

Informe final* del Proyecto KE007
Detección de polen de plantas genéticamente modificadas en miel. Fase I

Responsable: Dra. Amanda Gálvez Mariscal
Institución: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química
Departamento de Alimentos y Biotecnología
Dirección: Circuito de la Investigación Científica s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán,
México, DF, 04510, México
Correo electrónico: galvez@unam.mx
Teléfono, fax 5622-5208 Fax: 56225217
Fecha de inicio: Octubre 10, 2012
Fecha de término: Diciembre 5, 2013
Principales resultados: Informe final
Forma de citar el informe final y otros resultados:** Gálvez Mariscal, A. 2013. Detección de polen de plantas genéticamente modificadas en miel. Fase I. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. **Informe final SNIB-CONABIO, proyecto KE007.** México, D. F.

Resumen:

En las regiones del mundo con grandes plantaciones de soya, como en Estados Unidos y Argentina, se ha encontrado presencia de secuencias GM en mieles. Dichas secuencias se derivan de la presencia de polen como un componente natural de la miel. Sin embargo ante la siembra de soya GM, el polen encontrado en dichas mieles es ahora polen GM de *Glycine max*. En México la superficie de soya cultivada en la Península de Yucatán se ha incrementado sustancialmente en los últimos años. Actualmente, y debido a la siembra de soya GM en Yucatán y Campeche de años anteriores, algunos importadores de mieles alemanes hallaron secuencias GM, como claramente lo expone Raezke en 2012, entre un 10 y un 13% en las mieles de la Península: cantidades suficientes para que hayan sido rechazadas por los importadores europeos. En el mes de febrero de 2012 la compañía Monsanto solicitó la siembra de 60 mil ha sólo en la península de Yucatán. El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) informó a inicios del mes de junio de este año, la emisión de un permiso de liberación comercial de soya genéticamente modificada para una superficie potencial de siembra de 253 mil 500 hectáreas en los estados de Campeche, Quintana Roo, Yucatán, Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz y Chiapas. Se trata de soya GMSOLUCIÓN FAENA® o RoundupReady (MON- Ø4Ø32-6). La consecuencia de esta siembra será la presencia altamente significativa de polen GM en el área, por lo que es muy probable que se puedan encontrar secuencias genéticamente modificadas de soya GM en las mieles del área y por ende sea rechazada en los mercados europeos que no aceptan niveles de polen GM por arriba del 0.9% en el polen residual en el producto final.

Los resultados que se espera obtener en la Fase I del proyecto probablemente presenten concentraciones muy bajas de secuencias GM debido a que hasta tiempos recientes se han autorizado liberaciones al medio ambiente en Yucatán, no así en el estado de Campeche donde ha habido liberaciones más antiguas. Hay dos asuntos importantes que atender en este caso. El primero es conocer la situación actual, es decir, la cantidad de polen GM actualmente presente en las mieles de la Península. El segundo es el monitoreo de las mieles a través de tiempo para conocer la evolución (incremento) de la presencia de polen GM en las mieles mexicanas, lo que se podrá obtener en una segunda fase de la investigación.

Para esto es necesario poner a punto una metodología para el monitoreo y para la detección (eventualmente también la identificación) de las secuencias GM que se hallen en las mieles en un futuro cercano, debido a las autorizaciones que el gobierno de México ha concedido a las empresas transnacionales para la siembra de soya GM en la Península de Yucatán, la Huasteca y Chiapas.

El presente proyecto describe la estrategia metodológica que propone el laboratorio 312 de la Facultad de Química para primeramente conocer si existe o no la presencia de polen GM en 56 muestras de

mieles; 47 del estado de Campeche, dos de Yucatán y una de Quintana Roo y 6 muestras de referencia, proporcionadas por la CONABIO, en una primera etapa. Esta primera fase propone instrumentar la metodología para extraer el ADN del polen hallado como componente residual de las mieles, lo que requiere de un equipo especializado para realizar la molienda con pequeñas perlas de vidrio para poder destruir la matriz natural de los granos de polen que resultan ser un material sumamente resistente. Una vez extraído el polen del ADN, éste debe prepararse y amplificarse para poder conocer si las secuencias presentes coinciden con las secuencias GM que son comúnmente encontradas en los OGMs comerciales. Para lograrlo se requiere conocer si además de la soya Solución Faena®, se manejan en la zona de la península otros cultivos GM, para poder solicitar la síntesis de sondas y cebadores, y realizar las reacciones de amplificación e identificación del ADN foráneo (transgénico). Para ordenar estos reactivos debe hacerse primeramente un diseño de las secuencias complementarias requeridas para identificar plenamente los genes buscados y debe solicitarse su síntesis en las empresas especializadas en cantidades estándar de 100 a 200 reacciones, lo que puede resultar excesivo para la fase I del proyecto. Sin embargo podrán ser utilizadas en la segunda fase, cuya metodología será sometida a evaluación posteriormente, lo que permitiría identificar plenamente el OGM en cuestión.

Los resultados permitirán conocer si en las muestras actuales de mieles existe o no la presencia de polen GM. Los niveles en los que se encuentren en un principio no serán cuantificados, puesto que el primer objetivo es conocer si existe o no esa presencia. Sin embargo la metodología, que utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (también llamada PCR cuantitativa o qPCR) no sólo es sumamente sensible y logra detectar niveles muy bajos del ADN buscado, sino que puede ser fácilmente cuantificable, mediante la construcción de una curva estándar y la comparación de los resultados de la amplificación con los valores estándar de la curva y de la cuantificación de un gen interno de la especie a cuantificar, en este caso un gen interno de soya como especie. Así mismo se pretende conocer si el polen presente en las mieles proviene también de maíz (GM o no-GM), ya que es la otra fuente natural de polen proveniente de cultivos de los alrededores de los apiarios. Los ADNs extraídos serán manejados en grupos de muestras (pools) para hacer un uso más racional de los recursos que se obtengan para realizar este proyecto, pero hechos de tal forma que sea fácil regresar a analizar las muestras originales y verificar la presencia, y eventualmente la identificación del evento específico de transformación (transgénico) que de origen al ADN foráneo.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

**DETECCIÓN DE POLEN
DE PLANTAS GENÉTICAMENTE
MODIFICADAS EN MIEL.
FASE I**

**Carolina Peña Montes, Maricarmen Quirasco Baruch, Cindy Adriana Estrada
Hernández y Amanda Gálvez Mariscal**

Septiembre 2013

**INFORME FINAL
DETECCIÓN DE POLEN
DE PLANTAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS EN MIEL.
FASE I**

**Carolina Peña Montes, Maricarmen Quirasco Baruch, Cindy Adriana Estrada
Hernández y Amanda Gálvez Mariscal**

Septiembre 2013

**Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
Departamento de Alimentos y Biotecnología. Laboratorio 312. Circuito de la
Investigación Científica s/n. Ciudad Universitaria. México D.F. 04510**

INTRODUCCIÓN

En las regiones del mundo con grandes plantaciones de soya, como en Estados Unidos y Argentina, se ha encontrado presencia de secuencias genéticamente modificadas (GM) en mieles hasta en un 29% de las muestras (Intertek Labs, 2012). Dichas secuencias se derivan de la presencia de polen de soya, que como otros gránulos de polen de diferentes flores, son un componente natural de la miel. A pesar de tener poco aroma, la flor de soya es un sitio en el que pecorean las abejas y de hecho los agricultores de soya las utilizan para mejorar la producción de grano (Vides, 2012). En 2012 ha surgido el problema del rechazo de mieles orgánicas de la Península de Yucatán en el mercado alemán por contener polen de soya GM. La razón es que en México la superficie de soya cultivada en la Península se ha incrementado sustancialmente, posterior a los ensayos experimentales iniciados en 2005, pues a partir de 2010 se solicitaron 12 mil hectáreas para sembrar Soya Roundup Ready (RR) en la región ya en forma comercial y en febrero de 2012 al menos se quintuplicó la superficie solicitada por la compañía Monsanto sólo en Yucatán (60 mil hectáreas). Actualmente, y debido a estas siembras comerciales y experimentales de soya GM en Yucatán y Campeche, algunos importadores de mieles alemanes mandaron analizar muestras de esas producciones hallando secuencias GM, como claramente lo expone Raezke en 2012, entre un 10 y un 13% en las mieles de la Península. Las cantidades halladas fueron suficientes para que fueran rechazadas por los importadores europeos. Es importante mencionar que la cifra crítica de secuencias GM presente en muestras corresponde a un 0.9% en masa de GM en el total del polen, no de la miel, puesto que se considera al polen como un ingrediente, lo que hace más astringente la reglamentación europea.

El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) informó a inicios del mes de junio de 2012, la emisión de un permiso de liberación comercial de soya genéticamente modificada para una superficie potencial de siembra de 253 mil 500 hectáreas en los estados de Campeche, Quintana Roo, Yucatán, Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz y Chiapas (CIBIOGEM, 2013). Específicamente, se trata de permisos de siembra de soya GM Solución Faena® o Roundup Ready (soya RR) o MON- Ø4Ø32-6 (Fig. 1). Considerando la situación reportada en Argentina, la consecuencia en las futuras temporadas de siembra será la presencia altamente significativa de polen GM en el área, que puede pasar a las mieles producidas en las zonas donde se concedieron las autorizaciones para la siembra de soya RR y ser identificado como polen GM en las mieles de la Península de Yucatán, en niveles mayores a los

actuales. La consecuencia probable es que, por ende, estas mieles sean rechazadas en los mercados europeos. En ese bloque comercial, cuando los niveles de secuencias GM se encuentran por arriba del 0.9% del polen total del producto final requieren de un etiquetado que claramente establezca que contiene OGMs (siempre y cuando se trate de un OGM autorizado en la UE) lo que resulta una desventaja en términos de mercadotecnia en el comercio europeo. Por otro lado, esos niveles implican la pérdida de la certificación orgánica, pues en ese caso la tolerancia es cero. Así mismo, si se encuentran secuencias GM aunque estén debajo del 0.9% pero que pertenecen a OGMs no autorizados por la UE, la tolerancia es cero. Hasta el día de hoy no han cambiado las decisiones jurídicas europeas que consideran al polen como un ingrediente y que requieren de la detección de la presencia de OGMs, por lo que sigue vigente el escrutinio al que se someten las importaciones de miel de países como México.

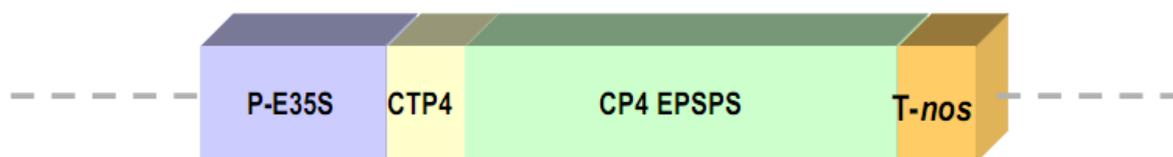


Figura 1. Representación esquemática de la construcción de Soya Roundup Ready. El evento de tolerancia a glifosato contempla el promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor (P-E35S), un segmento que codifica para un péptido señal dirigida a cloroplasto (CTP4), el gen CP4 *EPSPS* aislado de una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que provee la resistencia al herbicida glifosato y el terminador nopalina sintasa T-nos (JRC, 2007).

Este proyecto se planteó inicialmente en dos fases. En la Fase I se vislumbró la posibilidad de encontrar señales positivas por la presencia de OGMs, pero en concentraciones muy bajas, puesto que se analizaron mieles muestreadas en la Península, que fueron acopiadas en los primeros meses de 2012 y/o que se encontraban almacenadas en tanques que contenían mieles producidas aun en tiempos anteriores a las liberaciones, que fueron incrementándose en superficie de soya GM en la zona (12 mil Ha en 2010, 30 mil en 2011) (CIBIOGEM, 2013). El objeto era conocer la “línea base” de contenido de polen GM en muestras, en términos de presencia/ausencia. En la Fase II se planteará la cuantificación de las secuencias GM encontradas en nuevas muestras.

RESUMEN

La Fase I de este proyecto tuvo por objeto conocer la presencia/ausencia de secuencias GM en las mieles de la Península de Yucatán. Por lo anterior la CONABIO entregó al Laboratorio 312 de la Facultad de Química de la UNAM algunas muestras de miel colectadas en 2012.

El presente informe reporta la metodología implementada para el análisis de OGMs en miel y los resultados obtenidos para las 58 muestras en estudio. Se describe a detalle la metodología de extracción, basada en los procedimientos reportados, técnicas y tipos de reactivos, para la correcta extracción y aislamiento de ADN de polen de buena calidad con las técnicas utilizadas en el laboratorio de Intertek, Alemania y que fueron utilizadas para los análisis que resultaron en los rechazos de cargamentos mexicanos de miel. Esta metodología fácilmente puede hacerse cuantitativa, lo que será necesario si se encuentran cantidades significativas de polen GM, es decir, por arriba de un cierto umbral de cuantificación que, eventualmente, deberá determinarse.

Respecto de los tipos de polen hallado en mieles de la Península, se consideró la posibilidad de encontrar polen de las seis principales flores donde normalmente pecorean las abejas en esa región (CONABIO, 2012), pero también polen de los cultivos aledaños a los panales: de soya y también de maíz, por lo que los resultados mostrados incluyen el análisis de ambos cultivos (GM y no-GM). Esto tiene por objeto el conocer mejor, desde un punto de vista molecular, los tipos de polen presentes en las mieles de la zona muestreada. Lo que aportará información sobre lo que será necesario hacer para la extracción del ADN a partir de dichos tipos de polen.

En total se analizaron 56 muestras proporcionadas por la CONABIO y 2 muestras comerciales, adquiridas durante el desarrollo del proyecto.

De las 56 muestras de estudio proporcionadas por CONABIO, sólo una de ellas mostró la presencia de polen de soya (muestra con clave CM-001) que además resultó positiva para polen de soya GM *MON Ø4Ø32-6*. Doce de esas 56 muestras mostraron presencia de polen de maíz, pero ninguna resultó positiva para promotor *35S*, lo que indica ausencia de polen de maíz GM.

De las dos muestras comerciales, la miel adquirida en Suiza (Landhöning, proveniente de norteamérica y sudamérica, de acuerdo a la etiqueta), presentó ADN de maíz y soya, y generó amplificación para promotor *35S*, específicamente para el evento Roundup Ready.

Los resultados obtenidos indican la presencia de polen genéticamente modificado en una de las 56 muestras evaluadas. Para decidir si esta muestra resulta inaceptable, se requiere la identificación del evento de transformación y la verificación de que se encuentre entre los eventos prohibidos en ese bloque comercial. De acuerdo con la legislación europea para productos orgánicos incluyendo miel, la presencia de OGMs está prohibida en la producción orgánica y los productos que contengan OGMs no podrán ser etiquetados como orgánicos, a menos que sus ingredientes (lo que incluye al polen de acuerdo con las nuevas normativas europeas) contengan OGMs que hayan entrado no intencionalmente al producto y que además se encuentren en cantidades menores al 0.9% .

MUESTRAS ANALIZADAS

Se recibieron de la CONABIO 56 muestras de miel, de las cuales 49 se colectaron en campo en la península de Yucatán y siete fueron muestras comerciales de la misma región. El origen de estas últimas se muestra en la tabla 1, de acuerdo con la descripción de las etiquetas:

Tabla 1. Información declarada en etiqueta de las muestras de miel comercial.

NOMBRE	REGIÓN PRODUCTORA	ORIGEN DEL POLEN	EMPRESA PRODUCTORA
Miel pura Pino- Encino	Sierra de Zongolica al pie del pico de Orizaba (Veracruz)	Pinares y encinos	APIMEXICA
Miel pura de Cafetal	Región de Coatepec (Veracruz)	Árboles de naranjo, mandarina, chalahuite, hinicuil, gravilea, jonote y café	APIMEXICA
Miel pura de Selva Baja	No especificado	Quiebra platos, mazote, girasoles silvestres, guaje, huizache, palo mulato y taray	APIMEXICA
Miel pura de Mangle	Zona lagunar de Alvarado-Tlacotalpan (Veracruz)	Manglares	APIMEXICA
Miel de apiarios Apimaster	Hopelchén (Campeche)	No descrito	APIMASTER
CPQ-933	No descrito	No descrito	MIEL GABRIELA SA DE CV
MIDI 12052	No descrito	No descrito	MIEL GABRIELA SA DE CV

Adicionalmente, se adquirieron durante el desarrollo del proyecto dos tarros de miel comercial descritas en la tabla 2. Una comprada en Suiza etiquetada como “de origen norteamericano o sudamericano” y otra de nombre “Mi miel” envasada y comprada en Mérida, Yucatán.

Tabla 2. Información de etiquetado de las mieles comerciales analizadas.

NOMBRE	REGIÓN PRODUCTORA	EMPRESA PRODUCTORA
Landhönig	Norteamérica y Sudamérica	Migros
Mimiel	Mérida (Yucatán)	Integradora Agroindustrial Mira SA de CV

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Fraccionamiento y caracterización de las muestras de miel.

El manejo de una muestra de miel comienza con un calentamiento en baño maría (Equipo Oakton, 50 °C, 20 minutos) para poder homogeneizarla y filtrarla (Embudo Büchner de 8 cm de diámetro con 91 orificios de 1.2 mm de diámetro) y con ello separar las impurezas encontradas que generalmente consisten en residuos de insectos o incluso insectos completos. La miel filtrada se colectó en un matraz Erlenmeyer de 1L, sobre una parrilla con agitación y calentamiento (barra magnética de 1.5”, agitación moderada, hasta

alcanzar 60 °C). La miel limpia y homogénea se fraccionó en cuatro partes en frascos de PET de 250 mL. El objeto de dividir las muestras en cuatro fue dejar una parte para el archivo, una para realizar análisis de tercería, una más para realizar los análisis en el laboratorio 312 de la FQ-UNAM y una cuarta para ser enviada al laboratorio alemán de referencia para corroborar los resultados obtenidos. Posteriormente se procedió a hacer una descripción físico-organoléptica de las mieles. Se consideró su color, aroma y la presencia/ausencia de cuerpos de abeja o sus restos, y se anotó alguna observación que indicara si la miel se encontraba en buen estado.

Separación del polen de la miel y ensayos con los kits de extracción.

En seguida se procedió a separar físicamente el polen de las mieles (por cuadruplicado pesar 12.5g en tubos Falcon de 50mL, calentar 400 rpm a 50 °C, 20 min, y centrifugar 5 min a 5,000 x g, Biofuga Heraeus) para poder posteriormente someterlo al procedimiento de extracción descrito mas adelante. En este punto se puede suspender el protocolo, se recomienda mantener el polen en refrigeración y proceder al día siguiente con el protocolo de extracción.

Debido a la textura de los gránulos de polen y su dureza, es recomendable utilizar el sistema de disrupción y homogenización Tissue Lyser II, de la marca QIAGEN con capacidad de procesar 48 o 192 muestras, que somete al polen a una fuerte agitación en pequeños contenedores, con perlas de metal a manera de romper el tejido de los gránulos para liberar el material genético. Para esto último es necesario usar sistemas de extracción comerciales (kits) que contienen detergentes y una combinación de reactivos que rompen la pared y membrana celulares. Adicionalmente se incluyen pasos para eliminar otros contenidos celulares y proteínas con el fin de purificar el ADN. En este proyecto se probaron dos kits disponibles en el mercado mexicano: Mericon Food de Qiagen y Fast ID de Genetic ID. Una vez extraído el ADN es necesario cuantificarlo para estandarizar la concentración de ADN en cada uno de los ensayos.

Una vez extraído el ADN, se cuantificó y verificó su integridad. Adicionalmente es importante conocer la capacidad de amplificación del material extraído, lo que asegura la ausencia de sustancias inhibidoras de la reacción de la polimerasa que pudieran encontrarse en las mieles, o bien como residuos de los kits de extracción. Frecuentemente es necesario repetir alguno de los pasos de purificación de los kits, resultados que se presentan en este informe. Es importante enfatizar que la cantidad extraída no es tan importante como la pureza del ADN obtenido en el proceso.

Cuantificación del ADN extraído

Se realizó espectrofotométricamente en un equipo Epoch Take 3 (BIOTEK) a 260 y 280 nanómetros, lo que permite determinar la concentración del ADN y proteínas extraídas. Una relación de absorbancia de 260/280 entre 1.9 y 2.0 indica que la preparación de ADN obtenida es suficientemente pura.

Posteriormente, se realizó una electroforesis (Cámara Horizon 58, Fuente de poder BIORAD, 80V, 40 min) en gel de agarosa al 1% para visualizar la integridad del ADN extraído. Finalmente se realizó una reacción de PCR con cebadores universales de planta para evaluar la capacidad del ADN para su amplificación, es decir, que no hubiera inhibidores para la reacción de la polimerasa y que se encontraba lo suficientemente íntegro para generar una señal de amplificación.

Amplificación por PCR en tiempo real del ADN extraído.

Con el equipo de PCR en tiempo real de Applied Biosystems 7500 y utilizando la química de TaqMan, es posible registrar el avance de la amplificación de ADN mediante la lectura de la fluorescencia generada por las sondas de hidrólisis cuando éstas logran alinearse (hibridarse) con el ADN molde, e hidrolizarse por la actividad exonucleasa 5' de la ADN polimerasa. Una señal de fluorescencia significa que en la muestra se encuentra el ADN buscado. Se registra el número de ciclo (Ct) en el que se muestra la franca amplificación de la muestra. Un valor de Ct alto indica que sólo en los ciclos finales de amplificación se inicia la generación de fluorescencia, lo que significa que las moléculas de ADN blanco (el gen buscado) se encuentran en muy baja concentración. Debe verificarse que un valor de Ct alto, por arriba de 35 ciclos, no sea causado por alguna hibridación inespecífica, lo que constituiría un falso positivo. Por esta razón es importante conocer el límite de detección de la reacción para poder discernir si se trata de una concentración efectivamente baja o si se trata de señales no específicas.

La síntesis de cebadores y sondas corrió a cargo de la empresa Life Technologies con base en las secuencias propuestas en el proyecto, descritas más adelante en esta sección. Éstas fueron diseñadas para hibridar con: a) secuencias de soya (*Glycine max*), es decir con cualquier soya GM o no GM; b) con secuencias del promotor 35S, que se encuentra presente en la variedad de soya Solución Faena® o Roundup Ready; c) maíz (*Zea mays*) para investigar la posible presencia de polen de maíz. Una verificación más, realizada en el proyecto es la reacción positiva con un gen universal para planta, *act*. Además esta última prueba permite conocer la calidad del ADN extraído para su correcta amplificación. Los genes de referencia utilizados para las reacciones son: los genes endógenos *hmg* (high mobility group) de maíz, *lec* (lectina) para soya y el universal de planta ya mencionado.

Una vez extraído el ADN, las muestras fueron analizadas por la técnica de PCR en tiempo real, realizando las corridas en el equipo Applied Biosystems 7500 y siguiendo la química de Taqman bajo las siguientes condiciones de reacción:

Tabla 3. Concentración de los componentes para las reacciones de PCR tiempo real

Reactivo	Concentración final
Master mix TaqMan®	1X
Stock (Cebadores universales +Sonda)	1X
Cebador F	300nM
Cebador R	300nM
Sonda FAM o VIC	180nM
ADN	100 ng
Volumen final : 20 uL	

Tabla 4. Condiciones de amplificación.

No. de Ciclos	Condiciones
1 ciclo	50°C, 2 minutos
1 ciclo	95°C, 10 minutos
45 ciclos	95°C, 15 segundos y 60 °C , 1 minuto

En organismos genéticamente modificados, las secuencias más frecuentes para la regulación de transgenes son el promotor *35-S* (derivado del virus del mosaico de la coliflor) y el terminador *t-nos* (derivado de *Agrobacterium tumefaciens*). Por ello actualmente siguen siendo considerados genes de cribado o de screening.

En éste proyecto, los genes utilizados para la identificación de eventos transgénicos fueron: *p-35S* (promotor 35S CaMV), *t-nos* (terminador Nopalina Sintasa) y *MON Ø4Ø32-6* (Roundup Ready) Mientras que los genes utilizados para la identificación de genes de referencia a maíz, soya y planta fueron: *hmg* (high mobility group), *lec* (lectina), *act* (actina) y gen universal de planta (secuencias no conocidas). La descripción de cebadores y sondas utilizados para su identificación se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Descripción de las secuencias de cebadores y sondas utilizados para identificación de genes de referencia y eventos específicos en miel.

Secuencia blanco	Nombre	Referencia
Promotor <i>35S CaMV</i>	Cebador directo 5' CGTCTTCAAAGCAAGTGGATTG 3' Cebador reverso 5' TCTTGCGAAGGATAGTGGGATT 3' Sonda 5' FAM-TCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCA- TAMRA 3'	JRC, 2010 ^a
Terminador <i>t-nos</i>	Cebador directo 5' CATGTAATGCATGACGTTATTTATG 3' Cebador reverso 5' TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT 3' Sonda 5' VIC-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA- TAMRA 3'	JRC, 2010 ^c
<i>Mon 04032-6</i> Roundup Ready®	Cebador directo 5' GGATTTTCAGCATCAGTGGCTACA 3' Cebador reverso 5' CCGGAAAGGCCAGAGGAT 3' Sonda 5' FAM-CCGGCTGCTTGCACCGTGAAG- TAMRA 3'	JRC, 2010 ^d
<i>act</i> Actina de planta	Cebador directo 5' CAAGCAGCATGAAGATCAAGGT 3' Cebador reverso 5' CACATCTGTTGGAAAGTGCTGAG 3' Sonda 5' FAM-CCTCCAATCCAGACACTGTACTTYCTCTC- TAMRA 3'	Waiblinger, et al., 2012
<i>hmg</i> High mobility group. Maiz	Cebador directo 5' GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT 3' Cebador reverso 5' TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA 3' Sonda 5' FAM-CAATCCACACAAACGCACGCGTA- TAMRA 3'	JRC, 2010 ^e
<i>lec</i> Lectina de soya	Cebador directo 5' CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC 3' Cebador reverso 5' GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCC 3' Sonda 5' FAM-CTTCACCTTCTATGCCCTGACAC-TAMRA 3'	JRC, 2010 ^b

RESULTADOS

Estandarización del método de extracción de ADN

Primera parte: Evaluación de los kits de extracción de ADN.

Para la disrupción de gránulos de polen, se consideró el protocolo de la Oficina Federal de Protección al Consumidor y de Seguridad Alimentaria Alemana (ANEXO 1) como base del método implementado para CONABIO. La variable evaluada en esta parte del trabajo fue el kit de extracción y purificación de ADN: el kit Mericon Food de QIAGEN y con el kit FastID de Genetic ID, obteniendo los resultados de la tabla 6.

Tabla 6. Concentraciones de ADN obtenidas utilizando el protocolo alemán para la fase de disrupción y probando diferentes kits de extracción.

	Concentración (ng/μL)	Índice 260/280
Kit Fast ID	4.64±0.72	2.87±0.11
Kit Mericon Food	4.22±0.99	2.30±0.19

Como se pudo apreciar, ambos kits extraen cantidades similares de ADN, sin embargo el kit Mericon Food permite obtener una mayor pureza de acuerdo al índice 260/280.

Segunda parte: Protocolo de disrupción.

Se probó un protocolo (ANEXO 2), en el cual la diferencia más notable era la omisión del tiempo de reposo (12h) que sugiere el protocolo alemán. De igual manera se probaron ambos kits para la fase de extracción, obteniéndose los resultados de la tabla 7.

Tabla 7. Concentraciones de ADN obtenidas utilizando el protocolo QIAGEN para la fase de disrupción y probando diferentes kits de extracción.

	Concentración (ng/μL)	Índice 260/280
Kit Fast ID	5.08±0.17	2.30±0.2
Kit Mericon Food	4.28±0.02	2.07±0.03

Como se puede observar en la tabla 7, las concentraciones de ADN obtenidas, partiendo de la misma muestra, son similares a las obtenidas con el protocolo alemán y nuevamente se observa una mayor pureza de los extractos utilizando el kit Mericon Food.

A partir de este punto se consideró utilizar únicamente el kit de extracción Mericon Food de QIAGEN.

Tercera parte: Evaluación del diluyente de la miel.

Como tercer punto de evaluación se consideró la referencia presentada por Waiblinger et al. 2012, cuya modificación más relevante fue utilizar Buffer TE (Tris-EDTA) en lugar de agua grado biología molecular como diluyente inicial de la miel. Con esta modificación, en este trabajo, se obtuvo en promedio una concentración de 3.99 ng/μL y un índice 260/280 de 1.9. Aunado a esto, el mismo artículo también consideraba el reposo del concentrado de polen durante 12h con buffer TE. Realizando dicho paso, se obtuvo poca variación pues el valor de concentración promedio fue de 4.01 ng/μL con un índice 260/280 de 1.78. Con base en estos resultados, se decidió continuar utilizando agua como diluyente de la miel.

Cuarta parte: Adición de buffer de lisis durante la ruptura mecánica del polen.

Como cuarto y último punto a probar se tomó una sugerencia establecida en el protocolo del equipo de disrupción TissueLyser II (Operation instrucción, 2007), el cual hace mención a la incorporación del buffer de lisis durante la fase de homogenización en el equipo en lugar de agua, y un segundo paso de disrupción posterior a la adición de proteinasa K. Siguiendo tal protocolo se obtuvo una concentración de ADN promedio de 8.49 ng/μL y un índice de pureza de 1.89, lo cual sí representó una diferencia significativa respecto a los resultados obtenidos anteriormente.

Por lo tanto, el mejor método implica la ruptura celular con el equipo Tissue Lyser en presencia del buffer de lisis, y un segundo paso de ruptura con el equipo, posterior a la adición de proteinasa K. Adicionalmente, la utilización de una membrana de sílica para la purificación de ADN (incluida en el kit Mericon Food) es más práctica para procesar mayor número de muestras y es adecuada para obtener ADN de calidad amplificable en comparación de la precipitación con isopropanol, como lo indica el protocolo alemán.

Comprobación del funcionamiento del protocolo establecido.

Se evaluó el método propuesto por nosotros con una muestra de miel entregada por CONABIO al laboratorio para su análisis, una miel Melipona adicionada de 50 mg de polen comercial y polen comercial puro. Se observó el mismo resultado: aumento en la concentración y pureza de ADN obtenido (tabla 8).

Tabla 8. Concentraciones de ADN obtenidas a partir de diferentes muestras, utilizando agua o buffer de lisis durante el paso de disrupción

Muestra	Concentración (ng/μL)	Índice 260/280
Miel CCU-050 utilizando agua	1.69	1.14
Miel CCU-050 utilizando buffer	4.62	1.99
Miel Melipona + 50mg de polen comercial, utilizando agua	6.30	1.74
Miel Melipona + 50 mg de polen comercial, utilizando buffer	17.22	1.94
200 mg de polen comercial, utilizando agua	54.23	2.01
200 mg de polen comercial, utilizando buffer	62.24	1.99

Los resultados mostrados en la tabla 8 corroboran una mejoría en la eficiencia de extracción en los tres casos ensayados, por lo cual se recomienda llevar a cabo el proceso de extracción propuesto, que comprende las siguientes modificaciones al protocolo alemán:

- a. Ruptura celular en presencia del buffer de lisis: se resuspende el polen en 1mL de buffer de lisis del kit Mericon Food de QIAGEN (CTAB) en lugar de utilizar agua destilada y se procede de inmediato a homogenizar con el equipo de disrupción tisular.
- b. Se elimina el paso de reposo durante la noche, lo que hace más breve el protocolo
- c. Posterior a la adición de proteinasa K, hay una segunda homogenización en el equipo de disrupción tisular durante 2 min a 30 s^{-1}
- d. El ADN se purifica utilizando un sistema con membrana de sílica y lavados para eliminar sustancias que puedan interferir con la reacción de PCR, en lugar de precipitar con isopropanol.

Con los extractos de ADN obtenidos, se procedió a ensayar la amplificación en una reacción de PCR en tiempo real (qPCR), utilizando cebadores universales para planta, lo que corroboraría que el ADN tiene calidad amplificable y que se trata de materia vegetal. Los resultados se muestran en la figura 2. Cabe aclarar que en cada caso se utilizó el mismo volumen de muestra, con diferentes cantidades de ADN, lo que se ve reflejado en los valores de Ct obtenidos.

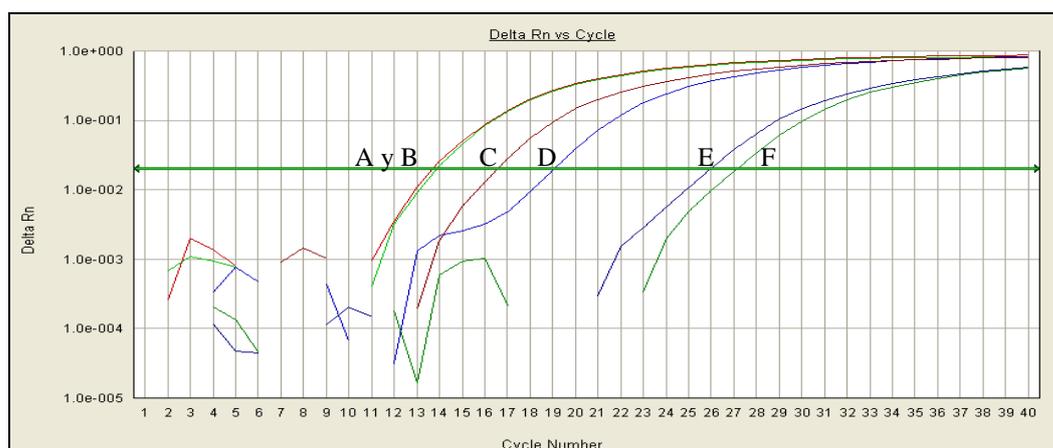


Figura 2. Amplificación del gen de planta universal a partir de: (A y B) ADN extraído de polen comercial [120 y 108ng], (C y D) ADN extraído a partir de 10 g de miel *Melipona* mezclado con 50 mg de polen comercial [86.1 y 31.5 ng] y (E y F) ADN extraído de la muestra CCU-050 [23.1 y 17.1ng]. En todos los casos se utilizó el método de disrupción con el equipo Tissue Lyser II.

Como segunda prueba se analizó una muestra de miel (CMM 014) mezclada con 50 mg de polen comercial. Ésta se sometió a extracción de ADN con la metodología de disrupción propuesta por el protocolo alemán, la cual involucra un reposo del polen en agua durante toda la noche y la disrupción de los gránulos utilizando perlas de vidrio, y por otro lado con la metodología que se estandarizó en el laboratorio utilizando el equipo disruptor Tissue Lyser II. Los extractos obtenidos de ADN fueron analizados por qPCR utilizando cebadores y sonda específicos para planta. La prueba se realizó con la finalidad de observar posibles diferencias en los valores de Ct debido a la integridad o daño en el ADN a causa del método de disrupción elegido.

Como se puede observar en la tabla 9, el método con el equipo disruptor generó una mayor cantidad de ADN que el protocolo con perlas de vidrio, y los valores 260/280 son aceptables para ambos métodos.

Tabla 9. Comparación de métodos de extracción de ADN para una muestra de miel inoculada con polen comercial.

CMM 014 con 50 mg de polen	Concentración (ng/μL)	Índice 260/280
Protocolo alemán	15.80	2.02
Protocolo con equipo disruptor	24.10	1.88

En la figura 3, se observó que el método elegido no interfiere en gran medida en los valores de Ct obtenidos, ya que el protocolo alemán generó en promedio un Ct de 18.18 mientras que el protocolo con el equipo disruptor dio un Ct de 17.58.

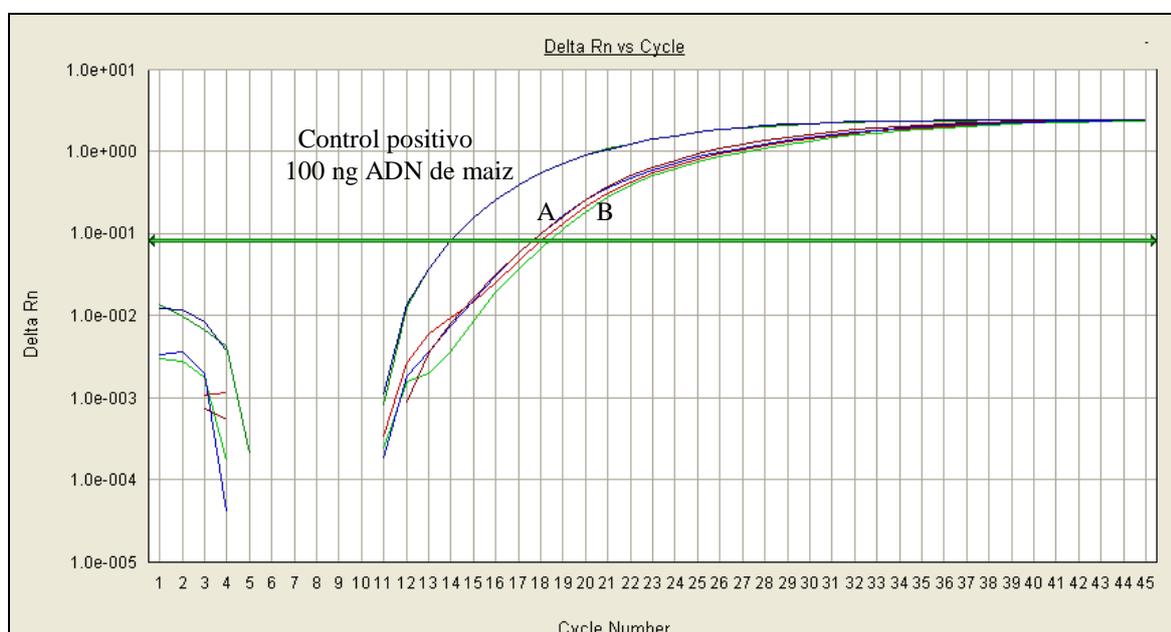


Figura 3. Amplificación de 100 ng de ADN de la muestra CMM 014 inoculada con 50mg de polen utilizando cebadores de planta. A) ADN obtenido por el protocolo alemán utilizando perlas de vidrio y reposo durante toda la noche (líneas en rojo y verde) y B) ADN obtenido por el protocolo del equipo disruptor Tissue Lyser (líneas en morado y café).

Los resultados anteriores muestran que la integridad del ADN obtenido con la metodología propuesta en este informe es muy similar a la que se obtendría utilizando el protocolo alemán.

Como último experimento referente a la estandarización del protocolo de extracción de ADN, se realizó un análisis de electroforesis en gel de agarosa para evaluar su integridad y su capacidad para ser amplificado. Los resultados se presentan a continuación.

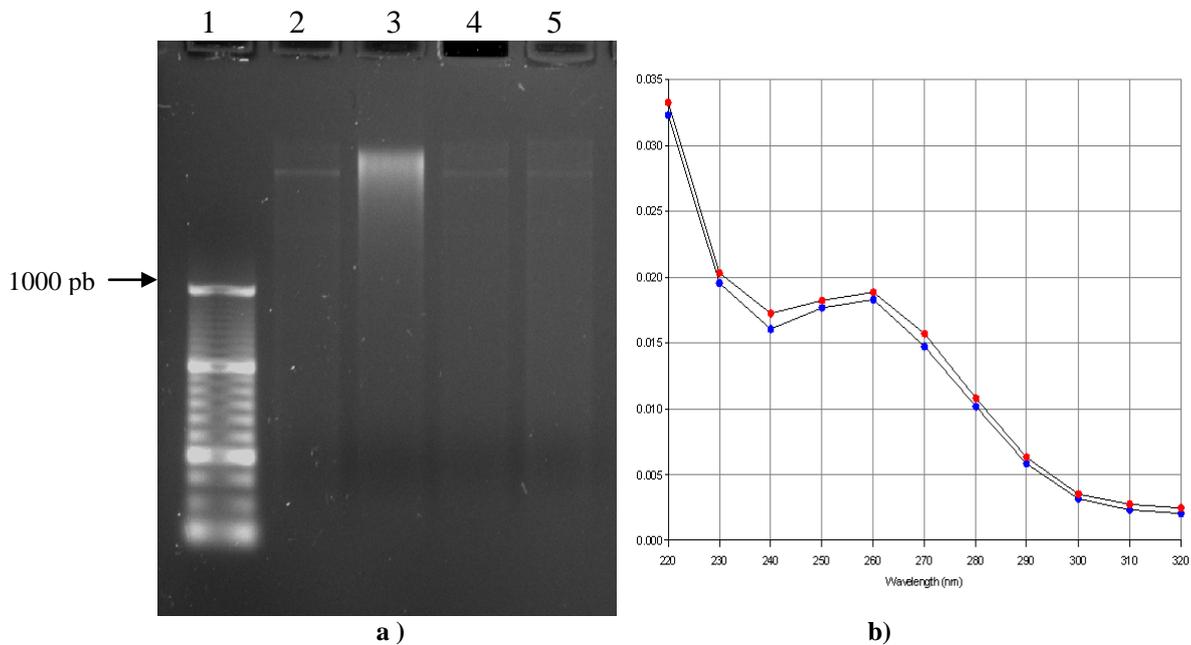


Figura 4. a) Gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio. Carril 1.- Marcador de peso molecular de 50 pb (Thermo Scientific). Carril 2.- Muestra CCU-050, utilizando buffer de lisis en el paso de disruptión (46.2 ng de ADN). Carril 3.- Muestra de miel Melipona con 25mg de polen comercial, utilizando buffer de lisis en el paso de disruptión (104.9 ng de ADN). Carril 4.- Muestra CCU-050 usando buffer TE como diluyente (38.31 ng de ADN). Carril 5.- Muestra CCU-050 usando buffer TE como diluyente y dejando reposar toda la noche (44.6 ng de ADN). **b) Espectro de absorbancia del ADN** extraído de miel Melipona con 25mg de polen comercial, utilizando buffer de lisis durante la disruptión.

Respecto a la figura 4, en el carril 2, a pesar de observarse un ligero barrido, se define una banda en la parte superior del gel por arriba de 1000 pb, la cual corresponde al ADN cromosomal extraído. Se observa que el ADN que presenta mayor degradación corresponde al que se obtuvo después de una incubación de 12h, como lo indica el protocolo alemán. Por lo anterior, se recomienda evitar ese paso, que además consume tiempo en la preparación de la muestra de ADN.

Los resultados obtenidos confirman que el protocolo establecido en este proyecto permite extraer ADN de calidad amplificable a partir de muestras de polen, cuyos gránulos son sumamente resistentes a la ruptura y que además se encuentran en pequeñas cantidades en la miel.

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS ENVIADAS POR CONABIO

Fraccionamiento y caracterización de las muestras de miel.

El fraccionamiento se realizó calentando la muestra a 60°C con agitación magnética moderada retirando al momento los insectos o impurezas grandes (como ya se describió anteriormente). Una vez homogenizada la muestra, se dividió en cuatro partes iguales colocándolas en recipientes limpios y estériles. Dichos envases fueron lavados previamente con una solución de hipoclorito de sodio al 10%, posteriormente etanol al 70% y se expusieron a una fuente de luz UV ($\lambda < 300\text{nm}$) por diez minutos. La densidad estimada de cada miel se calculó considerando el peso de la muestra con envase, restando después el peso del recipiente vacío y dividiendo entre el volumen aproximado.

La escala de color se consideró tomando como referencias la miel más clara (A), una miel intermedia (B) y la miel más oscura (C) (figuras 5 y 6).



Figuras 5 y 6. Muestras de referencia tomadas para la escala de colores.

En la tabla 10 se presentan las características visuales y sensoriales percibidas durante el fraccionamiento de las 58 muestras de estudio (56 muestras proporcionadas por la CONABIO y 2 muestras comerciales).

Tabla 10. Características visuales y sensoriales de las muestras de miel evaluadas

Muestra	Densidad aproximada g/mL	Color *	Impurezas	Observaciones	Aroma y sabor
CMM-001	1.30	Ámbar C	En superficie, muy pocas	---	Floral-Frutal
CMM-002	1.30	Ámbar B	En superficie, muy pocas	---	Floral-Frutal, intenso
CMM-003	1.32	Ámbar A	No	Cristalizada una tercera parte	Dulce
CMM-004	1.33	Ámbar B	En superficie, muchas	Restos de abeja	Floral-Frutal
CMM-005	1.25	Ámbar B	En superficies, muchas	---	Frutal-Floral
CMM-006	1.34	Ámbar B	En superficie, pocas	---	Floral
CMM-008	1.28	Ámbar C	En superficie, moderadas	Restos de abeja	Floral-Frutal
CMM-009	1.24	Ámbar B	En superficie, moderadas	---	Floral-Frutal
CMM-010	1.32	Ámbar B	En superficie, pocas	Tres insectos pequeños	Dulce, intenso
CMM-011	1.42	Ámbar C	No	Con etiqueta Apimaster Hopelchen Campeche	Frutal
CMM-012	1.39	Ámbar B	No	---	Dulce, suave
CMM-013	1.33	Ámbar B-C	No	---	Floral, intenso
CMM-014	1.37	Ámbar A	En superficie, abundantes	Restos de 2 abejas	Floral-Frutal
CMM-015	1.33	Ámbar A	En superficie, muchas	---	Frutal

Muestra (continuación)	Densidad aproximada g/mL	Color *	Impurezas	Observaciones	Aroma y sabor
CMM-016	1.27	Ámbar A	No	---	Floral-Frutal
CMM-017	1.33	Ámbar B	En superficie , pocas	Restos de una abeja	Floral
CMM-031	1.31	Ámbar B	No	---	Floral
CMM-032	1.31	Ámbar C	No	---	Dulce
CMM-044	1.35	Ámbar C	En superficie, pocas	---	Dulce, suave
QMM-045	1.34	Ámbar C	En superficie, pocas	---	Floral-Frutal, intenso
CMM-046	1.31	Ámbar A-B	No	---	Frutal
CMM-047	1.31	Ámbar C	No	---	Frutal
CMM-048	1.37	Ámbar B-C	En superficie, pocas	---	Frutal, suave
CPHU-001	1.32	Ámbar A	En superficie, pocas	---	Dulce, frutal
CPHU-002	1.26	Ámbar B	En superficie, pocas	---	Dulce, suave
CPHU-003	1.31	Ámbar B	En superficie, pocas	Espumosa. Se envasó a 50°C	Fermentado
CPHU-004	1.32	Ámbar A-B	En superficie, moderadas	---	Dulce, muy suave
CPHU-005	1.31	Ámbar C-B	En superficie, abundantes	Varias abejas. Espumosa.	Fermentado
CPHU-006	1.38	Ámbar B	En superficie, moderado	---	Dulce, suave
CPHU-007	1.30	Ámbar A	En superficie, pocas	---	Dulce, suave
CPHU-008	1.37	Ámbar A	En superficie, pocas	---	Dulce
CPHU-009	1.36	Ámbar C	En superficie, muy pocas	---	Frutal
CPHU-010	1.36	Ámbar A	En superficie, pocas	Un insecto pequeño	Dulce, floral
CO-18	2.26	Ámbar A	En superficie, muy pocas	---	Herbal, gusto ligeramente amargo
CO-19	1.34	Ámbar C	En superficie, moderado	Restos de abejas y una entera	Herbal, gusto ligeramente amargo
CRP-035	1.33	Ámbar A-B	No	---	Frutal
CRP-036	1.46	Ámbar A-B	En superficie, pocas	---	Dulce, suave
CRP-041	1.35	Ámbar C	No	---	Dulce, suave
CRP-043	1.30	Ámbar B	No	Espumosa. Se envasó a 40°C	Dulce, amaderado
CRP-053	1.32	Ámbar B-C	No	---	Dulce, intenso
CRP-054	1.29	Ámbar A-B	En superficie, pocas	---	Dulce, suave
CR0-052	1.26	Ámbar B-C	No	---	Dulce, frutal
CCV-033	1.29	Ámbar A	En superficie, pocas	---	Dulce, suave
CCV-039	1.33	Ámbar C	En superficie, abundantes	Muchas abejas	Floral-Frutal, intenso
CCV-040	1.30	Ámbar B	En superficie, moderado	---	Dulce, intenso
CCV-049	1.30	Ámbar A	No	---	Floral-herbal
CCV-051	0.86	Ámbar A	No	Cristalizada una quinta parte	Floral, intenso

Muestra (continuación)	Densidad aproximada g/mL	Color *	Impurezas	Observaciones	Aroma y sabor
CCU-050	1.31	Ámbar A-B	No	Sacó gas al abrir, muy espumosa, se envasó a 35°C	Dulce, fermentado
YMQ-003	1.37	Ámbar A	No	Espumosa. Se envasó a 45°C	Fermentado
YMQ-002	1.38	Ámbar A	En superficie, pocas	---	Herbal
MIDI-12052	1.20	Ámbar C	No	---	Frutal, suave
CPQ-933	0.89	Ámbar C	No	Espumosa	Fermentado, nota alcohólica
MANGLE	ND	Ámbar B	No	Cristalizada la parte inferior	Fermentado, nota alcohólica
CAFETAL	ND	Ámbar A	No	Opaca, un poco espumosa. Compacta	Ligeramente fermentado, nota a nuez
PINO ENCINO	ND	Ámbar B	No	Un poco espumosa. Compacta	Herbal, intenso
SELVA BAJA	ND	Ámbar B	No	Compacta	Dulce, frutal
LANDHONING [♦]	ND	Ámbar A	No	Compacta	Dulce, frutal, intenso
MI MIEL [♦]	ND	Ámbar A	No	---	Frutal, suave

* Ver escala de colores, figuras 1 y 2

--- Sin observaciones específicas

ND No determinado

♦ Muestra comercial

Una vez descritas las características organolépticas de las muestras de miel, se fraccionaron de acuerdo a lo descrito en la sección de metodología y se procedió a seguir el protocolo establecido para la separación de los gránulos de polen y la extracción del ADN. Los resultados de concentración e índices de pureza de las 58 muestras analizadas se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Concentraciones obtenidas e índices de pureza de las muestras de miel evaluadas

Muestra	Concentración (ng/μL) promedio	Desviación estándar	Relación 260/280 promedio	Desviación estándar
CMM-001	11.64	0.98	1.95	0.14
CMM-002*	42.70	10.07	1.56	0.13
CMM-003	15.36	0.13	1.80	0.12
CMM-004	40.78	5.22	1.92	0.01
CMM-005	47.71	5.00	1.65	0.08
CMM-006	19.37	1.70	1.92	0.09
CMM-008*	54.35	15.70	1.70	0.13
CMM-009*	15.99	0.15	1.67	0.06
CMM-010*	15.76	4.50	1.62	0.02

Muestra (continuación)	Concentración (ng/ μ L) promedio	Desviación estándar	Relación 260/280 promedio	Desviación estándar
CMM-011*	14.65	0.22	1.69	0.01
CMM-012	25.70	9.54	1.70	0.06
CMM-013	16.17	4.65	1.62	0.13
CMM-014*	8.61	0.23	2.20	0.08
CMM-015*	35.98	5.44	1.99	0.08
CMM-016*	42.72	8.75	1.74	0.12
CMM-017	22.44	9.86	1.72	0.33
CMM-031*	15.81	6.03	1.55	0.03
CMM-032*	12.53	1.94	1.71	0.03
CMM-044*	11.83	7.53	1.79	0.01
QMM-045*	29.53	7.11	1.68	0.07
CMM-046*	17.05	0.88	1.80	0.18
CMM-047*	18.24	1.01	1.77	0.10
CMM-048*	24.82	14.12	2.03	0.41
CPHU-001*	21.05	2.76	1.86	0.09
CPHU-002*	25.98	7.26	1.93	0.09
CPHU-003	42.34	3.67	1.86	0.02
CPHU-004	47.15	9.67	1.91	0.04
CPHU-005	48.44	1.09	1.90	0.02
CPHU-006*	39.23	10.04	1.78	0.02
CPHU-007*	20.28*	1.20	1.97	0.01
CPHU-008	27.24	2.12	1.90	0.08
CPHU-009*	25.51	3.05	1.77	0.01
CPHU-010	22.43	0.50	1.98	0.03
C0-18	43.14	3.30	1.90	0.06
C0-19*	14.29	0.11	1.83	0.08
CRP-035*	30.83	4.38	1.71	0.05
CRP-036*	22.29	1.97	1.71	0.04
CRP-041*	32.27	7.80	1.72	0.04
CRP-043	20.25	2.33	1.94	0.16
CRP-053*	17.98	9.61	1.67	0.12
CRP-054*	44.02	2.45	1.71	0.03
CRP-052*	20.75	2.69	1.81	0.20
CCV-033*	15.69	0.01	1.78	0.02
CCV-039*	24.09	0.66	1.71	0.15
CCV-040*	31.23	2.70	1.77	0.02
CCV-049*	14.63	4.58	1.74	0.04
CCV-051*	22.96	2.69	1.86	0.03
CCU-050	41.25	1.57	1.94	0.04
YMVQ-003*	20.88	2.65	2.04	0.02
YMJQC-002*	36.54	20.27	1.61	0.01
MIDI-12052**	10.49	--	1.66	--
CPQ-933*	8.77	0.08	1.83	0.17

Muestra (Continuación)	Concentración (ng/μL) promedio	Desviación estándar	Relación 260/280 promedio	Desviación estándar
Mangle*	13.91	0.66	1.93	0.01
Cafetal*	14.02	3.85	1.96	0.05
Pino Encino*	18.34	2.87	1.83	0.18
Selva Baja*	9.88	2.35	1.70	0.20
Landhönning*	14.01	1.58	1.87	0.06
Mimiel*	18.04	0.54	1.42	0.04

* Estas muestras dieron valores por debajo de 20 ng/μL después de la extracción de ADN por lo que se sometieron a un proceso de concentración en el equipo “DNA Plus” y el valor que se presenta corresponde a las muestras ya concentradas.

** Muestra insuficiente para realizar dos extracciones.

Análisis por qPCR

Una vez realizadas las corridas de PCR en tiempo real, los valores de Ct obtenidos para las muestras en estudio se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Valores de Ct obtenidos para las 58 muestras de miel en estudio y controles positivos. El ADN de cada muestra se analizó con cebadores específicos para los genes endógenos de planta, maíz y soya y para evento específico de transgénico

Muestra	Ct gen planta (act)	Ct gen maíz (hmg)	Ct gen soya (lec)	Ct transgén (p-35S)	Ct transgén (t-nos)	Ct transgén Mon 04032-6 Roundup Ready
Control positivo 1 * (Estándar de harina de maíz libre de OGM)	NA	19.95 ± 0.83	NA	NA	NA	NA
Control positivo 2 * (Estándar de harina de soya libre de OGM)	NA	NA	18.95 ± 0.54	NA	NA	NA
Control positivo 3 * (Estándar de harina de soya OGM 100% para p35S)	NA	NA	NA	19.23 ± 0.57	NA	NA
Control positivo 4 * (Estándar de harina de maíz OGM 60% para p35S)	NA	NA	NA	23.51 ± 0.23	NA	NA
Control positivo 5 (Harina de polen comercial)	19.91 ± 0.04	NA	NA	NA	NA	NA
Control positivo 6 * (Estándar de harina de soya OGM 100% RoundupReady®)	NA	NA	NA	NA	23.56 ± 0.37	23.18 ± 0.05
Control positivo 7 (ADN de Maíz OGM 100% para NK603)	NA	NA	NA	NA	23.91 ± 0.23	ND

Muestra (continuación)	Ct gen planta (act)	Ct gen maiz (hmg)	Ct gen soya (lec)	Ct transgén (p-35S)	Ct transgén (t-nos)	Ct transgén Mon 04032-6 Roundup Ready
CMM-001	29.90 ± 2.27	NEGATIVO	33.83 ± 0.31	37.81 ± 0.80	38.75 ± 0.18	37.77 ± 0.64
CMM-002	30.65 ± 0.37	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-003	32.01 ± 0.24	37.08 ± 0.96	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-004	31.38 ± 0.40	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-005	23.57 ± 0.90	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-006	31.68 ± 0.40	34.76 ± 0.31	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-008	39.84 ± 0.26	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-009	31.46 ± 0.18	37.10 ± 0.89	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-010	34.28 ± 0.23	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-011	38.82 ± 0.66	36.02 ± 0.46	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-012	36.49 ± 1.05	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-013	35.42 ± 0.63	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-014	35.02 ± 0.68	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-015	33.01 ± 0.97	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-016	33.57 ± 0.57	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-017	32.28 ± 0.43	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-031	33.89 ± 0.67	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-032	34.13 ± 0.40	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-044	32.05 ± 0.47	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
QMM-045	35.71 ± 0.41	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-046	32.89 ± 0.34	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-047	34.11 ± 0.55	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CMM-048	32.33 ± 0.19	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CPHU-001	35.12 ± 1.12	33.40 ± 0.69	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CPHU-002	32.79 ± 0.77	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CPHU-003	26.04 ± 0.40	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Muestra (continuación)	Ct gen planta (act)	Ct gen maiz (hmg)	Ct gen soya (lec)	Ct transgén (p-35S)	Ct transgén (t-nos)	Ct transgén Mon 04032-6 Roundup Ready
CPHU-004	22.35 ± 0.62	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CPHU-005	24.17 ± 0.29	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CPHU-006	34.20 ± 0.76	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CPHU-007	29.30 ± 2.09	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CPHU-008	34.69 ± 0.29	34.07 ± 0.92	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CPHU-009	32.62 ± 1.05	34.89 ± 0.63	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CPHU-010	34.68 ± 0.32	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CO-18	28.27 ± 0.01	36.28 ± 0.99	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CO-19	33.11 ± 0.24	36.80 ± 0.50	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CRP-035	33.24 ± 0.45	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CRP-036	34.06 ± 0.21	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CRP-041	34.45 ± 0.57	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CRP-043	22.06 ± 0.13	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CRP-053	34.63 ± 0.61	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CRP-054	35.94 ± 0.37	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CRP-052	33.42 ± 0.38	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CCV-033	32.00 ± 0.37	37.01 ± 0.89	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CCV-039	31.06 ± 0.45	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CCV-040	31.17 ± 0.38	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CCV-049	35.33 ± 1.11	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CCV-051	29.28 ± 0.98	36.11 ± 0.97	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CCU-050	35.82 ± 0.44	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
YMQV-003	31.78 ± 3.98	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
YMQC-002	42.28 ± 1.83	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
MIDI-12052	36.19 ± 0.26	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CPQ-933	31.16 ± 0.33	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Muestra (continuación)	Ct gen planta (act)	Ct gen maiz (hmg)	Ct gen soya (lec)	Ct transgén (p-35S)	Ct transgén (t-nos)	Ct transgén Mon 04032-6 Roundup Ready
MANGLE	38.27 ± 1.34	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CAFETAL	32.61 ± 0.66	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
PINO ENCINO	29.80 ± 0.67	38.88 ± 2.68	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
SELVA BAJA	36.02 ± 0.99	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
LANDHÖNING	30.12 ± 0.18	37.69 ± 0.39	35.30 ± 0.63	34.93 ± 0.16	37.15 ± 0.05	35.75 ± 0.34
MIMIÉL	34.03 ± 0.24	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

NA = No aplica

ND = No determinado por insuficiencia de ADN

* Muestras de Referencia proporcionados por el CENAM en el año 2012

En amarillo los resultados con señal positiva en la reacción de PCR para maíz, soya y soya RR.

Como se puede observar en la tabla 12, en trece de las muestras se halló presencia de polen de maíz pero ninguna de ellas dio resultado positivo para transgénico puesto que no hubo amplificación con ninguna de las secuencias que determinan promotor (*p-35S*) o terminador (*t-nos*). Las trece muestras identificadas con polen de maíz fueron las siguientes:

CMM-003
CMM-006
CMM-009
CMM-011
CPHU-001
CPHU-008
CPHU-009
C0-18
C0-19
CCV-033
CCV-051
Pino Encino
Landhöning

De las muestras proporcionadas por CONABIO, únicamente la muestra CMM-001 presentó polen de soya en pequeñas cantidades, y a su vez el ADN respectivo generó amplificaciones, tanto para el promotor *p-35S* y *t-nos*, como para el evento específico *MON 04032-6*. Los resultados son congruentes ya que la construcción del evento identificado contiene el promotor *35S* y terminador *nos*. Los valores de Ct para cada determinación coinciden: 37.81 ± 0.80 para *p-35S*, 38.75 ± 0.18 para *t-nos* y 37.77 ± 0.64 para *Mon 04032-6*. Adicionalmente, se encontró un Ct de 33.83 ± 0.31 para lectina de soya, lo que indica que en esta miel hay polen de soya no transgénica también.

Con la muestra CMM-001 se decidió explorar la posibilidad de cuantificar pequeñas cantidades de ADN, y a su vez estimar el porcentaje que corresponde al transgénico. Para ello, se realizó una curva patrón con el control positivo 3 (estándar de harina de soya OGM

100% para *p-35S* del CENAM) con valores que fueron de 50 a 0.005ng de ADN por reacción de qPCR (Fig. 7 y 8).

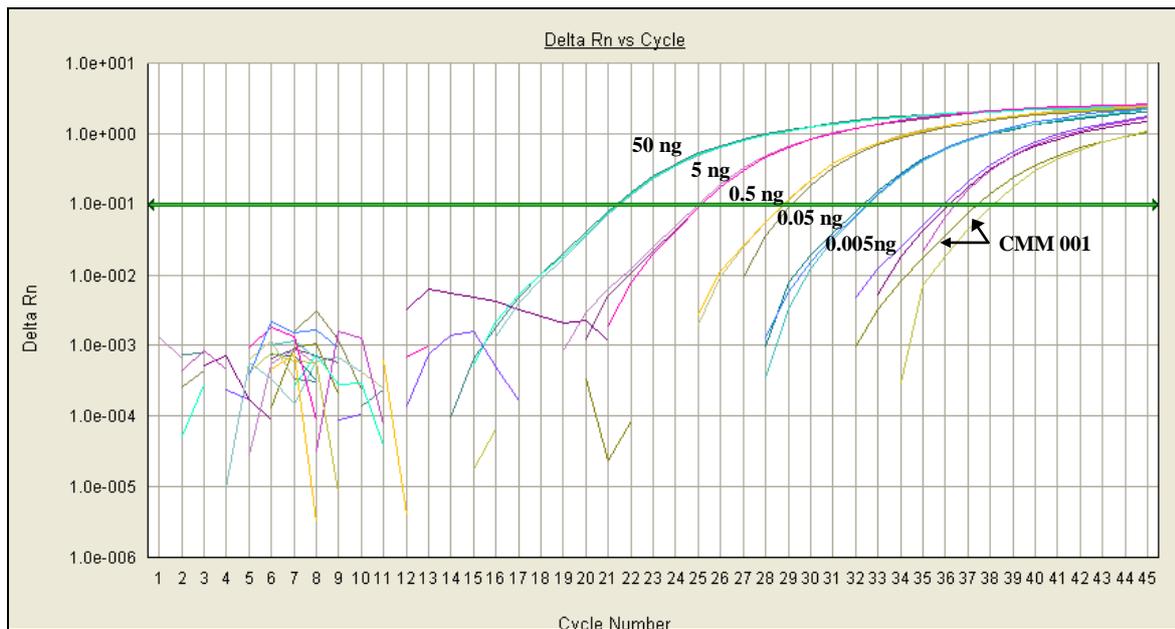


Figura 7. Amplificación de ADN de la muestra CMM-001 y curva patrón de ADN de soja transgénica con cebadores específicos para el promotor 35S. (50 ng de ADN molde analizado para la muestra CMM 001) 50 ng de ADN molde.

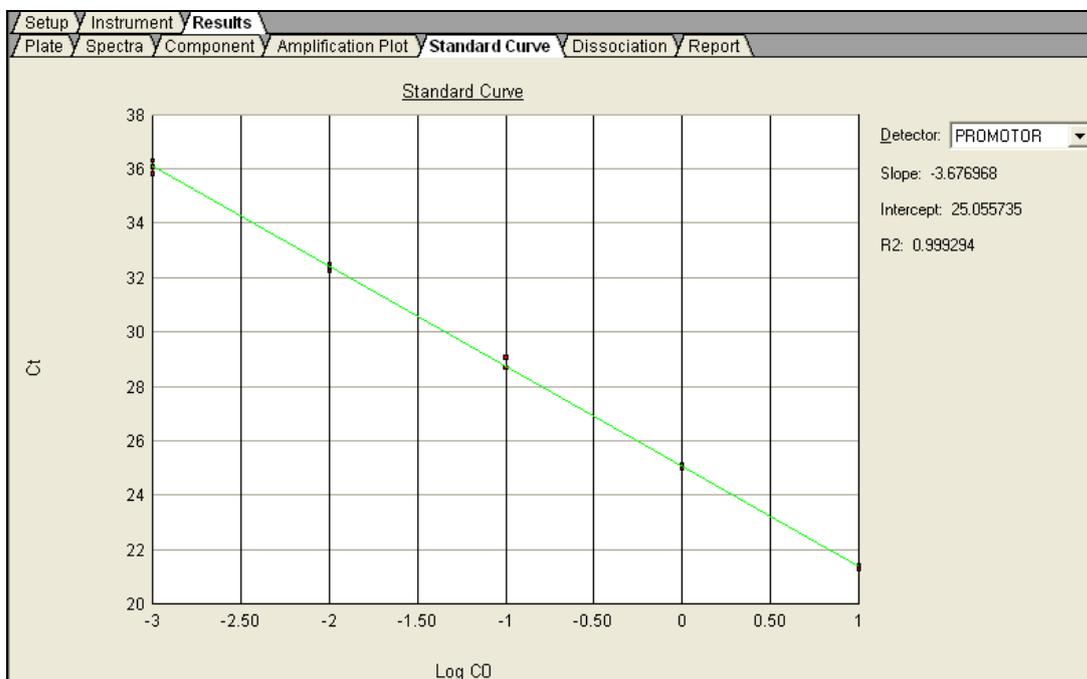


Figura 8. Curva patrón de ADN de soja transgénica con cebadores específicos para el promotor 35S.

En la figura 7, se observa que la muestra hallada positiva (CM-001) mostró amplificación por debajo del valor mínimo de Ct ensayado en la curva (0.005ng). Haciendo una extrapolación en la figura 8, se obtiene un valor aproximado de 0.0003 ng de ADN con el

promotor 35S por cada 50 ng de ADN del polen que ciertamente pertenece a diversas variedades de flores además de las de soya. En términos porcentuales, el 0.0006% del polen total de la muestra pertenecería a soya GM, valor por debajo del 0.9% aceptado por la Unión Europea, incluyendo alimentos orgánicos.

A manera de resumen se describen otros gráficos obtenidos por qPCR.

En la figura 9 se muestra la amplificación obtenida utilizando el gen *act* de polen comercial y del obtenido de las muestras de miel, y cuya secuencia se encuentra presente en cualquier tejido vegetal.

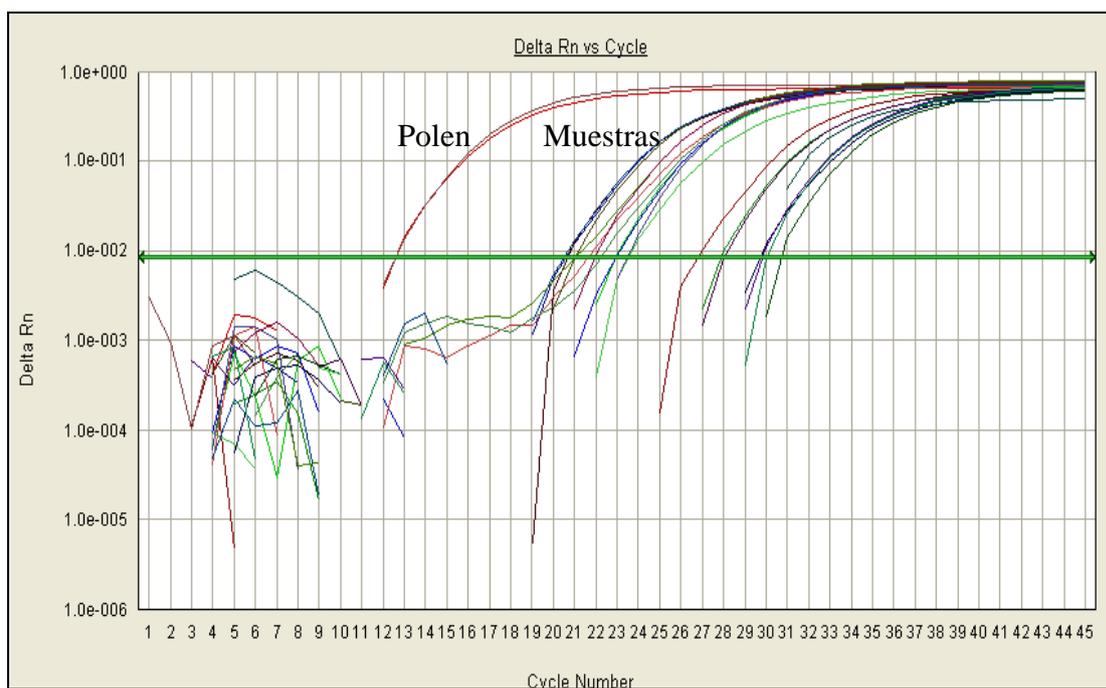


Figura 9. Amplificación de ADN de polen comercial y de ADN de diez de las muestras de miel, utilizando cebadores y sonda para gen universal de planta.

La variabilidad de valores de Ct entre muestras, a pesar de colocar la misma cantidad de ADN en cada pozo de reacción, se puede atribuir a que el ADN extraído de la miel contiene material genético proveniente de otros organismos como hongos, levaduras e incluso insectos que quedan aglomerados en el pellet que se concentra al inicio de la fase de extracción. Para confirmar esta posibilidad se realizó una prueba en donde se sometieron a PCR diferentes cantidades de ADN de una misma muestra miel (CMM-012) contra cebadores y sonda para amplificar el gen *act*. Con 200ng de ADN molde se obtuvo un Ct de 34.74 ± 1.17 , con 100ng se obtuvo un Ct de 36.04 ± 0.48 , con 50ng se obtuvo un Ct de 36.70 ± 0.47 y con 25ng se obtuvo un Ct de 37.72 ± 0.80 . Como se puede observar, la tendencia que sigue es la esperada, a mayor cantidad de ADN agregado, el Ct disminuye aproximadamente un ciclo (porque las diluciones fueron 1:2). Se descarta la posibilidad de presencia de inhibidores en la reacción, pues en caso de que existieran, a mayor dilución de ADN, menor sería la interacción de un inhibidor con la enzima y por tanto los valores de Ct se recorrerían a ciclos más tempranos.

En la figura 10 se muestra el gráfico de PCR obtenido para la muestra CMM 001, en el cual se observa amplificación para el gen *lec* lo cual indica que la muestra contiene polen

de soya; en la figura 11, para la misma muestra, se observa la amplificación a ciclos tardíos del promotor 35S revelando así presencia de algún evento transgénico pero a bajas concentraciones. La figura 12 confirma que el evento transgénico encontrado en esta muestra corresponde a soya Roundup Ready (*Mon 04032-6*).

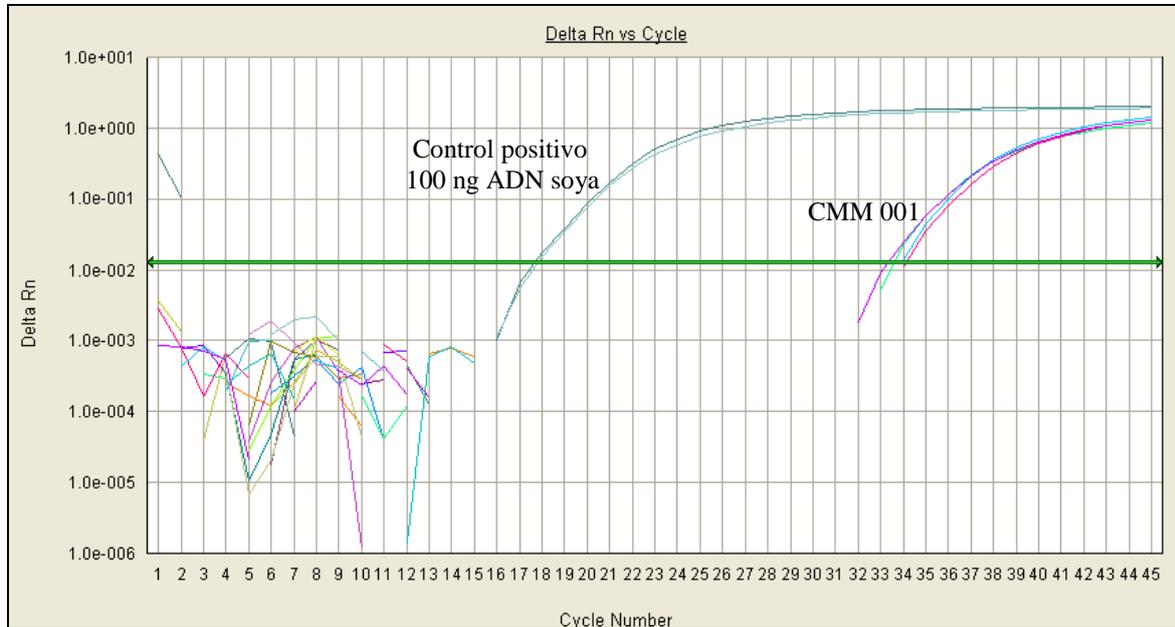


Figura 10. Amplificación de ADN de la muestra CMM-001 con cebadores específicos para el gen *lec*. (50 ng de ADN molde)

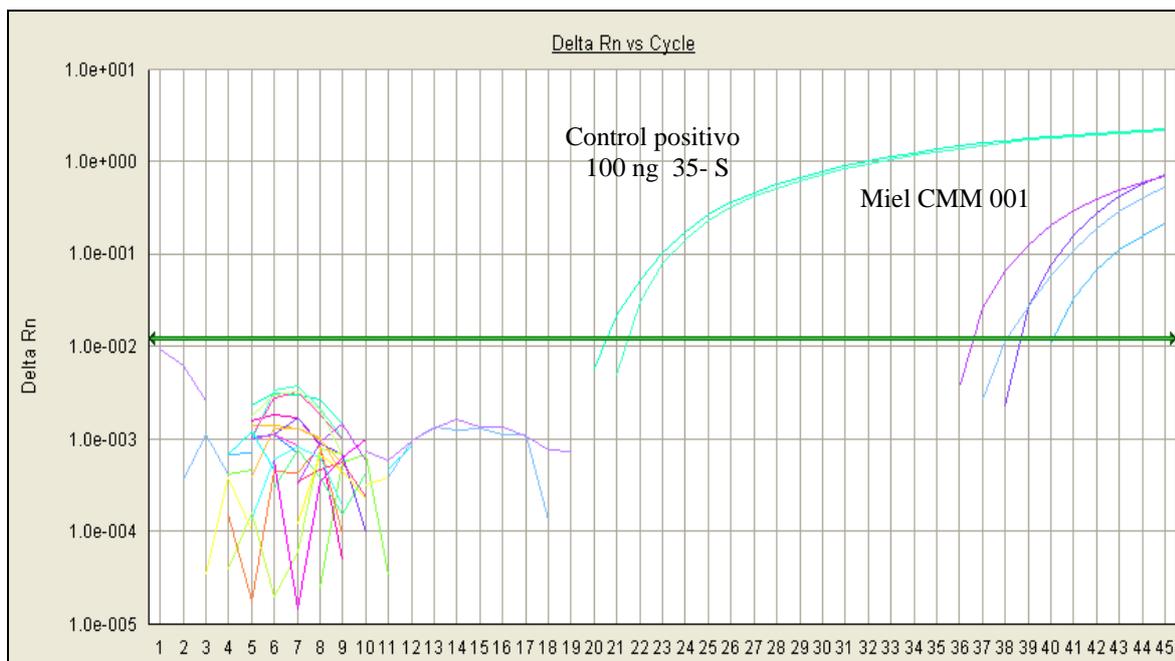


Figura 11. Amplificación de ADN de la muestra CMM-001 con cebadores específicos para el promotor 35S.

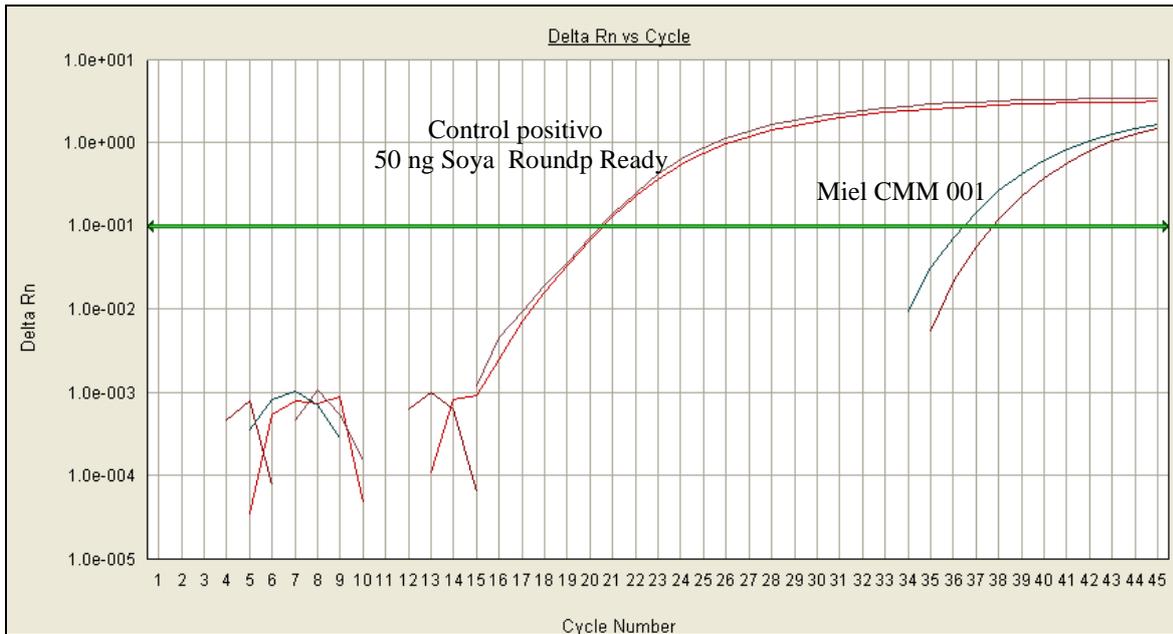


Figura 12. Amplificación de ADN de la muestra CMM-001 con cebadores específicos para el gen *Mon 04032-6*. (50 ng de ADN molde)

Las figuras 13, 14 y 15 son algunos ejemplos de las gráficas de qPCR obtenidas para las muestras en las que se detectó presencia de polen de maíz.

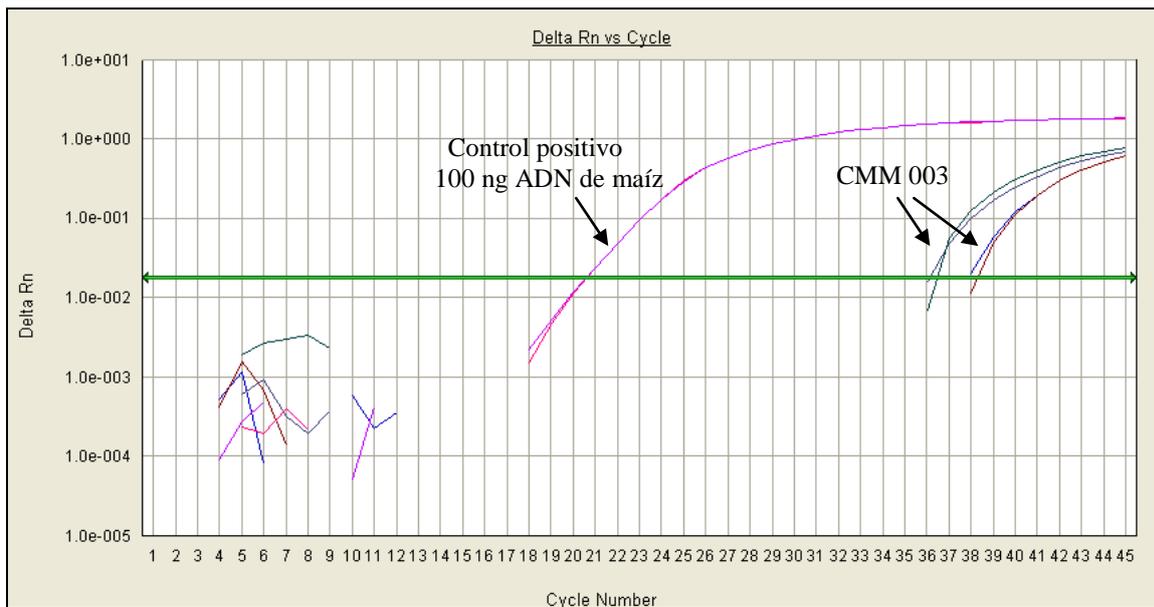


Figura 13. Amplificación de ADN de la muestra CMM-003 con cebadores específicos para el gen *hmg*. (100ng de ADN molde analizado)

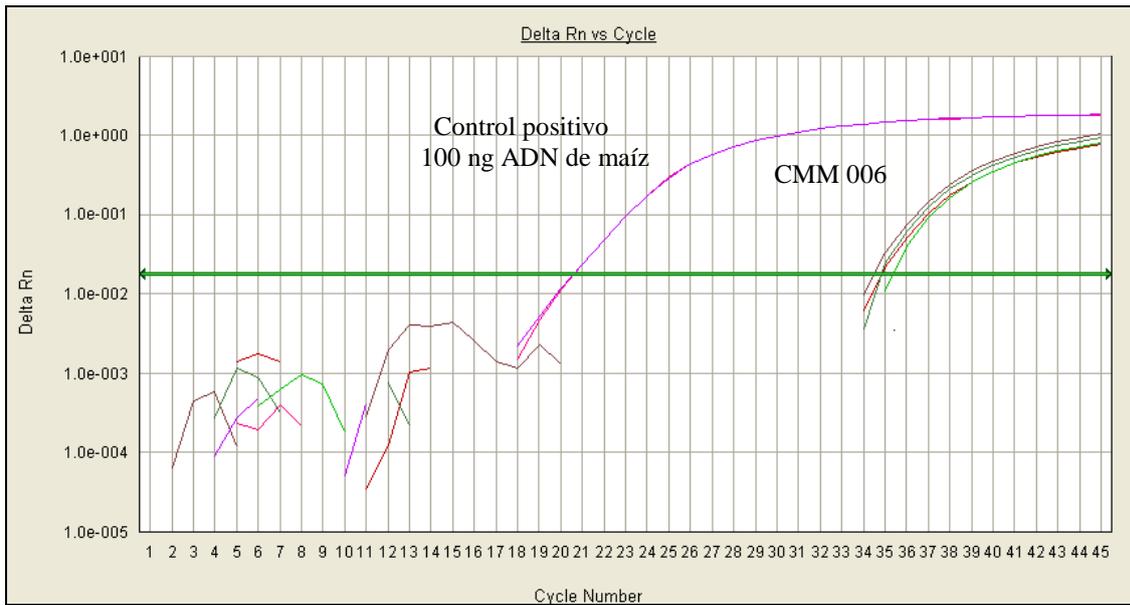


Figura 14. Amplificación de ADN de la muestra CMM-006 con cebadores específicos para el gen *hmg*. (100ng de ADN molde analizado).

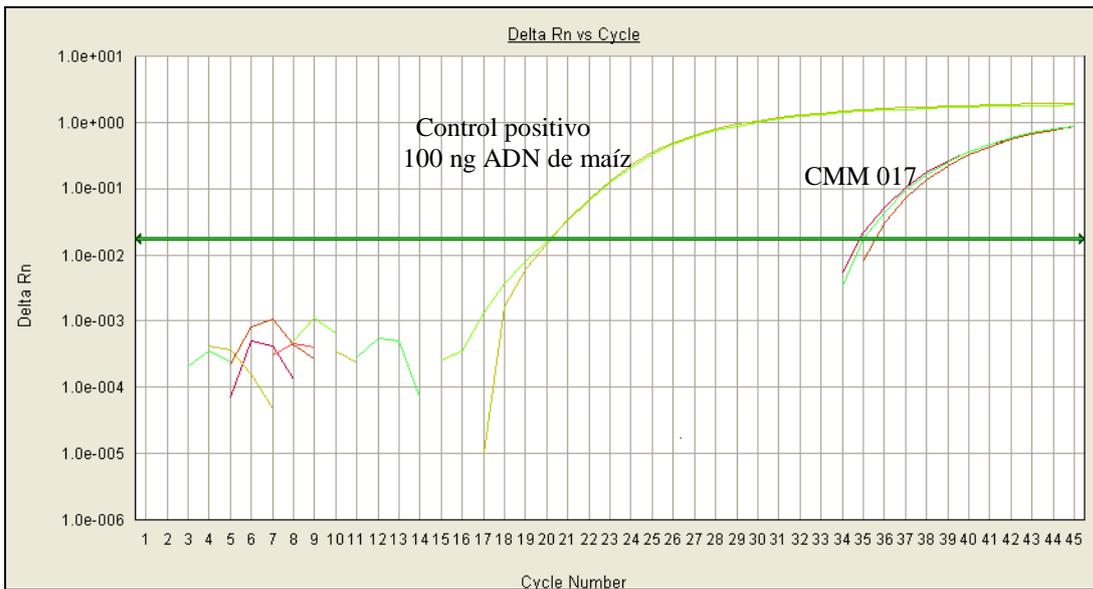


Figura 15. Amplificación de ADN de la muestra CMM-017 con cebadores específicos para el gen *hmg*. (100ng de ADN molde analizado).

Las figuras 16 y 17 muestran los gráficos obtenidos para la gran mayoría de las muestras en donde no fue detectada amplificación para el promotor 35S, considerándose así muestras negativas a OGMs.

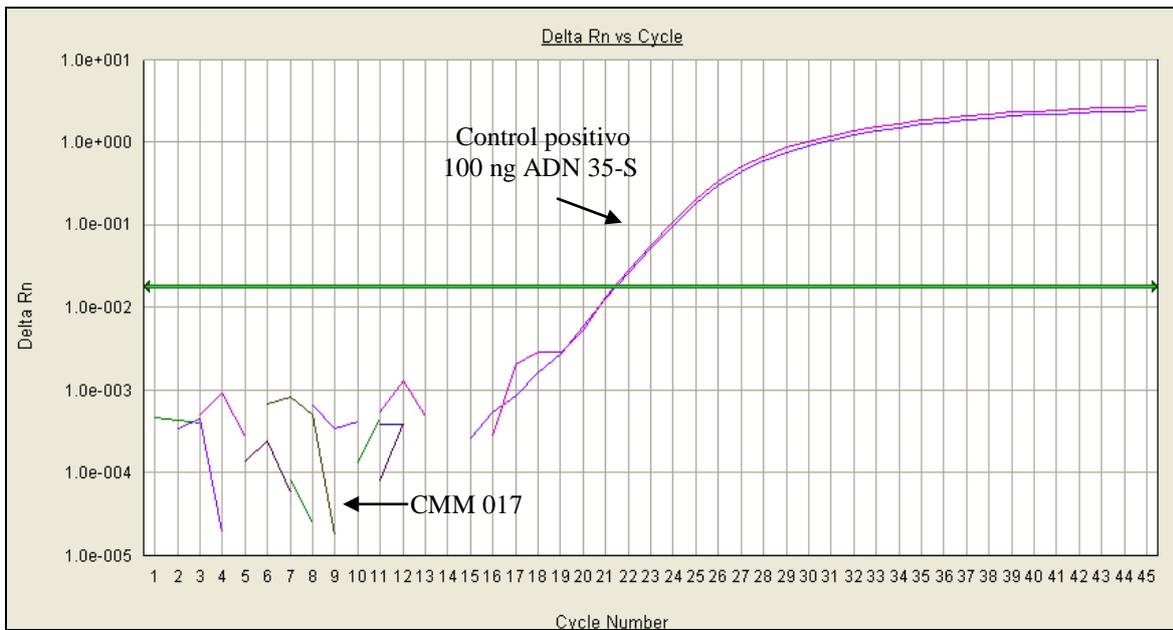


Figura 16. Amplificación de ADN de la muestra CMM-017 con cebadores específicos para el promotor 35S. (100ng de ADN molde analizado).

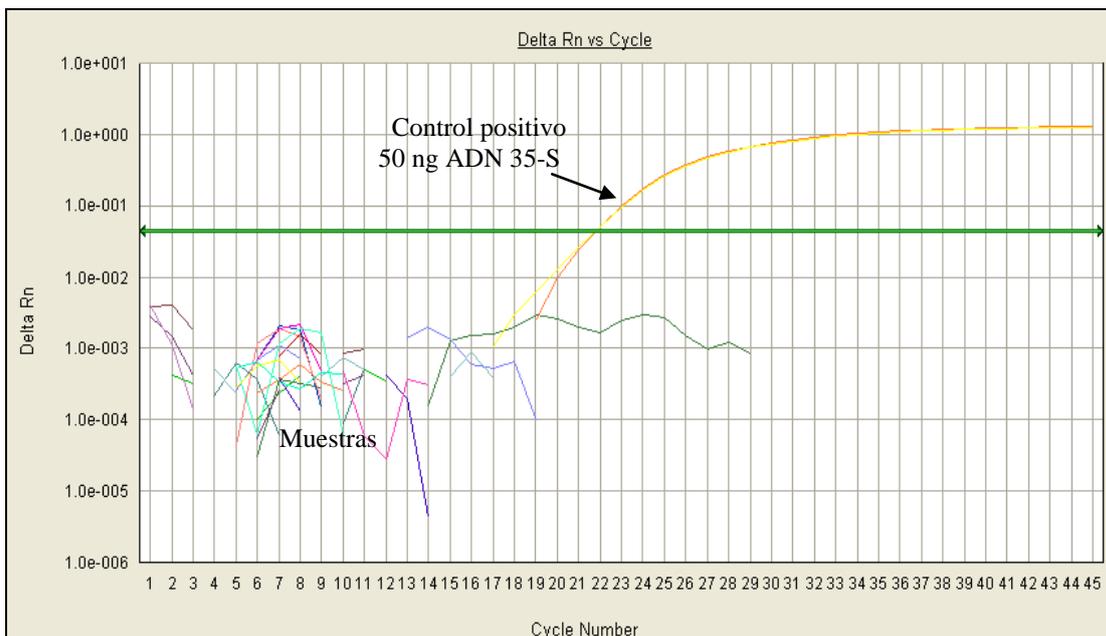


Figura 17. Amplificación de ADN de las muestras Mangle, Pino Encino, Cafetal y Selva Baja con cebadores específicos para el promotor 35S. (50ng de ADN molde).

La figura 18, muestra nula amplificación del gen terminador *t-nos* para algunas de las muestras de miel analizadas. De igual manera se confirman como muestras negativas a los OGMs que contuvieran dicho terminador en sus construcciones.

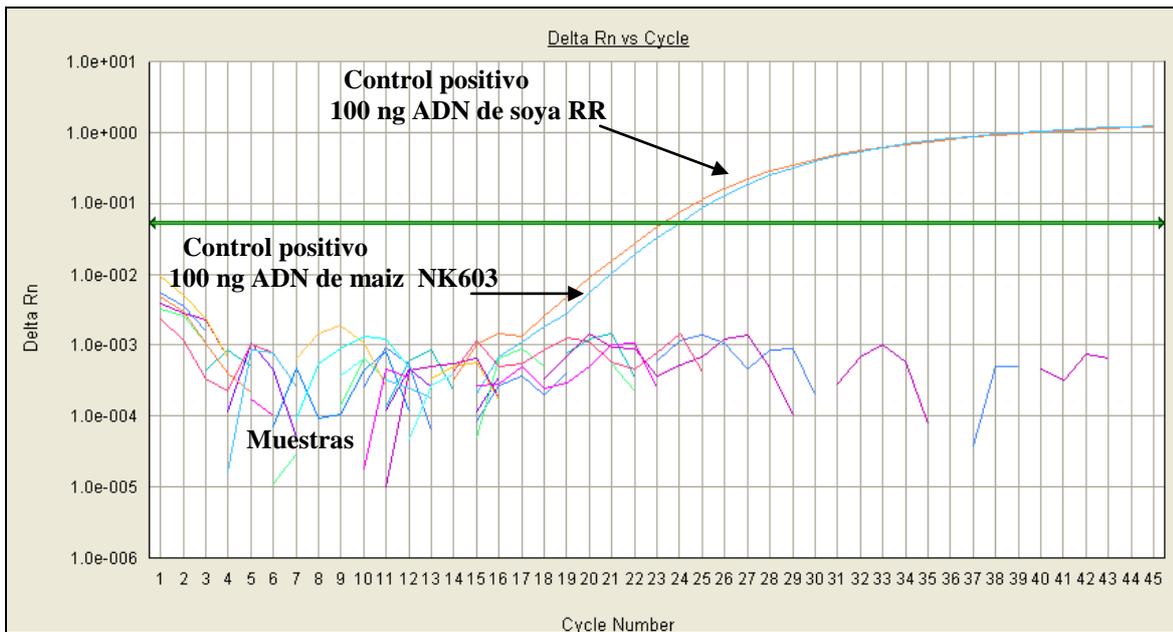


Figura 18. Amplificación de ADN de las muestras C019, CPHU-008, CPHU 001 y Pino Encino contra cebadores específicos para el terminador *t-nos*. (100 ng de ADN molde).

Se evaluó también una miel adquirida en un supermercado suizo, de procedencia americana (Norteamérica y Sudamérica), de acuerdo a lo señalado en la etiqueta. Dicha miel se sometió al mismo protocolo de análisis arrojando los resultados mostrados en la figura 19.

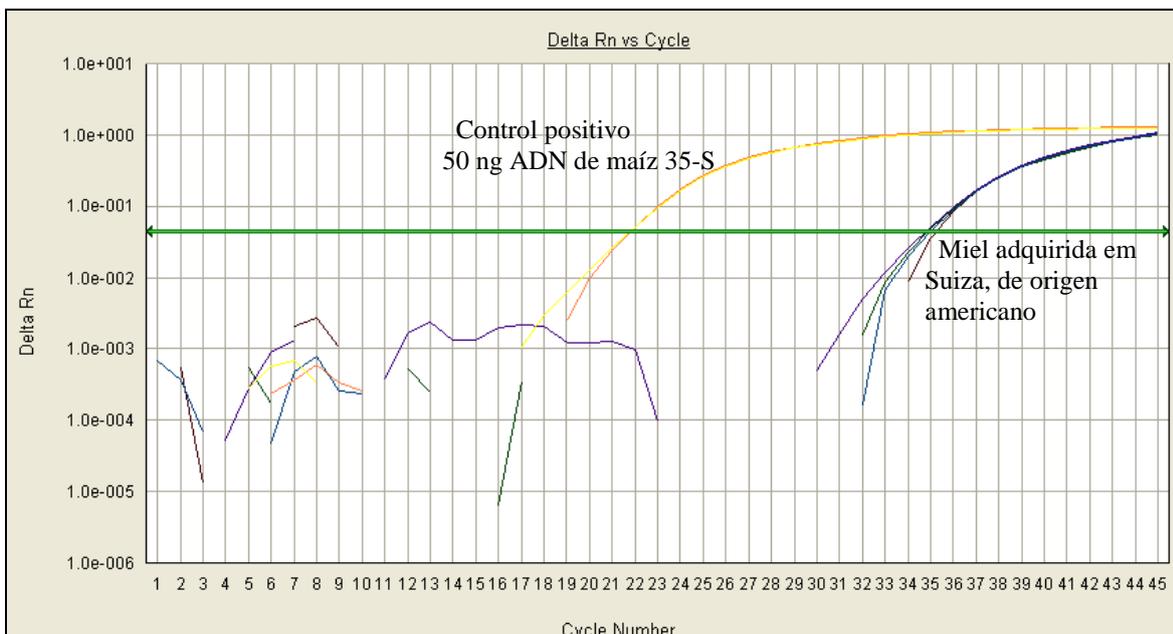


Figura 19. Amplificación de ADN de una muestra de miel adquirida en el mercado suizo con cebadores específicos para el gen 35-S. (50ng de ADN molde analizado).

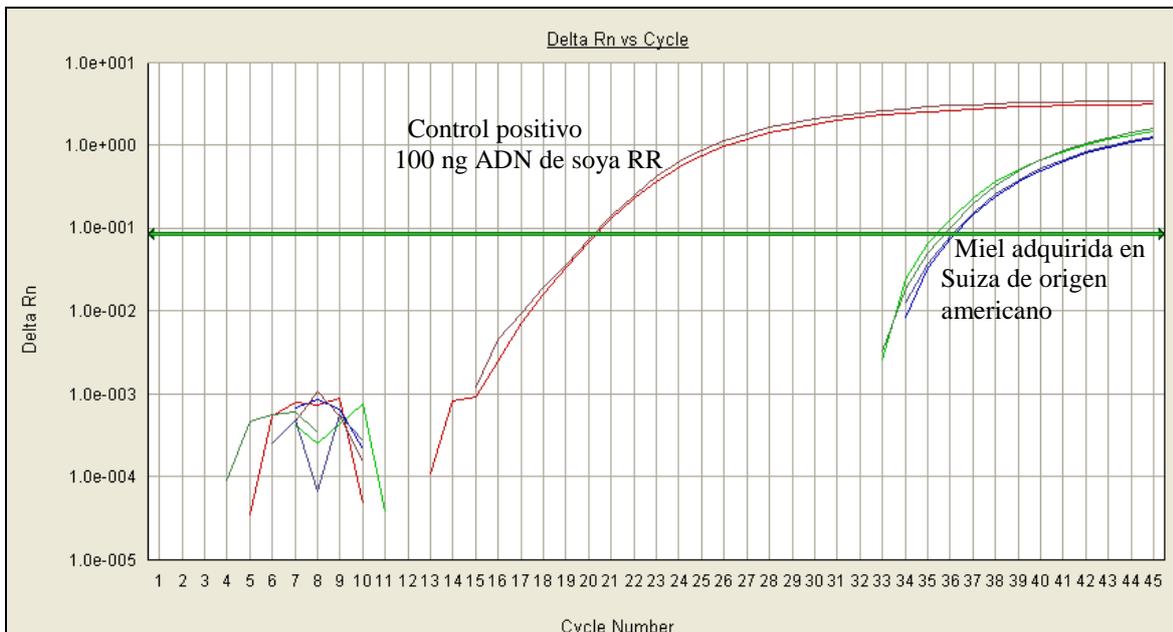


Figura 20. Amplificación de ADN de una muestra de miel adquirida en el mercado suizo con cebadores específicos para el gen *Mon 04032-6*. (100 ng de ADN molde analizado).

Como se puede apreciar en la figura 19, la muestra adquirida en Suiza presenta una señal de amplificación para el promotor 35S a un Ct de 34.93 ± 0.16 ; para la misma miel, se muestra amplificación para el evento *MON 04032-6* a un Ct de 35.75 ± 0.34 (Fig 20).

Al evaluar la miel comercial mexicana adquirida en el estado de Yucatán y se encontró libre de polen de maíz y soya y no registró amplificación con los cebadores del promotor 35S. (Fig. 21)

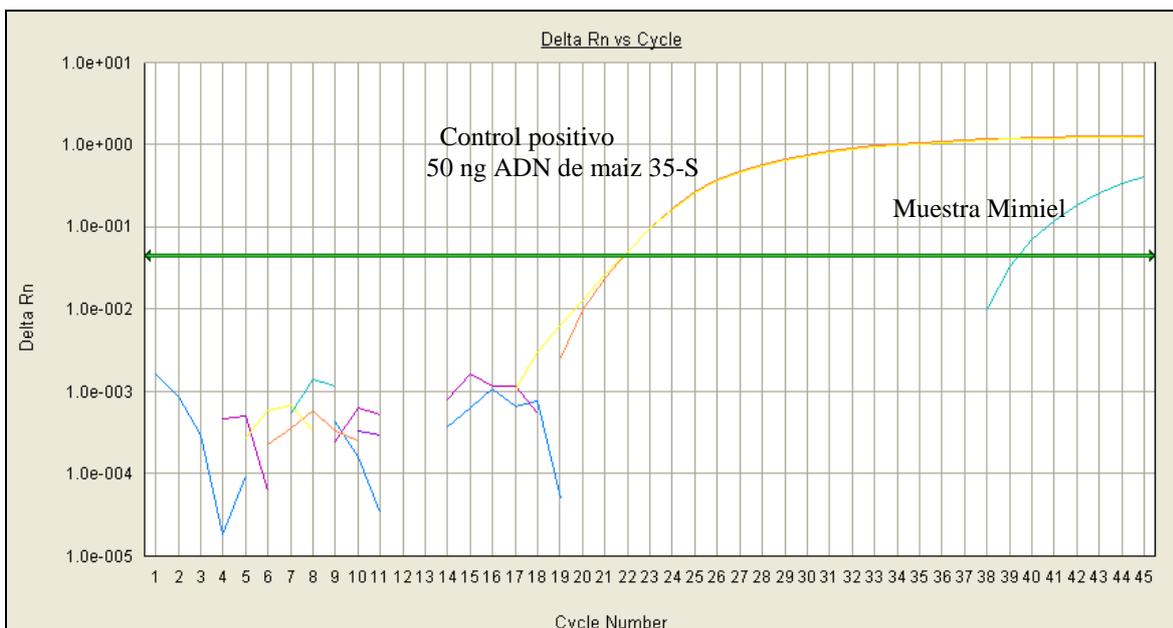


Figura 21. Amplificación de ADN de una muestra de miel adquirida en Yucatán con cebadores específicos para el promotor 35S. (50 ng de ADN molde analizado). Solo uno de los cuatro resultados posibles dio una amplificación tardía por lo cual se considera un resultado negativo.

Como último experimento se analizó una de las muestras de miel (CMM-014) adicionada con 50mg de polen comercial bajo dos premisas: por un lado, implementando los parámetros del protocolo alemán citados en el ANEXO 1 (disrupción utilizando vórtex y perlas de vidrio) y por otro lado, realizando la disrupción con el equipo Tissue Lyser junto con el buffer de lisis, que es el método propuesto en este trabajo. El objetivo fue observar posibles diferencias en la concentración y pureza del ADN extraído por los dos métodos, en una muestra a la que se le añadió polen en una cantidad claramente detectable. La tabla 13 muestra los resultados obtenidos de dicho experimento.

Tabla 13. Comparación de métodos de extracción de ADN para la muestra CMM-014 con 50mg de polen comercial.

Muestra Landhöning	Concentración (ng/μL)	Índice 260/280
Protocolo alemán (uso de vórtex y perlas de vidrio)	15.80 ± 0.41	2.02 ± 0.13
Protocolo con equipo disruptor (con buffer de lisis)	24.10 ± 0.54	1.88 ± 0.01

Como se observa, al realizar la extracción con el equipo disruptor y usando el buffer de lisis se obtiene una mayor concentración de ADN, con un índice 260/280 igualmente correcto. Al realizar una PCR con los extractos obtenidos y utilizando cebadores y sonda específicos para planta, se observa en la Figura 22 que en ambos casos se obtiene ADN con buena calidad de amplificación, pues los valores de Ct son muy similares. De nueva cuenta, el protocolo de extracción utilizado en este trabajo, con el equipo Tissue Lyser, arroja resultados confiables y permite discernir sin errores muestras positivas de muestras negativas, con la ventaja de obtenerse una mayor concentración de ADN de buena calidad amplificable.

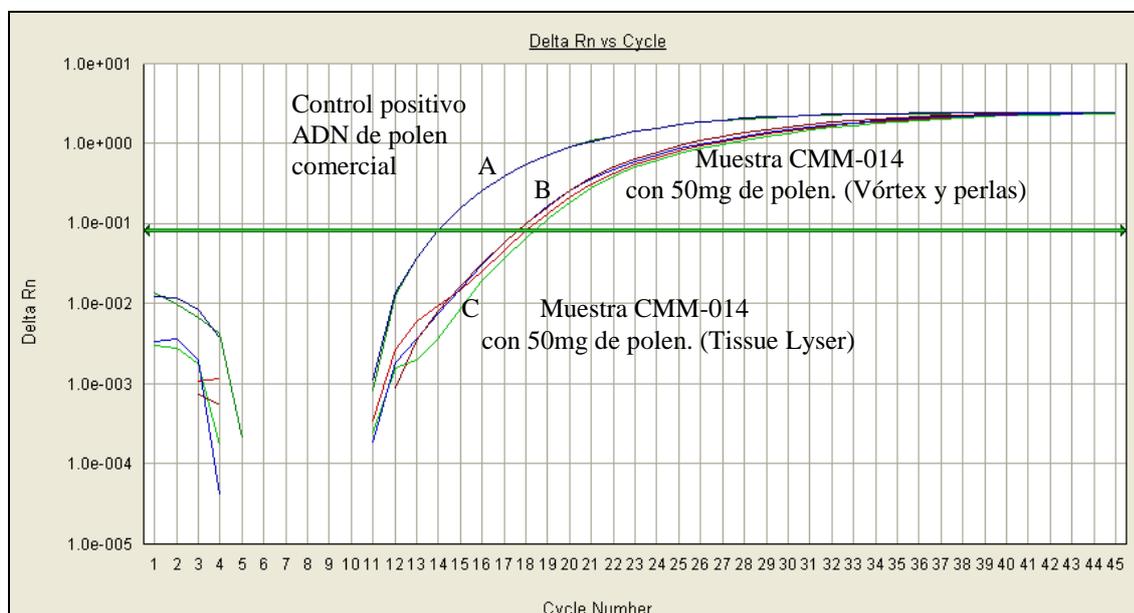


Figura 22. Amplificación de 100ng de ADN de la muestra CMM-014 con 50mg de polen comercial utilizando los cebadores y sonda universales de planta. A) Control positivo de polen comercial. B) ADN extraído por el protocolo alemán (vórtex y perlas de vidrio) [líneas verde y rojo] y C) ADN extraído por el disruptor Tissue Lyser y buffer de lisis [líneas azul y café].

CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo confiable de extracción, cuantificación y análisis de ADN extraído a partir del polen de muestras de miel; para ello, se utilizaron genes universales de planta como controles endógenos de reacción y transgenes específicos para identificación de material genéticamente modificado.

A través de qPCR se encontró que de las 58 muestras evaluadas, 13 de ellas contenían polen de maíz y 2, polen de soya.

De las muestras proporcionadas por la CONABIO, la única muestra con presencia de soya (CMM-001), también arrojó un resultado positivo para el evento transgénico Roundup Ready (Mon 04032-6) en ciclos tardíos (Ct de 37.7), lo cual indica una cantidad muy baja de ADN genéticamente modificado.

La muestra comercial adquirida en Yucatán resultó libre de ADN transgénico mientras que la muestra comercial adquirida en Suiza (de origen americano) dio resultado positivo para el evento transgénico Roundup Ready a un Ct de 35.75 y para promotor 35S a un Ct de 34.93 .

Los resultados obtenidos indican la presencia de polen genéticamente modificado en una de las 56 muestras evaluadas. De acuerdo con las normas para etiquetado de la Unión Europea, la tolerancia es cero, cuando se trata de eventos de transformación que no han sido autorizados (prohibidos) por la Unión Europea. Para decidir si una muestra resulta inaceptable, se requiere la identificación del evento de transformación y la verificación de que se encuentre entre los eventos prohibidos en ese bloque comercial. (http://www.organic-market.info/web/Know_How/Mexico/219/0/0/12207.html). De acuerdo con la legislación europea para productos orgánicos incluyendo miel, la presencia de OGMs está prohibida en la producción orgánica y los productos que contengan OGMs no podrán ser etiquetados como orgánicos, a menos que sus ingredientes (lo que incluye al polen de acuerdo con las nuevas normativas europeas) contengan OGMs que hayan entrado no intencionalmente al producto y que además se encuentren en cantidades menores al 0.9% (http://ec.europa.eu/agriculture/organic/eu-policy/legislation_en).

En este trabajo se evidencia que el polen presente en la única muestra positiva para OGM es de soya Roundup Ready que sí está permitida en la Unión Europea, y cuya presencia en porcentajes <0.9%, por lo que no debería ser razón para el rechazo de las mieles en el mercado orgánico ya que se puede alegar que la presencia de ese polen es no intencional, además de que se encuentra, por los resultados preliminares obtenidos en este trabajo, en concentraciones mucho menores al 0.9% .

Debido a que se ha detectado en doce muestras la presencia de polen de maíz, y ante los nuevos permisos para la liberación de maíz GM en México, o su eventual siembra no intencional o ilegal, dicha presencia sería una barrera todavía más grave para la exportación: puesto que en la Unión Europea hay muy pocos eventos de transformación de maíz autorizados, habría una enorme posibilidad de rechazos bien fundamentados para las mieles mexicanas orgánicas aun cuando el polen estuviera en bajas concentraciones puesto que la tolerancia para eventos de transformación no autorizados es de cero. Por lo anterior será interesante seguir monitoreando las eventuales liberaciones de maíz GM y la identidad del polen GM encontrado en su caso. Se sugiere que en la segunda fase de este

estudio, se realice el monitoreo de las mieles a través del tiempo, para conocer la evolución de la presencia de polen GM en las mieles mexicanas, tanto de soya, como de maíz.

REFERENCIAS

CIBIOGEM, 2013.

http://www.cibiogem.gob.mx/OGMs/Paginas/Solicitudes_Reg_OGMs05.html

CONABIO, 2012. Mapa de mieles peninsulares y diversidad.

http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/mieles/mieles_peninsulares.html

http://www.organic-market.info/web/Know_How/Mexico/219/0/0/12207.html

Fecha del último acceso a la página: 10 de septiembre, 2013.

http://ec.europa.eu/agriculture/organic/eu-policy/legislation_en

Fecha del último acceso a la página: 10 de septiembre, 2013.

Intertek Food Service GmbH, 2012. Annual Report 2012 Honey Analysis. Bremen. Germany p. 58

JRC²⁰⁰⁷. Manual de Prácticas para identificación de organismos genéticamente modificados en alimentos. JRC. Session 7. 2007.

JRC^{2010a}. Qualitative PCR method for detection of Cauliflower Mosaic Virus 35-S promoter. JRC Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed. 2010. pp 173

JRC^{2010b} Quantitative PCR method for detection of soybean event DP-305423-1. JRC Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed. 2010. pp 89.

JRC^{2010c} Qualitative duplex PCR method for detection of Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter and Nopaline synthase terminator (partim CaMPV P-35S). JRC, Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed. 2010. pp 179.

JRC^{2010d} Quantitative PCR method for detection of soybean event GTS 40-3-2. JRC, Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed. 2010. pp 97.

JRC^{2010e} Quantitative PCR method for detection of maize event DAS-59122-7. JRC, Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed. 2010. pp 33.

RAEZKE, Kurt-Peter. Intertek Director Testing & Analytics. Food & Agri Services. Pyrrolizidine Alkaloids and Genetically Modified Organism in Honey Allocation, European Legislation and Regulation. Presentado en: 2o World Conference on Organic Beekeeping. Kurt-Peter Raezke San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, Mexico – March 19-25, 2012. www.intertek.com

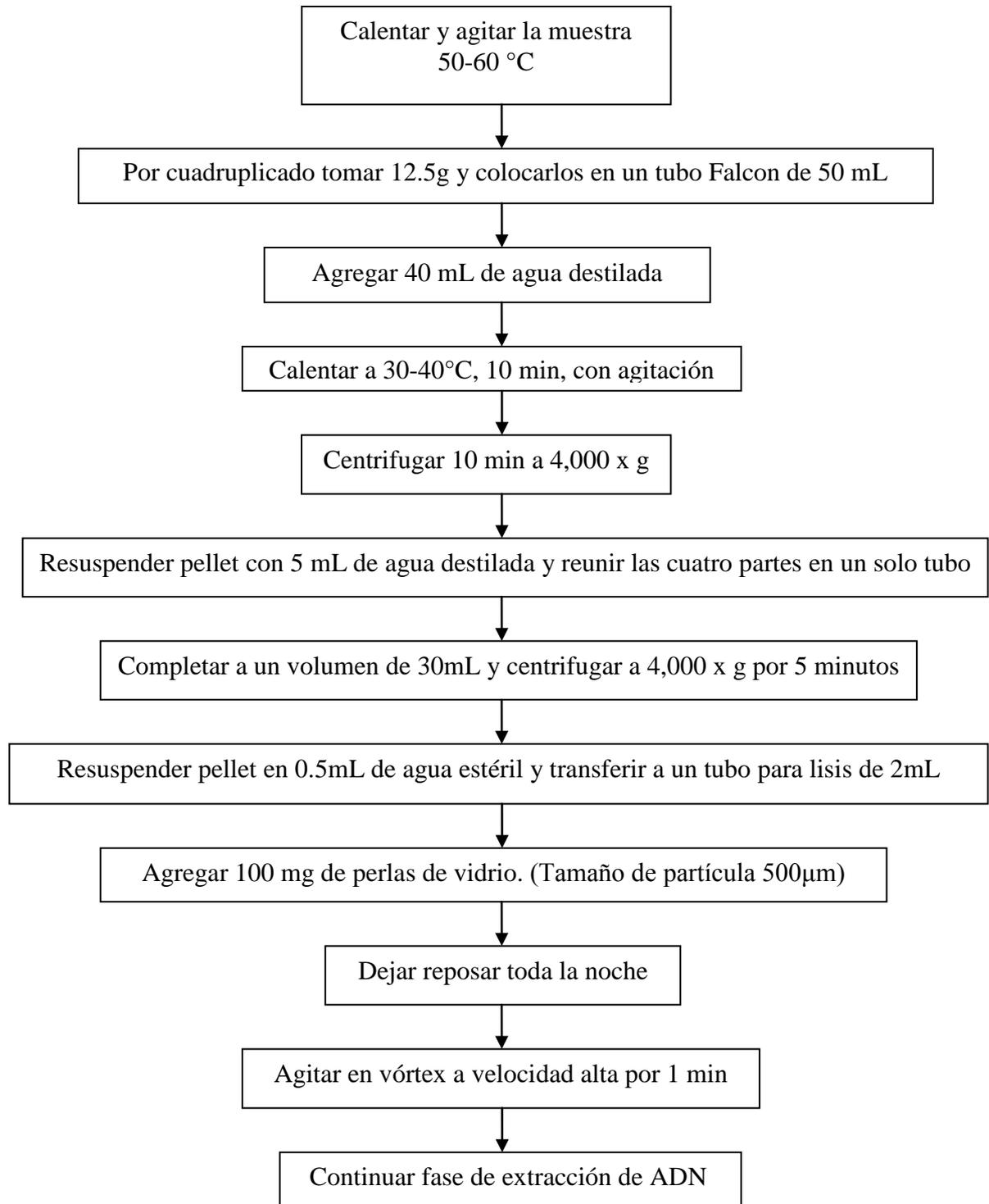
Operating Instructions Tissue Lysser II. Qiagen. Diciembre 2007.

Vides, B. E. y Vandame, R. Pecoreo de abejas *Apis mellifera* en flores de soya *Glycine max*. Reporte Técnico. El Colegio de la Frontera Sur. Departamento de Agricultura, Sociedad y Ambiente. Diciembre de 2012.

WAIBLINGER, Hans-Ulrich; Ohmenshaeuser, Marc. Et al. *In-house and Interlaboratory validation of a method for the extraction of DNA from pollen in honey*. Journal of Consumer Protection and Food Safety. Germany. May, 2012.

Anexos

ANEXO 1. Guía de muestreo y análisis para la detección de polen en plantas modificadas genéticamente en miel. Oficina Federal de protección al consumidor y de seguridad alimentaria alemana. (Protocolo Alemán)



ANEXO 2. Protocolo utilizado en este trabajo para la separación de polen en miel.

