmg-r	-5.99		-5.24	-3.9	-10.91	-7.81	-6.21	-5.5	-11.71
hmg-p	-10.1	-5.24		-8.09	-6.91	-6.75	-5.02	-6.75	-3.61
mir604-f	-10.1	-3.9	-8.09		-6.91	-6.75	-4.99	-7.04	-3.61
mir604-r	-5.12	-10.9	-6.91	-6.91		-7.71	-6.59	-3.61	-6.61
mir604-p	-6.53	-7.81	-6.75	-6.75	-7.71		-6.21	-6.58	-6.68
das1507-f	-5.48	-6.21	-5.02	-4.99	-7.04	-3.61		-6.21	-9.28
das1507-r	-6.97	-5.5	-6.75	-6.59	-3.61	-6.61	-6.21		-6.21
das1507-p	-4.64	-11.7	-3.61	-6.21	-6.58	-6.68	-9.28	-6.21	

Tabla 7. Módulo *triplex* (Hmg, Mon863 y Mon88017)

	hmg-f	hmg-r	hmg-p	mon863-f	mon863-r	mon863-p	mon88017-f	mon88017-r	mon88017-p
hmg-f		-5.99	-10.1	-4.95	-4.74	-5.19	-6.69	-6.6	-5.13
hmg-r	-5.99		-5.24	-6.21	-6.24	-6.84	-7.58	-4.64	-7.71
hmg-p	-10.1	-5.24		-5.91	-6.12	-3.61	-5.09	-4.64	-6.75
mon863-f	-4.95	-6.21	-5.91		-5.63	-6.68	-6.69	-9.82	-7.07
mon863-r	-4.74	-6.24	-6.12	-5.63		-9.83	-8.28	-6.68	-6.68
mon863-p	-5.19	-6.84	-3.61	-6.68	-9.83		-5.99	-8.26	-8.26
mon88017-f	-6.69	-7.58	-5.09	-6.69	-8.28	-5.99		-4.64	-5.12
mon88017-r	-6.6	-4.64	-4.64	-9.82	-6.68	-8.26	-4.64		-6.68
mon88017-p	-5.13	-7.71	-6.75	-7.07	-6.68	-8.26	-5.12	-6.68	

Tabla 8. Módulo *triplex* (Hmg, Ga21 y Das59122)

	hmg-f	hmg-r	hmg-p	ga21-f	ga21-r	ga21-p	das59122-f	das59122-r	das59122-p
hmg-f		-5.99	-10.1	-5.36	-5.19	-8.65	-6.69	-5.13	-6.53
hmg-r	-5.99		-5.24	-4.74	-6.24	-4.74	-6.31	-6.31	-9.75
hmg-p	-10.1	-5.24		-6.9	-11.7	-6.37	-6.75	-6.75	-6.75
ga21-f	-5.36	-4.74	-6.9		-3.61	-6.69	-7.04	-5.12	-6.9
ga21-r	-5.19	-6.24	-11.7	-3.61		-4.67	-6.75	-6.75	-6.9
ga21-p	-8.65	-4.74	-6.37	-6.69	-4.67		-4.74	-6.68	-6.68
das59122-f	-6.69	-6.31	-6.75	-7.04	-6.75	-4.74		-8.35	-6.75
das59122-r	-5.13	-6.31	-6.75	-5.12	-6.75	-6.68	-8.35		-9.82
das59122-p	-6.53	-9.75	-6.75	-6.9	-6.9	-6.68	-6.75	-9.82	

Tabla 9. Modulo *tetraplex* (Hmg, Bt11, Nk603 y Mon810)

	hmg			bt11			nk603			mon810		
	f	r	p	f	r	p	f	r	p	f	r	p
hmg-f		-5.99	-10.1	-5.13	-4.64	-5.19	-6.78	-6.6	-6.91	-6.53	-6.6	-6.69
hmg-r	-5.99		-5.24	-7.81	-6.24	-9.31	-4.74	-6.24	-4.87	-7.58	-4.67	-6.14
hmg-p	-10.1	-5.24		-6.75	-5.02	-6.91	-5.24	-6.12	-11.7	-4.95	-3.89	-5.84
bt11-f	-5.13	-7.81	-6.75		-6.68	-7.74	-7.64	-7.55	-6.75	-3.61	-6.21	-6.21
bt11-r	-4.64	-6.24	-5.02	-6.68		-8.26	-5.99	-6.24	-6.37	-6.24	-5.02	-6.62
bt11-p	-5.19	-9.31	-6.91	-7.74	-8.26		-8.36	-7.69	-6.91	-6.76	-4.64	-6.12
nk603-f	-6.78	-4.74	-5.24	-7.64	-5.99	-8.36		-6.2	-5.19	-6.76	-3.54	-5.37
nk603-r	-6.6	-6.24	-6.12	-7.55	-6.24	-7.69	-6.2		-5.02	-4.77	-6.24	-7.72
nk603-p	-6.91	-4.87	-11.7	-6.75	-6.37	-6.91	-5.19	-5.02		-5.19	-5.02	-5.02
mon810-f	-6.53	-7.58	-4.95	-3.61	-6.24	-6.76	-6.76	-4.77	-5.19		-8.19	-8.19
mon810-r	-6.6	-4.67	-3.89	-6.21	-5.02	-4.64	-3.54	-6.24	-5.02	-8.19		-3.14
mon810-p	-6.69	-6.14	-5.84	-6.21	-6.62	-6.12	-5.37	-7.72	-5.02	-8.19	-3.14	

En un ensayo previo, Dobnik y colaboradores (2015) evaluaron las interacciones de estos mismos juegos de oligonucleótidos utilizando el software “Autodimer”, en dicho estudio solo se encontraron 2 combinaciones (Das59122P-Mon88017P y Mir604P-Das59122R) que pudieran afectar la eficiencia del ensayo. Las diferencias entre ambos ensayos se deben probablemente al software utilizado para evaluar estas interacciones y las reglas de decisión de estos. De cualquier manera, la interacción *in vitro* de los oligonucleótidos ya había sido evaluada en el trabajo previamente mencionado, por lo que los grupos formados en este trabajo se mantuvieron para el subsecuente análisis de PCR *in silico*.

PCRs in silico

Una vez comprobada la especificidad de los oligonucleótidos, se prosiguió a corroborar la aplicación de estos en ensayos *simplex* (nota: para los eventos ga21 y mon88017 no se encontró la secuencia completa ni en la base de datos del NCBI, ni en la base de datos europea EMBL-EBI, por lo cual se trabajó solo con el amplicón).

Con las PCRs in silico realizadas con el software FastPCR se comprobó en primera instancia que cada juego de oligonucleótidos hibridaba en su templado específico,

generando el amplicón de tamaño esperado, así mismo, que los 4 módulos *multiplex* formados eran adecuados, puesto que no se formaron heterodímeros, incluso con la probabilidad de que esto sucediera.

El resumen del análisis bioinformático se puede observar en la tabla 10.

Tabla 10. Resumen análisis bioinformático

Juego de oligonucleótidos	Especificidad (<i>primer blast</i>, <i>JRC GMO-Matrix</i> y/o <i>JRC GMO-amplicons</i>)	Aplicación en ensayos <i>simplex</i> (<i>FastPCR</i>)	Sin probabilidad de heterodímeros en su grupo <i>multiplex</i> (<i>Oligo Analyzer</i>)	Aplicación en ensayos <i>multiplex</i> (<i>FastPCR</i>)
<i>Hmg</i>	✓	✓	X	✓
Mir604	✓	✓	X	✓
Das1507	✓	✓	X	✓
Mon88017	✓	✓	X	✓
Mon863	✓	✓	X	✓
Ga21	✓	✓	X	✓
Das59122	✓	✓	X	✓
Bt11	✓	✓	X	✓
Nk603	✓	✓	X	✓
Mon810	✓	✓	✓	✓

Extracción de ADN

El ADN fue extraído de 200mg de muestra usando el kit comercial de extracción *Wizard Magnetic DNA Purification System for Food* (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. En la tabla 11 se observa el rendimiento de cada muestra, así como el valor de pureza obtenido.

Tabla 11. Extracción de ADN usando el kit comercial PROMEGA

Muestra	Concentración (ng/uL)	260/280
Bco. ext.	3.2	1.62
Muestra 1	99.2	1.88
Muestra 2	131.7	1.85
Muestra 3	119.6	1.86
Muestra 4	118.9	1.84
MRC ERM-BF413D (MON810)	74.3	1.84
MRC IRMM-412R-5 (BT11)	30.4	1.80

Cada muestra se ajustó a 50ng/ μ L y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Estandarización de las ddPCR

Concentración de oligonucleótidos y sondas

Las recomendaciones en cuanto a las concentraciones de oligonucleótidos rondan los 500nM y en general se recomienda que sean mayores a concentraciones que se utilizarían en ensayos de qPCR (Pecoraro *et al.* 2019), sin embargo, en este trabajo decidimos utilizar concentraciones relativamente bajas (300nM para oligonucleótidos y 180nM para sondas), esto se hizo tomando en cuenta las siguientes consideraciones: 1. garantizar la eficiencia con concentraciones bajas, esto debido al desarrollo de módulos *multiplex* en los que eventualmente se probarían ensayos con combinaciones que incluirían estas concentraciones y 2. evidencia existe del uso de concentraciones bajas de oligonucleótidos y sondas en ensayos de detección de OGMs sin problemas reportados (Morisset *et al.* 2013; Gutiérrez Angoa *et al.* 2015).

Si bien, un aumento en la concentración de oligonucleótidos provoca una mayor fluorescencia en las gotas positivas y por ende una mejor separación entre este clúster y el de gotas negativas, no hay efectos en la reducción del efecto de “lluvia” ni en la cuantificación (Koppel *et al.* 2015; Grelewska *et al.* 2018). Tomando esto en consideración, aunado a la clara separación de clústers con esta concentración de oligonucleótidos y sondas en combinación con la temperatura de

hibridación/elongación (58.5°C), no se evaluaron más concentraciones para los ensayos *simplex* y *dúplex*. Ya que, además del buen desempeño obtenido, reduciendo las cantidades utilizadas de oligonucleótidos y sondas se reduce el costo por reacción, uno de los puntos más criticados en ensayos de ddPCR.

Gradiente de temperatura

En cuanto a los gradientes de temperatura se buscaba obtener una amplitud que permitiera discriminar entre el clúster de gotas positivas y el clúster de gotas negativas. Tomando en cuenta que el temperatura de fusión (TM por sus siglas en inglés) de los oligonucleótidos oscilaba entre 62 y 67°C, se optó por hacer un primer gradiente que abarcó el siguiente rango de temperaturas: 65°C, 64.5°C, 63.6°C, 62.3°C, 60.7°C, 59.4°C y 58.5°C (Figura 12).

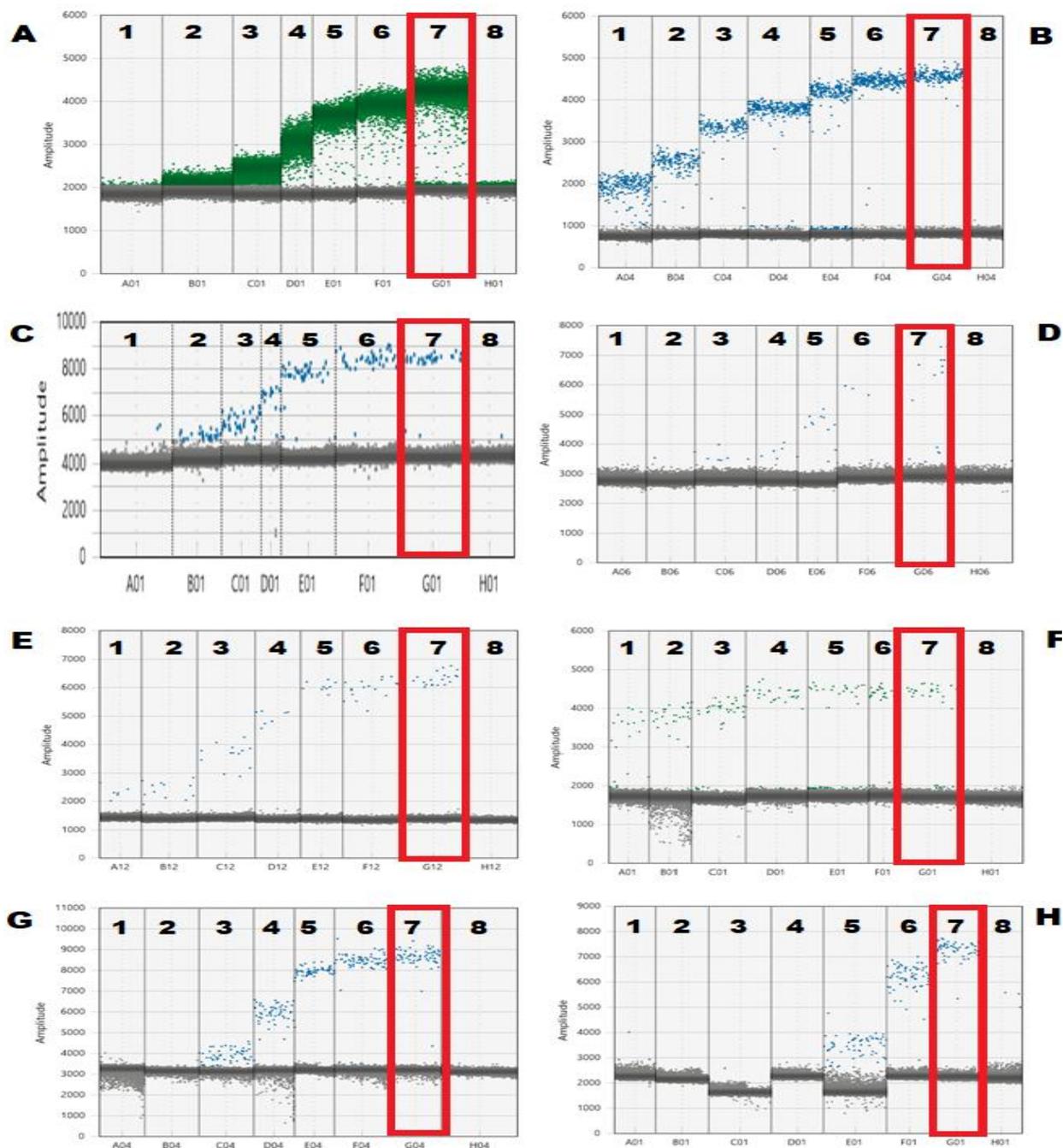


Figura 12. A) Ensayo Hmg, B) Ensayo Bt11, C) Ensayo Mir162, D) Ensayo Mon810, E) Ensayo Mon863, F) Ensayo Nk603, G) Ensayo Das59122 y H) Ensayo Das1507. Gradiente de temperatura 65°(1), 64.5°(2), 63.6°(3), 62.3°(4), 60.7°(5), 59.4°(6), 58.5°(7) y blanco (8).

Al observar que con temperaturas mayores a 62°C se obtenía una amplitud deficiente y considerando que el Tm de los oligonucleótidos era muy similar entre ellos, se redujeron las temperaturas para observar la amplitud a temperaturas menores. El segundo gradiente abarcó las siguientes temperaturas: 60°C, 59.5°C, 58.6°C, 57.3°C,

55.7°C, 54.3°C y 53.5°C. En este segundo gradiente se observó que con temperaturas menores a 58.5°C no existía un aumento .en la amplitud (Figura 13).

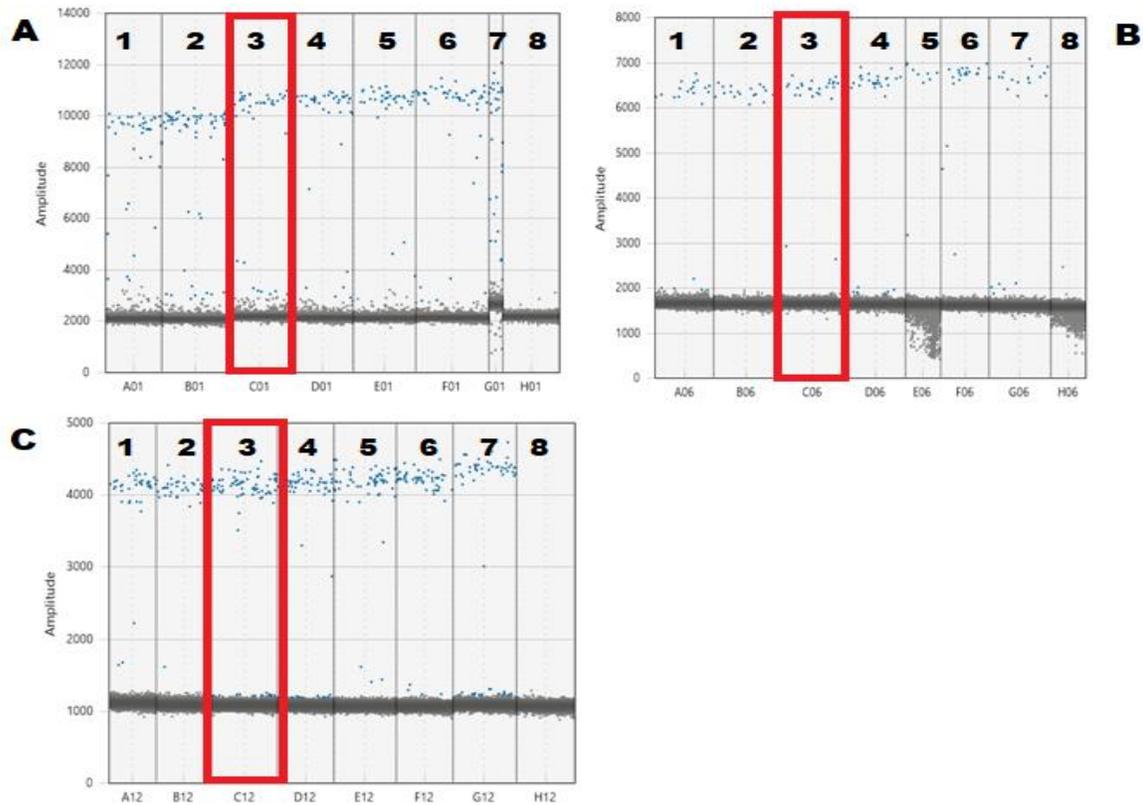


Figura 13. A) Ensayo Ga21, B) Ensayo Mir604 y C) Ensayo Mon88017. Gradiente de temperatura 60°(1), 59.5°(2), 58.5°(3), 57.3°(4), 55.7°(5), 54.3°(6), 53.5°(7) y blanco (8).

La temperatura de hibridación/elongación de 58.5°C (marcadas en rojo, figura 12 columna 7 y figura 13 columna 3) arrojó la mayor diferencia en la amplitud y permitió discriminar de manera clara y en todos los ensayos los clústers de gotas positivas y negativas, además, esta temperatura no se alejó tanto de la temperatura con la que se validaron estos oligonucleótidos en ensayos de qPCR (60°C) (Mazzara *et al.*, 2005a; Mazzara *et al.*, 2005b; Mazzara *et al.*, 2005c; Mazzara *et al.*, 2007; Delobel *et al.*, 2007; Delobel *et al.*, 2008; Mazzara *et al.*, 2009; Delobel *et al.*, 2011).

El aumento en la amplitud como consecuencia de la reducción de la temperatura de hibridación/elongación es algo que ya se ha reportado en otros trabajos (Gerdes *et al.*

2016; Lievens *et al.* 2016), sin embargo, esto tiene que evaluarse con especial cuidado, ya que la reducción en la temperatura puede derivar en inespecificidades (Lievens *et al.* 2016). Sin embargo, no se observaron co-amplificaciones inespecíficas en ningún ensayo, por lo que se trabajó con la temperatura de 58.5°C para ensayos subsecuentes.

Este trabajo se limitó a encontrar una temperatura consenso que permitiera una separación clara entre clústers utilizando, en caso de ser necesario, concentraciones bajas de oligonucleótidos y sondas.

Conteo de gotas

El manual de usuario de ddPCR de *Bio-Rad* recomienda entre 12,000 y 16,000 gotas para cálculos de concentración y al menos 10,000 para cualquier otro ensayo. En las pruebas de optimización (88 *runs*) el promedio de gotas correspondió a 12,655 gotas ± 3121.9 , con casos poco frecuentes de generación por debajo de las 10,000 gotas (14 *runs*). Este promedio resultó adecuado de acuerdo con el propósito de los ensayos y según las recomendaciones del fabricante, además, concuerda con otros ensayos de detección de OGMs (Koppel y Bucher. 2015; Koppel *et al.* 2017).

Diferencias con ensayos que promedian mayor recuperación de gotas (Gerdes *et al.* 2016), se pueden explicar por el uso de micropipetas multicanal que facilitan la transferencia. Otro punto para considerar es la estandarización del proceso, que eventualmente mejorará el conteo de gotas.

“Lluvia”

Se le denomina “lluvia” a las gotas que tienen una amplitud de fluorescencia por encima del límite superior del clúster de gotas negativas y por debajo del límite inferior del clúster de gotas positivas y que por lo tanto su clasificación es complicada (Deprez *et al.* 2016).

Este efecto se puede apreciar de manera clara en el ensayo de gradiente de temperatura del gen endógeno Hmg. No obstante, la posibilidad de ajustar de forma manual el umbral de fluorescencia permite clasificar estas gotas como positivas y negativas.

Lievens y colaboradores (2016) evaluaron parámetros para reducir la cantidad de “lluvia” en ensayos de ddPCR; los más destacados consistieron en la sonicación del *mix* de reacción, el aumento del número de ciclos (que parece ser poco significativo, ya que en ensayos de hasta 90 ciclos se reportó una cantidad considerable de “lluvia”) y, por último, el rediseño de oligonucleótidos, ya que la “lluvia” parece ser dependiente de la secuencia de estos y/o del amplicón deseado,

Sin embargo, en un experimento realizado por Bio-Rad se probaron 3 escenarios de ajuste manual del umbral (umbral alto: por debajo del límite inferior del clúster de gotas positivas, umbral bajo: por arriba del límite superior del clúster de gotas negativas y un umbral medio). Los resultados de este experimento mostraron que se mantiene una precisión de $\pm 5\%$ independientemente del umbral establecido (Bio-Rad, s.f.-a), por lo que no habría sesgo.

Por lo tanto, la “lluvia” en el ensayo del gen endógeno Hmg puede ser soportada con el establecimiento manual del umbral, sin la necesidad de invertir recursos para el rediseño y optimización de un nuevo juego de oligonucleótidos.

Ensayos *dúplex*

Para verificar los ensayos optimizados se realizaron ensayos *dúplex*. En estos ensayos se analizaron de manera simultánea el gen endógeno y un evento de modificación genética.

Se trabajó con 2 materiales de referencia certificados ERM-BF413d e IRMM-412R-5 para los eventos Mon810 y Bt11 respectivamente. Para el resto de los ensayos se utilizaron muestras preparadas (peso/peso) correspondientes a ensayos de aptitud (USDA) que contenían uno o más eventos de interés (MRC) mezclados con variedades comerciales de maíz.

La conversión a porcentaje de modificación genética (MG%) se realizó de acuerdo con la guía técnica del laboratorio de referencia de la Unión Europea (EURL por sus siglas en inglés) sobre la implementación del reglamento 619/2011 con la ecuación 2:

$$MG\% \left(\frac{m}{m} \right) = \frac{\text{Copias del OGM}}{\text{Copias del taxón específico}} \times 100 \quad (2)$$

Además, se consideró la variación relacionada con la composición biológica del maíz (cigoidad). En maíz heterocigoto los rangos de variabilidad van aproximadamente del 40% (si el híbrido es derivado de un macho modificado genéticamente y una hembra no modificada) al 60% (si el híbrido es derivado de un macho no modificado y una hembra modificada genéticamente) (EURL. 2011).

Los valores obtenidos con los ensayos de ddPCR (tabla 12) se expresan en comparación a los valores teóricos descritos en los reportes de validación (Mon810 y Bt11) y en los ensayos de aptitud de la USDA.

Tabla 12. Cuantificación del porcentaje del transgén en ensayos *dúplex*. Se muestra la concentración en copias del transgén y el taxón, así como los porcentajes teóricos y obtenidos del contenido de organismos genéticamente modificados

Evento	Conc.	Conc.	%OGM teórico	%OGM obtenido	% de variación
	(copias/ μ L) Transgén	(copias/ μ L) Taxón			
Ga21	0.509	310	0.5	0.124	75.2
Das59122	1.5	369	1	0.406	59.4
Mir604	1.87	505	0.8	0.37	53.75
Das1507	2.54	535	0.9	0.474	47.33
Mon863	2.06	370	1	0.556	44.4
Mon88017	1.91	418	0.8	0.456	43
Mir162	6.14	411	2	1.49	25.5
Nk603	1.64	370	1.5	0.443	70.46
Bt11	12.4	646	5	1.919	60.75
Mon810	6.7	1192	1	0.562	43.8

El reporte del material de referencia ERM-BF413d (Mon810) certifica el % de copias para el evento Mon810, este corresponde a 0.57% (incertidumbre del 0.17%) (Charels *et al.*, 2007), lo cual es comparable al resultado obtenido con el ensayo de ddPCR. Lo que demuestra que la cuantificación es posible y precisa.

En el caso del reporte de certificación del material de referencia IRMM-412R-5 (Bt11 5%) se especifica en primer lugar que el valor real corresponde a $4.89 \pm 0.21\%$, así mismo se especifica que el material de referencia fue elaborado a partir de muestras de maíz heterocigoto (sin especificar sexo de variedades modificadas genéticamente) (Trapmann *et al.*, 2004), por lo que el valor teórico de variabilidad corresponde al valor obtenido con el ensayo de ddPCR.

Por otro lado, en las muestras correspondientes a los ensayos de aptitud se observa en la mayoría de los casos un % de variación que corresponde al % esperado en muestras híbridas, con excepción de los eventos Ga21, Mir162 y Nk603, sin embargo, todas estas muestras están preparadas con maíz del cual se desconoce la composición biológica y por tanto el sesgo era esperado.

El sesgo derivado de muestras preparadas peso/peso y/o en las que se desconoce la composición biológica de la semilla se ha evaluado en ensayos previos (Koppel & Bucher, 2015; Cottenet *et al.* 2018). En estos ensayos el uso de factores de conversión teórico resultó adecuado en la mayoría, pero no en todos los casos, como ocurrió en este trabajo.

Al igual que en los ensayos previamente mencionados, estamos de acuerdo en los siguientes puntos: el sesgo corresponde a la variabilidad genética de la muestra y no al ensayo de ddPCR en sí, por lo que este método sigue siendo una alternativa viable para la cuantificación precisa de transgenes en maíz sin la necesidad de una curva de calibración, así mismo, es necesaria la determinación de un factor de conversión consenso para cada línea de modificación genética con el objetivo de reducir el sesgo en muestras en las que la composición biológica es poco conocida o en muestras preparadas con combinaciones de maíz homocigoto y heterocigoto.

ddPCR *multiplex*

Dos de los principales métodos para hacer *multiplexing* de alto grado en la ddPCR son el basado en proporciones y el basado en amplitud.

El *multiplexing* basado en amplitud es una alternativa para aprovechar las capacidades de detección y cuantificación de la ddPCR. Consiste en distinguir clústers de gotas positivas marcados con el mismo reportero fluorescente al variar las concentraciones de los oligonucleótidos y sondas y por lo tanto detectar diferentes niveles de amplitud de fluorescencia (Dobnik et al. 2016). Este tipo de *multiplexing* ya se han realizado de manera satisfactoria, con ensayos en los que se han detectado desde 4 (Dobnik et al. 2016), hasta 10 genes de interés (Dobnik et al. 2015).

En este trabajo se aprovechó esta capacidad al realizar un ensayo tetraplex y tres ensayos triplex. Una vez optimizada una temperatura de hibridación en común para todos los juegos de oligonucleótidos se procedió a la realización de los ensayos multiplex, para esto se hicieron mezclas arbitrarias con los eventos de interés para cada grupo.

Ensayo Tetraplex: *Hmg*, *Nk603*, *Bt11* y *Mon810*

En el canal HEX el evento *Nk603* se trabajó con concentraciones 1x y el gen endógeno se trabajó con concentraciones 0.5x, en el canal FAM el evento *Mon810* se trabajó con concentraciones 1x y el evento *Bt11* se trabajó con concentraciones 0.5x.

Se observó una diferencia clara en el canal HEX (*Hmg* y *nk603*), por lo tanto, se mantuvieron las mismas concentraciones, esta diferencia no fue notoria en el canal FAM (Figura 14). En la cual no solo se obtuvo una pobre amplificación de gotas positivas, si no que la discriminación entre clústers no fue posible.

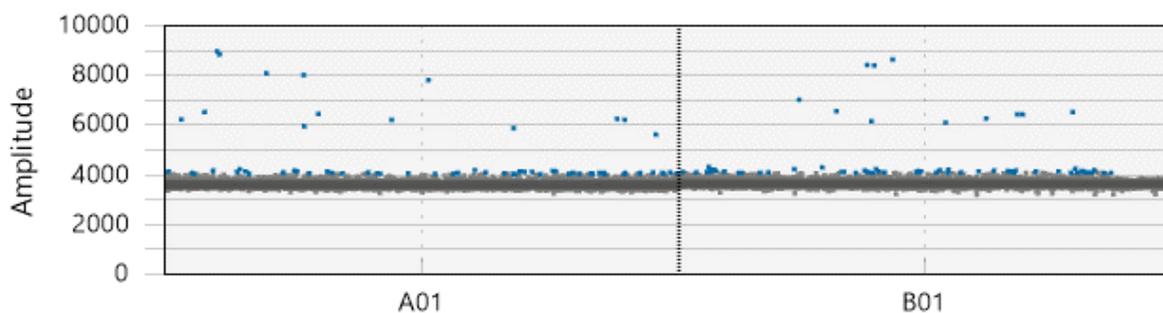


Figura 14. Eventos *Mon810* y *Bt11* (Canal FAM). Gráfico de amplitud 1D. No se observa una separación marcada entre cada evento. Concentraciones de 0.5x para *Bt11* y 1x para *Mon810*.

Debido a esto, se hizo un nuevo ensayo con concentraciones de 2x para MON810 y 1x para Bt11 (Figura 15). Esto siguiendo las recomendaciones de Bio-Rad, ya que aumentar la concentración del análisis para el grupo más alto más allá de la concentración del análisis 1x también es beneficioso en los casos en que uno de los análisis no funciona bien con una concentración de oligonucleótidos/sonda 0.5x (Maar *et al.*, 2019).

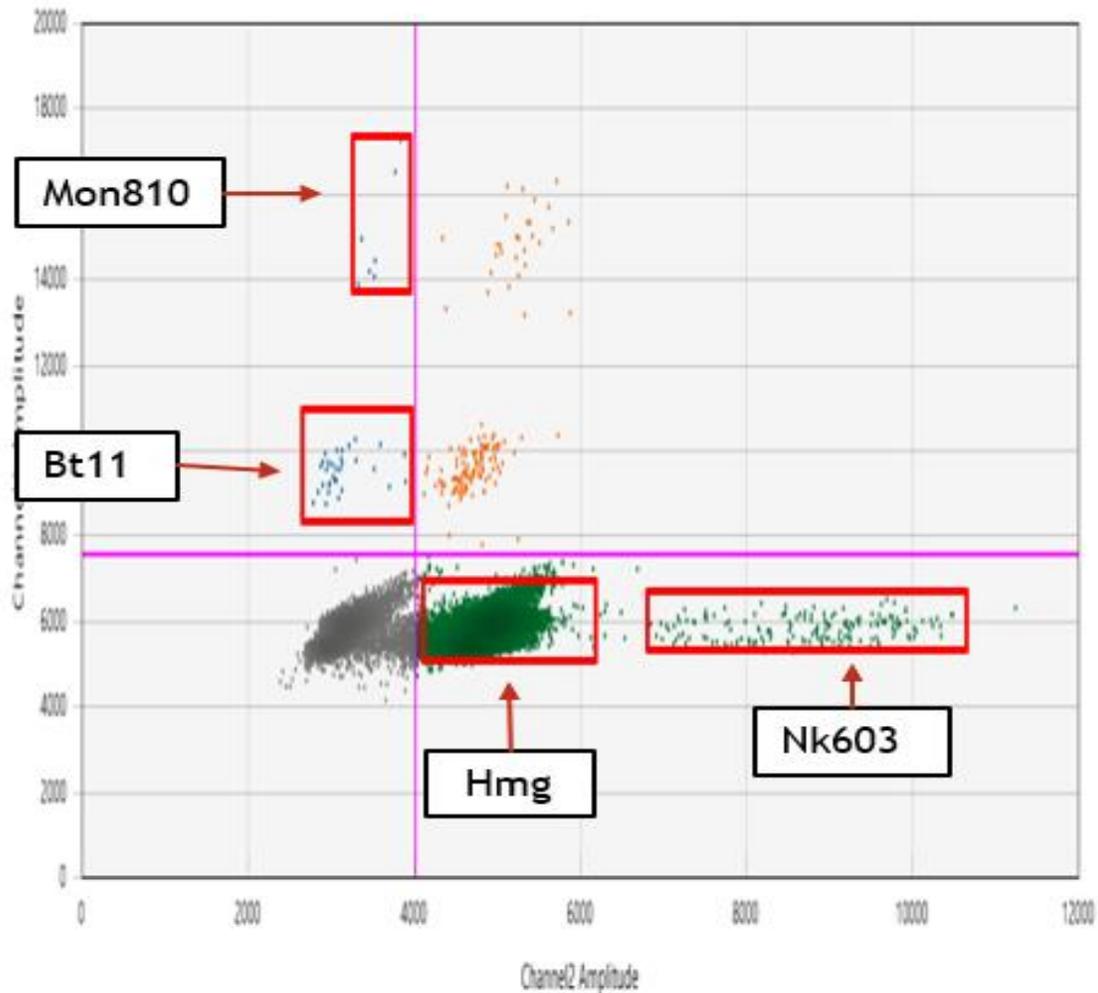


Figura 15. Gen endógeno Hmg y evento Nk603 (Canal HEX), eventos Mon810 y Bt11 (Canal FAM). Gráfico de amplitud 2D. Concentraciones de 0.5x para Hmg, 1x para Nk603, 1x para Bt11 y 2x para Mon810. Negativos (clúster gris), positivos en el canal FAM (clústers azules), positivos en el canal HEX (clústers verde), dobles positivos (clústers naranjas).

Aunque con diferencias más claras, se decidió probar concentraciones de 1 y 3x para lograr diferencias más marcadas en cada clúster de gotas positivas. Por lo tanto, se

trabajó con concentraciones de 1x para *Hmg* y 3x para *Nk603* en el canal HEX y concentraciones de 1x para *Bt11* y 3x para *Mon810* en el canal FAM (Figura 16).

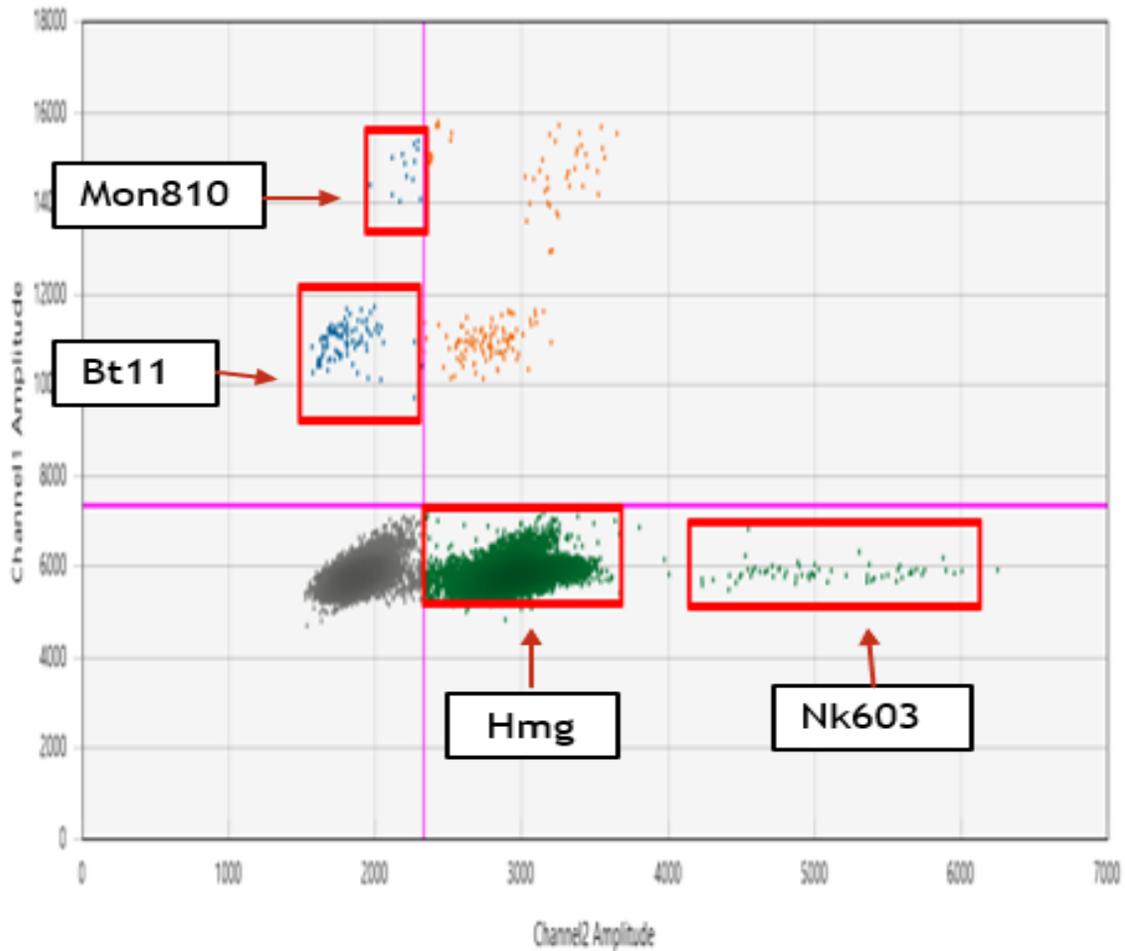


Figura 16. Gen endógeno *Hmg* y evento *Nk603* (Canal HEX), eventos *Mon810* y *Bt11* (Canal FAM). Gráfico de amplitud 2D. Concentraciones de 1x para *Hmg*, 3x para *Nk603*, 1x para *Bt11* y 3x para *Mon810*. Negativos (clúster gris), positivos en el canal FAM (clústers azules), positivos en el canal HEX (clústers verde) y dobles positivos (clústers naranjas).

Esta diferencia en las concentraciones de oligonucleótidos y sondas mostró grupos más compactos en el canal FAM y una mejor separación entre el clúster de gotas negativas y el clúster de las gotas positivas para el gen *Hmg*.

Ensayo triplex: *Hmg*, Mon88017 y Mon863

El gen endógeno *Hmg* se trabajó con concentraciones de oligonucleótidos y sonda estándar (1x) en el canal HEX, por otro lado, los eventos Mon863 y Mon88017 se manejaron de manera que el evento Mon863 tenía concentración 2x (doble de concentración) y el evento Mon88017 concentración de 1x (Figura 17).

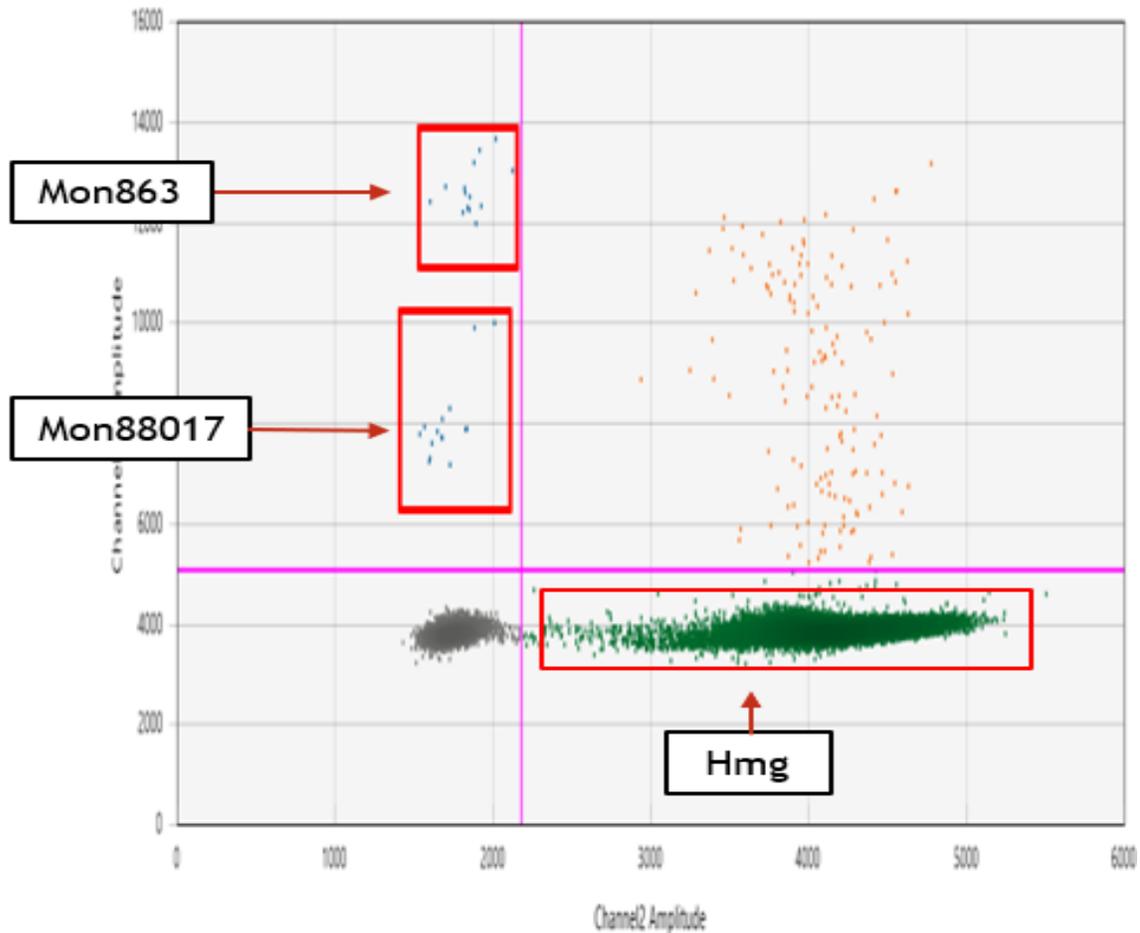


Figura 17. Gen endógeno HMG (Canal HEX) y eventos Mon863 y Mon88017 (Canal FAM). Gráfico de amplitud 2D. Concentraciones de 2x para Mon863 y 1x para Mon88017. Negativos (clúster gris), positivos en el canal FAM (clústers azules), positivos en el canal HEX (clúster verde), dobles positivos (clústers naranjas).

Buscando una separación más clara en los clústers de gotas positivas se trabajó con concentraciones de 3x (triple) para el evento Mon863 y 1x para el evento Mon88017 (Figura 18).

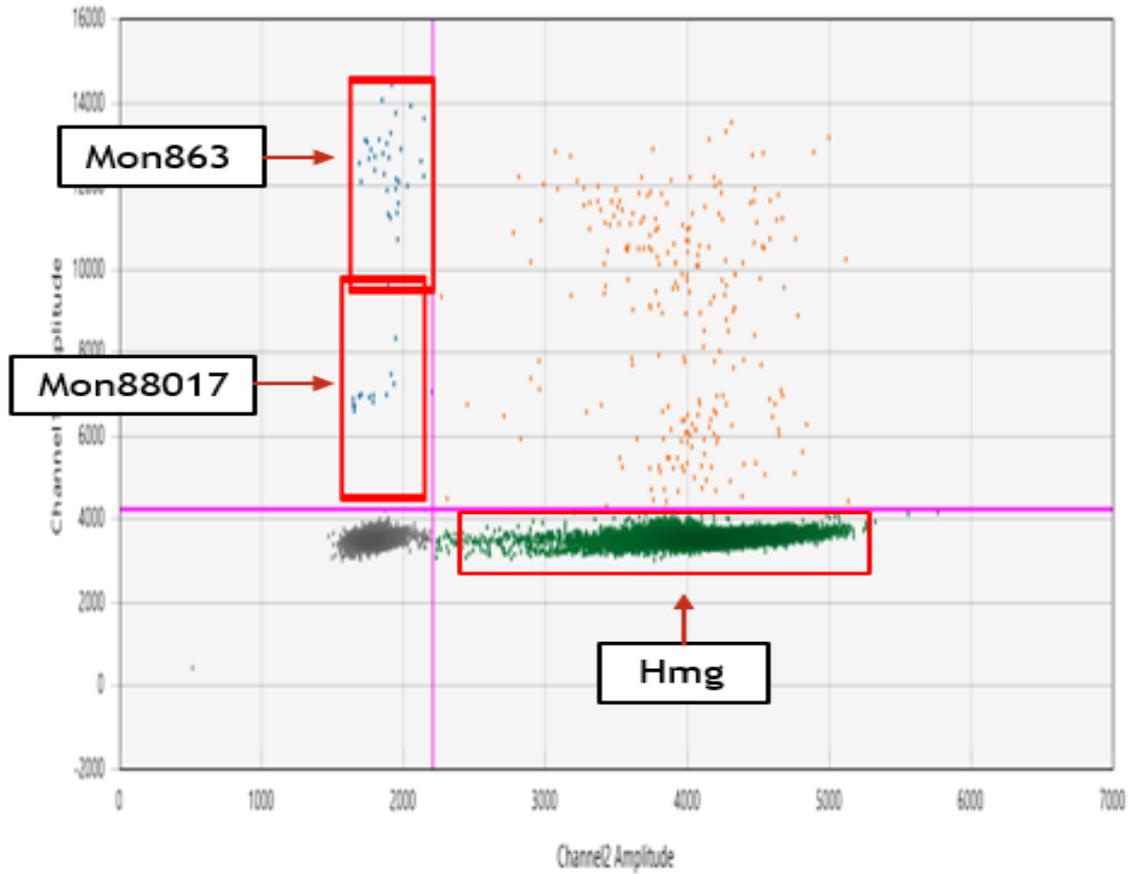


Figura 18. Gen endógeno HMG (Canal HEX) y eventos Mon863 y Mon88017 (Canal FAM). Gráfico de amplitud 2D. Concentraciones de 3x para Mon863 y 1x para Mon88017. Negativos (clúster gris), positivos en el canal FAM (clústers azules), positivos en el canal HEX (clúster verde), dobles positivos (clústers naranjas).

Ya que puede ser necesario un proceso iterativo para alcanzar la separación deseada del grupo (Maar *et al.*, 2019) se invirtieron las concentraciones en el canal FAM, esto generó grupos más compactos en el canal FAM y una mejor separación en los grupos de dobles positivos (Figura 19).

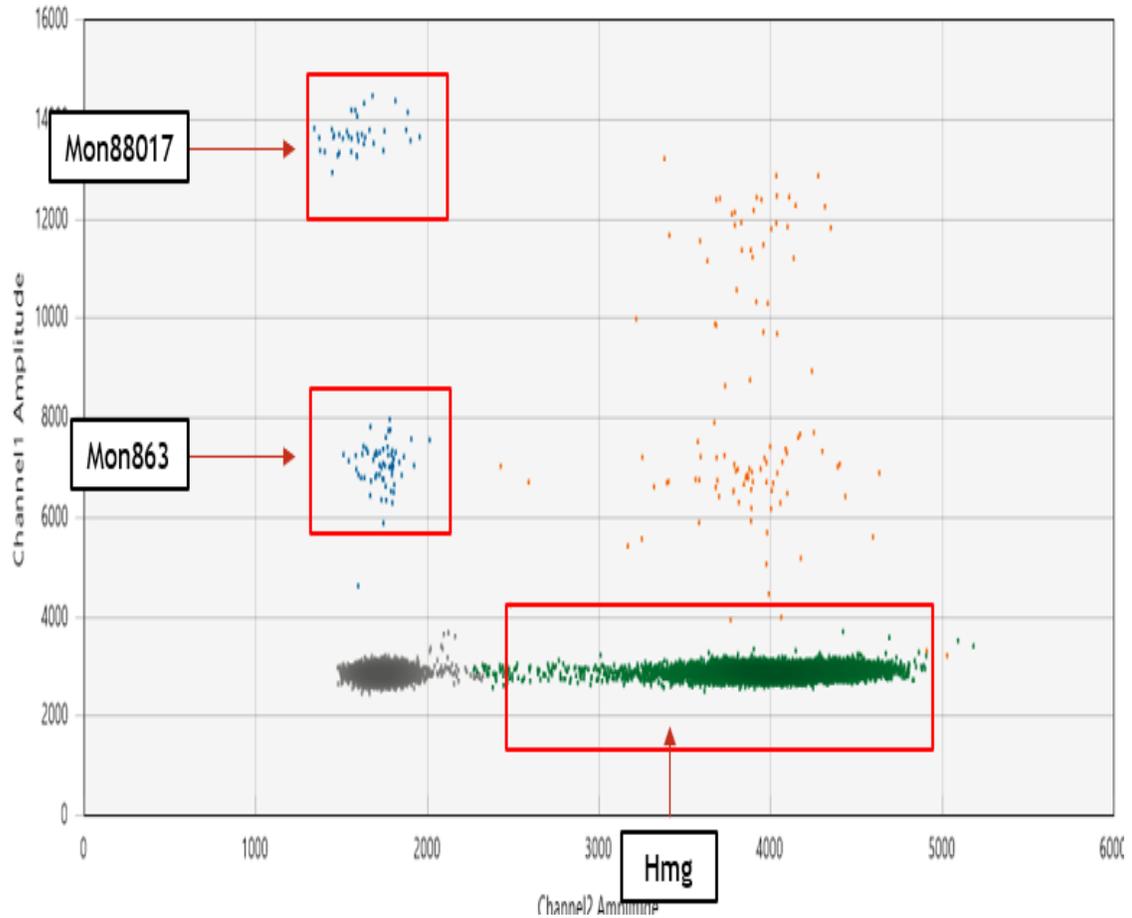


Figura 19. Gen endógeno HMG (Canal HEX) y eventos Mon863 y Mon88017 (Canal FAM). Gráfico de amplitud 2D. Concentraciones de 1x para Mon863 y 3x para Mon88017. Negativos (clúster gris), positivos en el canal FAM (clústers azules), positivos en el canal HEX (clúster verde), dobles positivos (clústers naranjas).

Ensayos triplex: *Hmg*, *Mir604* y *Das1507* y *Hmg*, *Ga21* y *Das59122*

Al observar la tendencia, en estos últimos dos ensayos se aplicaron directamente concentraciones con relación 1:3 para los ensayos en el canal FAM. 3x para *Das1507* y 1x para *Mir604* en un ensayo y 3x para *Das59122* y 1x para *Ga21* en el otro ensayo (Figuras 20 y 21 respectivamente).

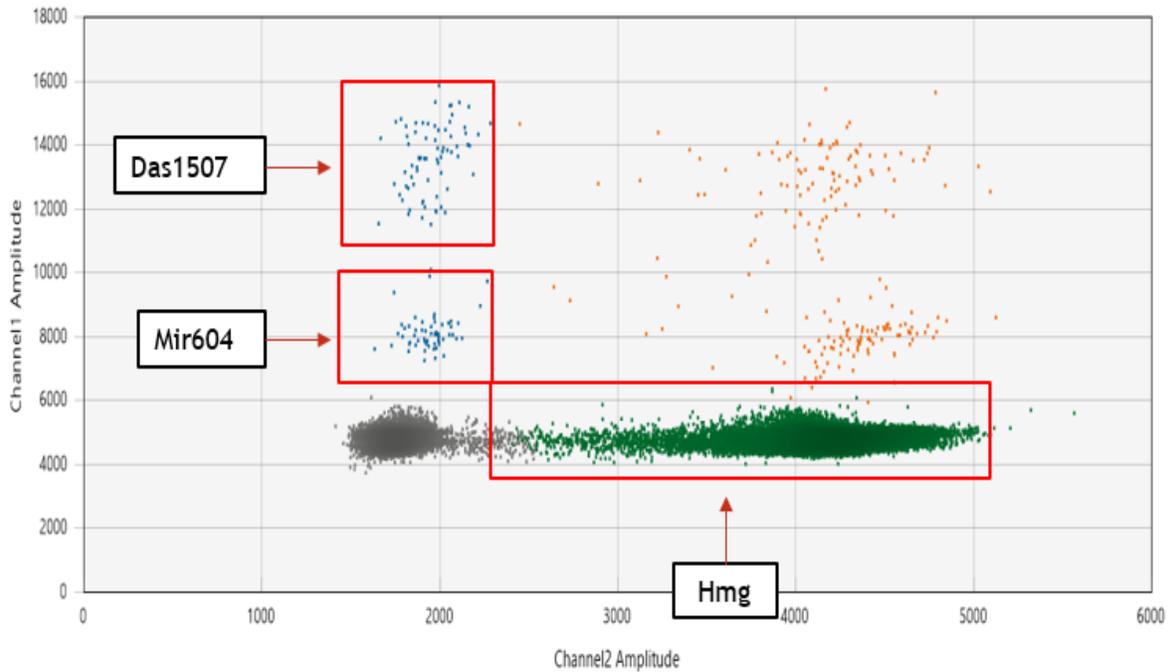


Figura 20. Gen endógeno HMG (Canal HEX) y eventos Mon863 y Mon88017 (Canal FAM). Gráfico de amplitud 2D. Concentraciones de 1x para Mir604 y 3x para Das1507. Negativos (clúster gris), positivos en el canal FAM (clústers azules), positivos en el canal HEX (clúster verde), dobles positivos (clústers naranjas).

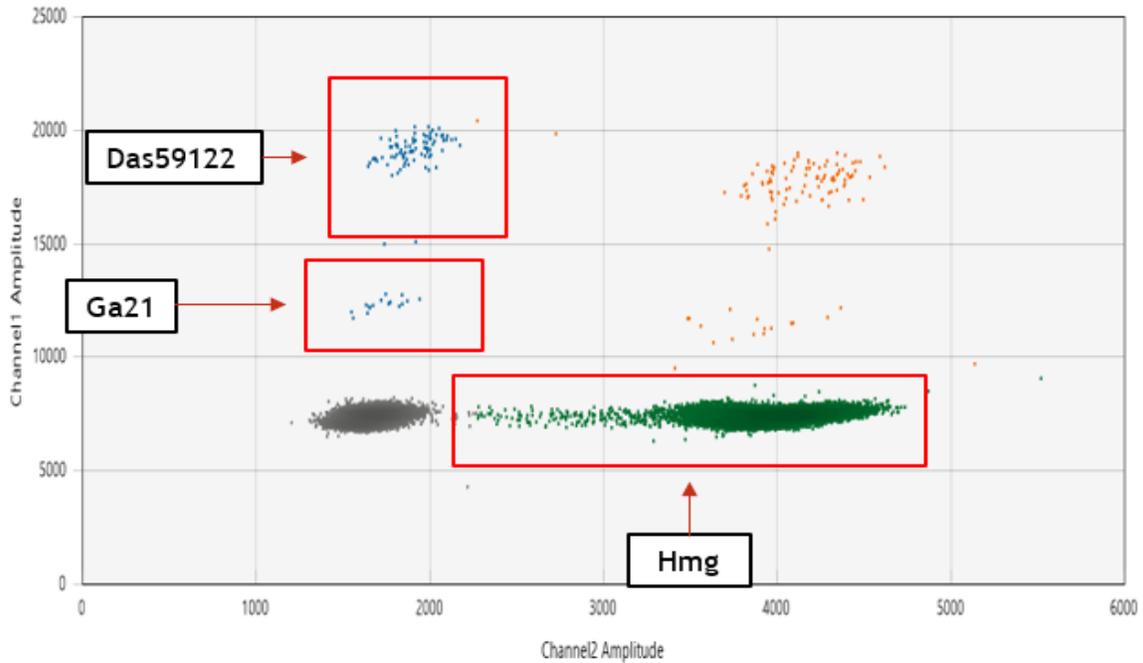


Figura 21. Gen endógeno HMG (Canal HEX) y eventos Mon863 y Mon88017 (Canal FAM). Gráfico de amplitud 2D. Concentraciones de 1x para Ga21 y 3x para Das59122. Negativos (clúster gris), positivos en el canal FAM (clústers azules), positivos en el canal HEX (clúster verde), dobles positivos (clústers naranjas).

En términos generales, la separación más clara de los clústers de gotas positivas en un mismo canal en los cuatro ensayos *multiplex* se logró con las concentraciones de 900nM (oligonucleótidos) y 300nM (sonda) en el grupo *high* 300nM (oligonucleótidos) y 100nM (sonda) para el grupo *low*.

Estos resultados son comparables (en concentraciones) a los obtenidos en un ensayo previo (Dobnik *et al.* 2016), lo que indica que, en términos generales, diferencias amplias en las concentraciones de cebadores y/o sondas garantizan una diferencia clara entre dos grupos positivos en un solo canal, por lo que hacer ensayos iterativos probando distintas combinaciones de concentraciones no es realmente necesario, ahorrando así tiempo y reactivos.

Por último, existen trabajos con un grado de *multiplexing* más alto. Dobnik y colaboradores (2015) realizaron un ensayo *Decaplex*, en el que se analizaron de manera simultánea 10 genes de interés. Sin embargo, en este tipo de trabajos la precisión se reduce ya que no es posible discriminar tantos clústers de gotas positivas en un solo canal detector. Sin embargo, nosotros consideramos que es preferible ser medido con el grado de *multiplexing*, para así garantizar resultados precisos que cumplan con las legislaciones actuales en los países en los cuales aplique.

Conclusión

Se determinó una temperatura de hibridación y elongación óptima para todos los ensayos *simplex*; para diferenciar de manera clara el clúster de gotas positivas y negativas.

Los ensayos *dúplex* coincidieron con los ensayos *simplex* en parámetros como la temperatura de hibridación/elongación y concentración de oligonucleótidos y sondas, así mismo, los ensayos *dúplex* mostraron aptitud para la cuantificación de transgenes en maíz, al ser comparables con los reportes de validación de los materiales de referencia en los que aplicaba.

En los ensayos *multiplex*, las diferencias entre concentraciones de oligonucleótidos y sondas correspondientes con la proporción 1:3 mostraron el mayor rendimiento, al generar grupos más compactos de gotas y discriminando los clústeres de gotas positivas para dos eventos diferentes de modificación genética en un solo canal detector de fluorescencia.

Finalmente, los ensayos optimizados mostraron potencial para ser usados como métodos de rutina para la detección y/o cuantificación *simplex* y *multiplex* de 10 eventos de modificación genética en maíz, esto además con las ventajas que ofrece la técnica de la ddPCR en comparación al actual estándar de oro para estos fines, ya que además de simplificar el ensayo lo hace más eficiente y rentable

Perspectivas a futuro

A partir de los resultados presentados en este trabajo, las perspectivas a futuro se dirigen a los siguientes puntos.

1. Completar los aspectos que por uno u otra razón quedaron inconclusos en este trabajo, en primer lugar, utilizar materiales de referencia certificados para todos los eventos de modificación genética de maíz que se evaluaron, así mismo, ampliar el segmento de los ensayos multiplex (*triplex* y *tetraplex*), es decir, confirmar si es posible la cuantificación utilizando los módulos propuestos.
2. Validar todos los ensayos propuestos, esto para confirmar con pruebas medibles y comprobables si efectivamente pueden ser utilizados como métodos de rutina.

Referencias:

- Academia mexicana de ciencias. (2007). Por un uso responsable de los organismos genéticamente modificados. Comité de biotecnología. Recuperado el 23 de octubre de 2018, de https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/comunicacion/publicaciones/Por_un_uso_responsable_OGMs.pdf
- Acosta, R. (2009). El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en cuba. *Cultivos tropicales*. 30 (2): 113-120.
- Aguilera, P., Tachiqín, M., Rocha, M., Pineda, B., Chánez, M. (2014). PCR en tiempo real. En Cornejo Romero A, Serrato Díaz A, Rendón Aguilar B, Rocha Munive MG (Ed.), Herramientas moleculares aplicadas a la ecología: Aspectos teóricos y prácticos. (pp.53-73). CDMX, México: INNEC-Semarnat.
- AgroBio. (2005). Maíz genéticamente modificado. Colombia. Recuperado el 13 de mayo de 2019 de, <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Maiz20Geneticamente20Modificado.pdf>
- AgroBio. (2012). Marco regulatorio de los organismos genéticamente modificados destinados a la agricultura. México. Recuperado el 12 de febrero de 2019 de, http://www.agrobiomexico.org.mx/publicaciones/Marco_Regulatorio.pdf
- Álvarez-Buylla, E. (2013). Maíz transgénico en su centro de origen: amenaza a la soberanía alimentaria de México y a la seguridad alimentaria mundial. *Cooperación internacional*. 12: 40-41. Recuperado el 23 de marzo de 2020 de, http://www.agroecologia.net/wp-content/uploads/2013/03/Ae12_COOPERACION_vdef.pdf
- Bio-Rad. (s.f.-a). Droplet digital PCR Applications guide. 8-9. Recuperado el 14 de septiembre de 2019 de, https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf
- Bio-Rad. (s.f.-b). Assays for droplet digital PCR. Recuperado el 9 de julio de 2021 de, https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6512.pdf

- Bio-Rad. (s.f.-c). Quantasoft Analysis Pro Software. Instruction manual. Recuperado el 14 de septiembre de 2019 de, <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/QuantaSoft-Analysis-Pro-v1.0-Manual.pdf>
- Bonfini, L., Heinze, P., Kay, S., Van den Eede, G. (2001). Review of GMO detection and quantification techniques. European commission, joint research centre, institute for health and consumer protection, food products and consumer goods unit.
- Burns, M., Burrell, A., Foy, C. (2010). The applicability of digital PCR for the assessment of detection limits in GMO analysis. *Eur Food Technol.* 231: 353-362. DOI 10.1007/s00217-010-1277-8
- Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M., Roosens, N., Morisset, D. (2014). Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology.* 37: 115-126.
- Centro nacional de referencia de detección de OGM. (2018). Catálogo de servicios. Recuperado el 25 de octubre de 2018 de, <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/381131/SDOGM-CS.pdf>
- Charels, D., Broeders, S., Corbisier, P., Gioria, S., Vincent, S., Schimmel, H., Trapmann, S., Emons, H. (2007). Certification of a MON 810 Maize Reference Material for its DNA copy number ratio. Certified Reference Material ERM® - BF413d. ISBN 978-92-79-07463-9. EC certification report EUR 23028 EN. Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements.
- Cottenet, G., Blancpain, C., Chuah, P. (2019). Performance assessment of digital PCR for the quantification of GM-maize and GM-soya events. *Anal. Bioanal. Chem.* <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01692-7>
- Datukishvili, N., Kutateladze, T., Gabriadze, I., Bitskinashvili, K., Vishnepolsky, B. (2015). New multiplex PCR methods for rapid screening of genetically modified organisms in food. *Frontiers in Microbiology.* 6: 1-8.
- Delobel, C., Larcher, S., Savini, M., Mazzara, M., Van den Eede, G. (2007). Event-specific Method for the Quantification of Maize Line GA21 Using Real-Time PCR. Validation Report and Protocol. EUR. Publications Office of the European Union.

- Delobel, C., Foti, N., Grazioli, E., Mazzara, M., Van den Eede, G. (2008). Event-specific Method for the Quantification of Maize Line MON88017 Using Real-Time PCR. Validation Report and Protocol. EUR. Publications Office of the European Union.
- Delobel, C., Mazzara, M., Bevilacqua, A., Van den Eede, G. (2011). Event-specific Method for the Quantification of Maize Line MIR162 Using Real-Time PCR. Validation Report and Protocol. EUR. Publications Office of the European Union.
- Deprez, L., Corbisier, P., Kortekaas, A., Mazoua, S., Beaz-Hidalgo, R., Trapmann, S., Emons, H. (2016). Validation of a digital PCR method for quantification of DNA copy number concentrations by using a certified reference material *Biomol. Detect. Quantif.* 9: 29-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bdq.2016.08.002>
- Dobnik, D., Spilsberg, B., Bogozalec, A., Holst-Jensen, A., Zel, J. (2015). Multiplex Quantification of 12 European Union Authorized Genetically Modified Maize Lines with Droplet Digital Polymerase Chain Reaction. *Anal Chem.* 87: 8218-8226.
- Dobnik, D., Stebih, D., Blejec, A., Morisset, D., Zel, J. (2016). Multiplex quantification of four DNA targets in one reaction with Bio-Rad droplet digital PCR system for GMO detection. *Sci. Rep.* 6, 35451.
- Dobnik, D., Spilsberg, B., Bogožalec Košir, A., Štebih, D., Morisset, D., Holst-Jensen, A., & Žel, J. (2018). Multiplex Droplet Digital PCR Protocols for Quantification of GM Maize Events. *Digital PCR*, 69–98. doi:10.1007/978-1-4939-7778-9_5
- Doebley, J. (2001). George Beadle's Other Hypothesis: One-Gene, One-Trait. *Genetics.* 158 (2): 487-493. Recuperado el 9 de julio de 2021 de, <https://www.genetics.org/content/158/2/487>
- EURL (European Union Reference Laboratory). (2011). Technical guidance document from the European union reference laboratory for genetically modified food and feed on the implementation of commission regulation (EU) No 619/2011. Joint Research Centre. Recuperado el 19 de abril de 2019 de, <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC68082/technical%20guidance%20from%20eurl%20on%20llp.pdf>

- Gerdes, L., Iwobi, A., Busch, U., Pecoraro, S. (2016). Optimization of digital droplet polymerase chain reaction for quantification of genetically modified organisms. *Biomolecular Detection and Quantification*. 7: 9-20.
- González-Cortes, N., Silos-Espino, H., Estrada-Cabral, J.C., Chávez-Muñoz, J.A., Tejero-Jiménez, L. (2016). Características y propiedades del maíz criollo cultivado en Aguascalientes, México. *Rev Mex Ciencias Agrícolas*. 7 (3): 669-680.
- Grelewska-Nowotko, K., Żurawska-Zajfert, M., Żmijewska, E., Sowa, S. (2018). Optimization and Verification of Droplet Digital PCR Even-Specific Methods for the Quantification of GM Maize DAS1507 and NK603. *Appl Biochem Biotechnol*. 185:207–220. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2634-x>
- Gutiérrez-Angoa, L., Castillo-Duran, L., Gómez-Castelo, B., Acatzi-Silva, A.I. (2015). Cuantificación de maíz genéticamente modificado mediante las técnicas de qpcr y dpcr. *Agrociencia*. 49(4): 373-394.
- Gutiérrez-Galeano, D.F., Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B. (2015). Estado actual de los cultivos genéticamente modificados en México y su contexto internacional. IPN. Recuperado el día 7 de septiembre de 2019 de, <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/Herramientas-ensenanza-investigacion/Seminarios/Docs/Presentacion-libro-GMs.pdf>
- Hindson, C., Chevillet, J., Briggs, H., Gallichotte, E., Ruf, I., Hindson, B., Vessella, R., Tewari, M. (2013). Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature Methods*.
- ISAAA. (2021). GM Approval Database. Recuperado el 18 de marzo de 2019 de, <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>
- Kalendar, R., Muterko, A., Shamekova, M., Zhambakin, K. (2017). In Silico PCR Tools for a Fast Primer, Probe, and Advanced Searching. In: Domingues, L. (eds) PCR. Methods in Molecular Biology, New York, NY. 2017. Springer. 1-31. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7060-5_1
- Koppel, R., Bucher, T. (2015). Rapid establishment of droplet digital PCR for quantitative GMO analysis. *Eur Food Res Technol*. DOI 10.1007/s00217-015-2475-1

- Koppel, R., Bucher, T., Bar, D., van Velsen, F., Ganeshan, A. (2017). Validation of 13 duplex droplet digital PCR systems for quantitative GMO analysis of most prevalent GMO traits. *Eur Food Res Techno*. DOI 10.1007/s00217-017-2957-4
- Lievens, A., Jacchia, S., Kagkli, D., Savini, C., Querci, M. (2016). Measuring Digital PCR Quality: Performance Parameters and Their Optimization. *PLoS ONE* 11: e0153317. doi:10.1371/journal.pone.0153317.
- Maar, D., Heredia, N., Hodges, S. (2019). Expanded Droplet Digital PCR Multiplexing Capability Using Two Different Strategies. Recuperado el 30 de mayo de 2020 de, https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_7204.pdf
- Mazzara, M., Grazioli, E., Larcher, S., Savini, C., Van den Eede, G. (2005a). Event-Specific Method for the Quantification of Maize Line DAS-59122-7 Using Real-Time PCR. Validation Report and Protocol. EUR. Publications Office of the European Union.
- Mazzara, M., Foti, N., Price, S., Paolletti, C., Van den Eede, G. (2005b). Event-Specific Method for the Quantification of Maize Line MIR604 Using Real-Time PCR. Validation Report and Protocol. EUR. Publications Office of the European Union.
- Mazzara, M., Foti, N., Price, S., Paolletti, C., Van den Eede, G. (2005c). Event-Specific Method for the Quantification of Maize Line MON863 Using Real-Time PCR. Validation Report and Protocol. EUR. Publications Office of the European Union.
- Mazzara, M., Munaro, B., Foti, N., Savini, C., Van den Eede G. (2007). Event-Specific Method for the Quantification of Maize Line MIR604 Using Real-Time PCR. Validation Report and Protocol. EUR. Publications Office of the European Union.
- Mazzara, M., Grazioli, E., Savini, C., Van den Eede, G. (2009). Event-Specific Method for the Quantification of Maize Line MON810 Using Real-Time PCR. Validation Report and Protocol. EUR. Publications Office of the European Union.
- Mendoza-Pérez, C. (2018). Uso de programa irrimodel para la programación de riego por goteo en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Agro Productividad*, 11(1).

Recuperado el 9 de julio de 2021 de, <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/152>

- Mercer, K., Wainwright, J. (2008). Gene flow from transgenic maize to landraces in Mexico: An analysis. *ScienceDirect*. 123: 109-115.
- Monsanto. (2007). Maíz Roundup Ready Nk603. Recuperado el 4 de noviembre de 2019 de, <https://www.engormix.com/agricultura/articulos/maiz-roundup-ready-t27121.htm>
- Morisset, D., Stebih, D., Milavec, M., Gruden, K., Zel, J. (2013). Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR. *PLoS ONE*. 8 (5).
- National Human Genome Research Institute (NHGRI). Reacción en cadena de la polimerasa. Recuperado el 22 de agosto de 2020 de, <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa>
- Nuñez-Cardenas, L. (2011). Detección y ensayo de los organismos genéticamente modificados. *Rev cubana Aliment Nutr*. 21 (2): 293-302.
- Ortíz-García, S., Ezcurra, E., Schoel, B. (2005). Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (12): 338–343
- Pecoraro, S., Berben, G., Burns, M., Corbisier, P., De Giacomo, M., De Loose, M., Dagand, E., Dobnik, D., Eriksson, R., Holst-Jensen, A., Kagkli, D., Kreysa, J., Lievens, A., Mäde, D., Mazzara, M., Paternò, A., Peterseil, V., Savini, C., Sovová, T., Sowa, S., Spilsberg, B. (2019). Overview and recommendations for the application of digital PCR. EUR 29673 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2019, ISBN 978-92-76- 00180-5, doi:10.2760/192883, JRC 115736. (Consulta Septiembre 2020)
- Perales, H. (2008). Maíz, riqueza de México. *Ciencias*. 92-93; 48-55.
- Pinheiro, L., Emslie, K. (2018). Basic Concepts and validation of digital PCR measurements. *Digital PCR*. 11-24.
- Piñeyro, A., Van Heerwaarden, J., Perales, H.R., Serratos, J., Rangel, A., Hufford, M.B., Gepts, P., Garay, A., Rivera, R., Álvarez, E.R. (2009). Transgenes in Mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO

detection in landrace populations. *Molecular Ecology*. 18: 750-761. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03993.x

- Quist, D., Chapela, I. (2001). Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, México. *Nature*. 414: 541-543.
- Rodríguez, P., González, O. (2007). Plantas transgénicas: una revisión de los principales cultivos básicos en México. *e-Gnosis*. 5: 1.
- SAGARPA, SIAP. (2019). Atlas agroalimentario 2019. Recuperado el 12 de octubre de 2019 de, https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2019
- Serrato, A., Flores, L.I., Aportela, J., Sierra, E. (2014). PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Recuperado el 14 de marzo de 2019 de, https://www.researchgate.net/publication/266856169_PCR_reaccion_en_cadena_de_la_polimerasa.
- Spendeler, L. (2005). Organismos modificados genéticamente: una nueva amenaza para la seguridad alimentaria. *Rev Esp Salud Pública*. 79 (2): 271-282.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. 2: 70-78.
- Trapmann, S., Catalani, P., Conneely, P., Contreras, M., Corbisier, P., Gancberg, D., Gioria, S., Le Guern, L., Linsinger, T., Schimmel, H. The Certification of Reference Materials of Dry-Mixed Maize Powder with different Mass Fractions of Bt-11 Maize. Certified Reference Materials ERM-BF412a, -BF412b, -BF412c, -BF412d, BF412e, BF412f. ISBN 92-894-6869-6. EC certification report EUR 20985 DG. Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements.
- Trejo-Saavedra, D.L., Rodríguez-Negrete, E.A., Rivera-Bustamante, R.F. (2015). Detección de transgenes en Organismos Genéticamente Modificados (OGM) y sus subproductos. *Acta universitaria*. 25 (3): 24-39.
- Whale, A., Huggett, J., Tzonev, S. (2016). Fundamentals of multiplexing with digital PCR. *Biomolecular Detection and Quantification*. 10: 15-23.

- Wu-Yi, L. (2014). Application of *in silico* PCR Strategy for Primer Design and Selection of Chicken AMPK Gamma Subunit Gene Loci. *Biotechnology*, 13: 190-195.
- Yu, B., Zhang, C. (2011). In Silico PCR Analysis. In *Silico Tools for Gene Discovery*, 91–107. doi:10.1007/978-1-61779-176-5_6