

ASSESSMENT OF DNA EXTRACTION METHODS FROM VARIOUS MAIZE (*Zea mays* L.) TISSUES FOR ENVIRONMENTAL GMO MONITORING IN MEXICO. PART I: DETECTION BY END-POINT PCR

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE VARIOS TEJIDOS DE MAÍZ (*Zea mays* L.) PARA EL MONITOREO AMBIENTAL DE OGM EN MÉXICO. PARTE I: DETECCIÓN POR PCR PUNTO FINAL

Andrea SanJuan-Badillo¹, Amanda Galvez², Javier Plasencia¹, Maricarmen Quirasco^{2*}

¹Department of Biochemistry. Faculty of Chemistry. National Autonomous University of Mexico. 04510. Mexico City, Mexico. ²Department of Food and Biotechnology. Faculty of Chemistry. National Autonomous University of Mexico. 04510. Mexico City, Mexico. (quirabma@unam.mx)

ABSTRACT

In Mexico, regulations for growing genetically modified (GM) maize (*Zea mays* L.) plants have been enforced in order to prevent gene flow to native landraces and wild relatives. Field surveys are necessary and Mexican government agencies have the mandate to perform them. Because of their specificity, PCR-based methods are suitable for field monitoring of GM organisms but it is necessary to assess their performance, since they are greatly influenced by the DNA preparation quality inherent to the extraction method. In this study, genomic DNA was extracted from various maize tissues (*e.g.* pollen, leaves, spikelets and grains) using five different commercial purification protocols. DNA quality was analyzed spectrophotometrically, by gel electrophoresis, and as a substrate for end-point PCR. Results showed that highly amplifiable DNA, rather than high extraction yields, is needed for a consistent analysis. Criteria to evaluate DNA purity, such as absorbance, do not necessarily reflect an adequate amplification capability, resulting in a non-reliable GM organism detection. In conclusion, silica DNA-binding membranes yielded the most suitable DNA preparations for end-point PCR analyses of different GM maize tissues.

Key words: PCR inhibition, GM maize, variability of DNA yield, DNA quantification, GMO detection.

INTRODUCTION

Mexico is the center of origin and diversification of maize (*Zea mays* L.), as evidenced by a wide diversity of open-

RESUMEN

En México se han implementado reglamentaciones para el cultivo de plantas de maíz (*Zea mays* L.) genéticamente modificadas (GM) con el fin de evitar el flujo de genes a razas nativas y especies silvestres. Los estudios de campo son necesarios y las agencias del gobierno mexicano tienen el mandato para realizarlos. Debido a su especificidad, los métodos basados en la PCR son adecuados para la vigilancia en campo de organismos GM, pero es necesario evaluar su desempeño, ya que están muy influenciados por la calidad de la preparación de ADN inherente al método de extracción. En este estudio se usaron cinco protocolos comerciales diferentes para extraer y purificar ADN genómico de varios tejidos de maíz (por ejemplo, polen, hojas, espiguillas y granos). La calidad del ADN se analizó por espectrofotometría, por electroforesis en gel, y como un sustrato para PCR punto final. Los resultados mostraron que se necesita ADN altamente amplificable, en lugar de altos rendimientos de extracción, para un análisis consistente. Los criterios para evaluar la pureza del ADN, como la absorbancia, no necesariamente reflejan una capacidad de amplificación adecuada, lo que resulta en una detección no fiable de un organismo GM. En conclusión, las membranas de sílica de unión de ADN dieron las preparaciones de ADN más adecuadas para los análisis de PCR punto final de diferentes tejidos de maíz GM.

Palabras clave: Inhibición de PCR, maíz GM, variabilidad de rendimiento de ADN, cuantificación de ADN, detección de OGM.

INTRODUCCIÓN

México es el centro de origen y diversificación del maíz (*Zea mays* L.) y la evidencia es una amplia diversidad de variedades

*Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: January, 2013. Approved: November, 2013.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 48: 17-33. 2014.

pollinated landraces and the presence of maize wild relatives (CONABIO, 2009), but Mexico imports annually 8×10^6 t of yellow maize from the USA (SIAP, 2011) for food, feed and processing. Transgenic maize hybrids with different agronomic properties, biotechnologically developed, occupy about 85 % of the 32×10^6 ha of maize grown in the USA (GMO Compass, 2010; USDA, 2012). Maize imported from that country is not identified or labeled as genetically modified (GM), and escapes and misuse of this grain is an environmental risk, though there are some controversial evidences of transgene introgression from GMO events to native maize (Ortiz-García *et al.*, 2005; Piñeyro-Nelson *et al.*, 2009). Transgenic maize is grown under strict regulations implemented by the Mexican government, only for experimental and pilot field trials in order to prevent gene flow from biotech hybrids to open-pollinated landraces (CIBIOGEM, 2012a).

In order to pursue this issue, government agencies must perform constant monitoring with verified molecular analytical methods, mainly based on PCR, to trace these events in the field; such activities are implemented by the Mexican Interministerial Commission on Genetically Modified Organisms (CIBIOGEM, 2012b), in accordance to regulations in Mexico (Ley de Bioseguridad de organismos genéticamente modificados, 2005; Reglamento de la Ley de Bioseguridad de organismos genéticamente modificados, 2009; CIBIOGEM, 2012b). Sampling in the field requires analyzing different tissues for environmental risk assessments: fresh leaves, dry leaves, pollen, seeds, stalks and grains. Adequate sampling protocols must be developed in conjunction with appropriate and validated methods of extraction, amplification and detection of the possible exogenous GM sequences. The availability of validated methods, certified reference materials, as well as all reagents and extraction kits is crucial for implementing suitable routine methodologies. The objective of this study was to test various protocols for DNA extraction from different maize tissues and to assess yield and quality for further qualitative PCR analyses, in order to provide rational recommendations to government agencies' laboratories to implement the appropriate molecular techniques for field sample processing and analysis.

locales de polinización abierta y la presencia de parientes silvestres de maíz (CONABIO, 2009), pero México importa anualmente 8×10^6 t de maíz amarillo de los EE.UU. (SIAP, 2011) para alimentación, forraje y procesamiento. Híbridos de maíz transgénicos con diferentes propiedades agronómicas, desarrollados biotecnológicamente, ocupan cerca de 85 % de las 32×10^6 ha de maíz cultivado en los EE.UU. (GMO Compass 2010; USDA, 2012). El maíz importado de ese país no está identificado ni etiquetado como modificado genéticamente (GM). Aunque hay algunas evidencias controvertidas de introgresión de transgenes de eventos de OGM al maíz nativo, los escapes y el uso incorrecto de este grano representan un riesgo ambiental (Ortiz-García *et al.*, 2005; Piñeyro-Nelson *et al.*, 2009). El maíz transgénico se cultiva bajo estrictas regulaciones implementadas por el gobierno mexicano, sólo para pruebas piloto y experimentales de campo con el fin de evitar el flujo de genes de los híbridos transgénicos a variedades locales de polinización abierta (CIBIOGEM, 2012a).

Para abordar esta cuestión, los organismos gubernamentales deben realizar un monitoreo constante con métodos analíticos moleculares verificados, basados principalmente en PCR, para rastrear estos eventos en el campo; estas actividades son implementadas por la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM, 2012b), de acuerdo a las regulaciones en México (Ley de Bioseguridad de organismos genéticamente modificados, 2005; Reglamento de la Ley de Bioseguridad de organismos genéticamente modificados, 2009; CIBIOGEM, 2012b). El muestreo en el campo requiere analizar diferentes tejidos para evaluar riesgo ambiental: hojas verdes, hojas secas, polen, semillas, tallos y granos. Así, se debe desarrollar protocolos de muestreo adecuados en conjunto con métodos apropiados y validados de extracción, amplificación y detección de las posibles secuencias GM exógenas. La disponibilidad de métodos validados, materiales de referencia certificados, así como de todos los reactivos y kits de extracción es crucial para implementar metodologías adecuadas de rutina. El objetivo de este estudio fue probar varios protocolos para la extracción de ADN de diferentes tejidos de maíz y para evaluar el rendimiento y calidad para su análisis posterior por PCR cualitativa, con el fin de formular recomendaciones racionales a los

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Seeds from an open-pollinated white maize landrace were obtained from a local grower in Chalco, Mexico (August 2005). Embryos were excised manually from grains. Seedlings (two-week old) were grown from seeds in a greenhouse at the Faculty of Chemistry, UNAM to collect leaf tissue. Adult plants were grown for 10 to 12 weeks to collect leaf samples and spikelets. Leaf samples from seedlings and adult plants were dried in an incubator at 37 °C. Tassels were collected from a commercial maize field in Los Reyes, Estado de Mexico (October 2005), as well as dehiscent pollen. GM reference material and certified maize grains from three commercial events were provided by Genetic ID NA, Inc. (Fairfield, IA, USA). Grains from the MON810, Bt11 and NK603 GM hybrid varieties were ground separately in a high-speed blender to obtain a particle size <1 mm, before analysis. Seeds from the GM hybrids germinated under controlled conditions and leaves from two-week seedlings and mature plants were collected.

Genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted from different tissues and samples using five commercial methods available in Mexico: 1) Fast DNA[®] kit (Qbiogene. Carlsbad, CA, USA); 2) DNeasy plant kit (Qiagen, Inc. Germantown, MD, USA); 3) DNAzol[®] reagent (Invitrogen Co. Carlsbad, CA, USA); 4) Easy-DNA[™] (Invitrogen, *ibid*); and 5) Fast DNA extraction kit (Genetic ID NA, Inc. Fairfield, IA, USA). Manufacturer instructions were followed, and they are described briefly. Method 1): 200 mg grounded tissue sample was mixed with CLS-VF and PPS solutions; it was incubated on ice and then shaken in the FastPrep FP120 homogenizer (30 s). After centrifugation (14 000 x g), a 600- μ L aliquot was mixed with 600 μ L of the binding matrix. The mixture was incubated 5 min at room temperature, centrifuged at 14 000 x g, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in SEWS-M solution for washing. After centrifugation, the supernatant was discarded and the DNA was dissolved in DES solution. Method 2): a 100 mg tissue sample was frozen with liquid nitrogen and ground in a mortar. The ground tissue was transferred to a clean tube and AP1 buffer and RNase A were added, followed by 10-min incubation at 65 °C. AP2 buffer was added and the mixture was incubated for 5 min on ice and then passed through a Mini Spin QI column by centrifugation. The filtrate was mixed with AP3/E buffer and the mixture was passed through a DNeasy mini spin column,

laboratorios de organismos gubernamentales para implementar las técnicas moleculares apropiadas para el procesamiento y análisis de la muestra de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Semillas de una variedad local de maíz blanco de polinización abierta se obtuvieron de un productor de Chalco, México (agosto 2005). Los embriones fueron separados manualmente de los granos. Las plántulas (dos semanas de edad) fueron cultivadas de semillas en un invernadero de la Facultad de Química de la UNAM para recolectar tejido de hoja. Las plantas adultas se cultivaron 10 a 12 semanas para recolectar muestras de hojas y espiguillas. Las muestras de hojas de plántulas y plantas adultas se secaron en una incubadora a 37 °C. Las inflorescencias se recolectaron en un campo de maíz comercial en Los Reyes, Estado de México (octubre de 2005), así como el polen dehiscente. El material GM de referencia y granos de maíz certificados de tres eventos comerciales fueron proporcionados por Genetic ID NA, Inc. (Fairfield, IA, USA). Los granos de las variedades híbridas GM MON810, Bt11 y NK603 se molieron por separado en una licuadora de alta velocidad para obtener un tamaño de partícula <1 mm, previo al análisis. Las semillas de los híbridos GM germinaron en condiciones controladas y se recolectaron hojas de plántulas de dos semanas de edad y de plantas maduras.

Extracción de ADN genómico

El ADN genómico se extrajo de diferentes tejidos y muestras usando cinco métodos comerciales disponibles en México: 1) Kit Fast DNA[®] (Qbiogene. Carlsbad, CA, USA.); 2) Kit DNeasy para planta (Qiagen, Inc. Germantown, MD, USA.); 3) Reactivo DNAzol[®] (Invitrogen Co. Carlsbad, CA, USA.); 4) Easy-DNA[™] (Invitrogen, *ibid*); y 5) kit de extracción Fast DNA (Genetic ID NA, Inc. Fairfield, IA, USA.). Se siguieron las instrucciones del fabricante y se describen brevemente. Método 1): se mezcló una muestra de tejido molido de 200 mg con soluciones de CLS-VF y PPS; se incubó en hielo y después se agitó en el homogeneizador FastPrep FP120 (30 s). Después de centrifugar (14 000 x g), una alícuota de 600 μ L se mezcló con 600 μ L de la matriz de unión. La mezcla se incubó 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 14 000 x g, el sobrenadante se desechó y el sedimento se suspendió de nuevo en la solución SEWS-M para el lavado. Después de la centrifugación, el sobrenadante se desechó y el ADN fue disuelto en solución DES. Método 2): una muestra de tejido de 100 mg se congeló con

the column was washed twice with AW buffer and finally the DNA was eluted with AE buffer. Method 3): a 50 mg tissue sample was frozen with liquid nitrogen and ground in an Eppendorf tube with a glass pestle. DNAzol was added to the tube and mixed gently, the tube was centrifuged at high speed and the supernatant was mixed with isopropanol (-20°C). The tube was incubated 3 min at room temperature and then centrifuged 10 min at $14\,000 \times g$. The pellet was washed with 70 % ethanol, dissolved in 10 mM NaOH and neutralized with 1M Tris, pH 8.0. Method 4): a 50 mg tissue sample was frozen with liquid nitrogen and ground. Solution A was added and the mixture was vortexed, it was incubated 10 min at 65°C and solution B was added and vortexed again. Chloroform was added to the mixture and then centrifuged to separate phases, the upper phase was mixed with absolute ethanol (-20°C) and incubated on ice 30 min. After centrifugation, genomic DNA was washed with 80 % ethanol, dissolved in TE buffer and treated with RNase A. Method 5): a 1 g sample was mixed with Fast-Lyse buffer, Proteinase K and RNase A, and incubated 30 min at 37°C . Chloroform was added, the mixture was vortexed and then centrifuged 15 min. A 0.9 mL aliquot of the upper phase was taken and mixed with 0.9 mL of Fast-Bind solution. The mixture was centrifuged and the supernatant was passed through a silica membrane DNA binding column, which was washed with Fast-Bind solution and later with 75 % ethanol. Excess of ethanol was eliminated by centrifugation and DNA was eluted with TE buffer.

Genomic DNA was extracted from pollen by grinding it with liquid nitrogen and then following the described protocol for each method. These DNA extraction methods are suitable for isolation of genomic DNA from plants and represent distinct purification approaches. Method 1) is based on lysis by shearing in a chaotropic buffer and isolation of DNA by binding to a silica matrix and washed. In methods 2) and 5), the tissue is chemically lysed, DNA is bound selectively onto a silica-based membrane and several washings are performed before DNA elution. In method 3), a guanidine-detergent lysing solution is used and DNA is precipitated with isopropanol. In method 4), the tissues are incubated in a solution that contains lytic enzymes, followed by a chloroform cleanup and DNA precipitation with ethanol.

Spectrophotometric and electrophoretic analyses of genomic DNA

A UV scan from 200 to 380 nm was performed for all DNA extractions (Shimadzu UV160U UV/visible spectrophotometer). Genomic DNA concentration was estimated considering that a value of A_{260} of 1.00 corresponds to $50\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$ of double-stranded DNA (Sambrook and Russell, 2001). The absorbance at 320 nm was considered for background estimation. DNA yield

nitrógeno líquido y se molió en un mortero. El tejido triturado se transfirió a un tubo limpio y se añadió el amortiguador AP1 y la RNasa A, seguido por 10 min de incubación a 65°C . Se añadió el buffer AP2 y la mezcla se incubó 5 min en hielo y se pasó a través de una columna Mini Spin QI por centrifugación. El filtrado se mezcló con amortiguador de AP3/E y la mezcla pasó a través de una columna DNeasy mini spin, la columna se lavó dos veces con amortiguador AW y, finalmente, el ADN se extrajo con el amortiguador AE. Método 3): una muestra de tejido de 50 mg se congeló con nitrógeno líquido y se molió en un tubo Eppendorf con un pistilo de vidrio. DNAzol se añadió al tubo y se mezcló suavemente, el tubo se centrifugó a alta velocidad y el sobrenadante se mezcló con isopropanol (-20°C). El tubo se incubó 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó 10 min a $14\,000 \times g$. El sedimento se lavó con etanol al 70 %, se disolvió en NaOH 10 mM y se neutralizó con Tris 1M, pH 8.0. Método 4): una muestra de tejido de 50 mg se congeló con nitrógeno líquido y se molió. Se añadió la solución A y la mezcla se agitó muy bien con el vórtex, se incubó 10 min a 65°C , se añadió la solución B y se agitó de nuevo con el vórtex. Se añadió cloroformo a la mezcla y luego se centrifugó para separar las fases, la fase superior se mezcló con etanol absoluto (-20°C) y se incubó en hielo 30 min. Después de la centrifugación, el ADN genómico se lavó con etanol al 80 %, se disolvió en el amortiguador TE y se trató con RNasa A. Método 5): una muestra de 1 g se mezcló con el amortiguador Fast-Lyse, Proteinasa K y RNasa A, y se incubó 30 min a 37°C . Se agregó cloroformo, la mezcla se agitó con el vórtex y se centrifugó 15 min. Se tomó una alícuota de 0.9 mL de la fase superior y se mezcló con 0.9 mL de solución Fast-Bind. La mezcla se centrifugó y el sobrenadante pasó a través de una columna de unión de ADN de membrana de sílica, que se lavó con solución Fast-Bind y después con etanol al 75 %. El exceso de etanol se eliminó por centrifugación y el ADN fue eluido con el amortiguador TE.

El ADN genómico se extrajo de polen moliéndolo con nitrógeno líquido y se siguió el protocolo descrito para cada método. Estos métodos de extracción de ADN son adecuados para el aislamiento de ADN genómico de plantas y representan distintos enfoques de purificación. El método 1) se basa en la lisis por ruptura mecánica en un amortiguador caotrópico y después aislamiento de ADN mediante la unión a una matriz de sílica y se lava. En los métodos 2) y 5) el tejido se lisa químicamente, el ADN se une selectivamente a una membrana a base de sílica y se realizó varios lavados antes de la elución de ADN. En el método 3) se usa una solución de lisis con el desnaturalizante hidrócloruro de guanidina y el ADN se precipita con isopropanol. En el método 4) los tejidos se incuban en una solución que contiene enzimas líticas, seguido de una limpieza con cloroformo y precipitación del ADN con etanol.

(ng mg⁻¹) was calculated considering the total DNA extracted and the amount of tissue employed for each method. Genomic DNA samples (approximately 125 ng per lane) were resolved by horizontal gel electrophoresis in 0.8% agarose gels in 1X Tris-Acetate-EDTA buffer. Gels were stained with ethidium bromide (0.5 mg mL⁻¹) and photographed under UV light (Sambrook and Russell, 2001).

End-point PCR amplification

PCR reactions were performed using 100 ng of genomic DNA. Validated PCR primers specific for the amplification of *Z. mays* invertase gene (*ivr1*), *35S* promoter and *nos* terminator (Table 1) were used at 0.3 μ M, plus 0.2 mM dNTP, 2.5 mM MgCl₂ and 0.02 U μ L⁻¹ Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Co. Carlsbad, CA, USA) per reaction (20 μ L). Cycle conditions were the same for the three amplicons: 1 cycle at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 45 s at each one of 94, 56 and 72 °C, and a final cycle at 72 °C for 7 min. The reactions were run in a GenAmp® PCR system 9700 Thermocycler (Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, USA). PCR products were resolved by horizontal electrophoresis in 2 % agarose gels, and 50-bp or 100-bp DNA ladder (Promega Co. Madison, WI, USA) were used accordingly as size markers. Gels were stained with ethidium bromide (0.5 mg mL⁻¹) and photographed under UV light. Non-template controls were included in each PCR run. All amplicons obtained were cloned in a pGEM vector and sequenced to verify identity.

RESULTS AND DISCUSSION

Spectrophotometric assessment of DNA yield and purity

There was a high degree of heterogeneity among the different extraction methods evaluated as DNA

Análisis espectrofotométrico y electroforético de ADN genómico

Un escaneo UV de 200-380 nm se realizó para todas las extracciones de ADN (espectrofotómetro Shimadzu UV160U UV/ visible). La concentración de ADN genómico se calculó considerando que un valor de A₂₆₀ de 1.00 corresponde a 50 ng μ L⁻¹ de ADN de doble cadena (Sambrook y Russell, 2001). La absorbancia a 320 nm se consideró para la estimación de fondo. El rendimiento de ADN (ng mg⁻¹) se calculó considerando el ADN total extraído y la cantidad de tejido empleado para cada método. Muestras de ADN genómico (aproximadamente 125 ng por carril) se resolvieron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8 % en el amortiguador 1X Tris-acetato-EDTA. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg mL⁻¹) y se fotografiaron bajo luz UV (Sambrook y Russell, 2001).

Amplificación por PCR punto final

Para las reacciones de PCR se usaron 100 ng de ADN genómico. Cebadores de PCR validados, específicos para la amplificación del gen invertasa de *Z. mays* (*ivr1*), promotor *35S* y terminador *nos* (Cuadro 1) se usaron a 0.3 μ M, además de dNTP 0.2 mM, MgCl₂ 2.5 mM y 0.02 U μ L⁻¹ de Taq ADN polimerasa Platinum (Invitrogen, Co. Carlsbad, CA, USA.) por reacción (20 μ L). Las condiciones del termociclador fueron las mismas para los tres amplicones: 1 ciclo a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 45 s en cada uno de 94, 56 y 72 °C, y un ciclo final a 72 °C durante 7 min. Las reacciones se realizaron en un termociclador GenAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, USA). Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2 %, y se usaron escaleras de ADN de 50 pb o 100 pb (Promega Co. Madison, WI, USA.) como marcadores de tamaño. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 μ g mL⁻¹) y se fotografiaron bajo luz UV. Testigos

Table 1. PCR primers used for amplification of specific DNA sequences.

Cuadro 1. Cebadores usados para la amplificación de secuencias específicas de ADN.

Target	Name	5' – 3' Sequence	Amplicon size (bp)	Reference
Invertase (<i>ivr1</i>) gene	IVR1-F	CCgCTgTATCACAaggCTggTACC	225	Bonfini <i>et al.</i> , 2007
	IVR1-R	ggAgCCCgTgTAgAgCATgACgATC		
<i>CaMV 35S</i> Promoter	35S-cf3	CCACgTCTTCAAAgCAAgTgg	123	Bonfini <i>et al.</i> , 2007
	35S-cr4	TCCTCTCCAAATgAAATgAACTTCC		
<i>nos</i> Terminator	HA-nos118-f	gCATgACgTTATTTATgAgATggg	118	Bonfini <i>et al.</i> , 2007
	HA-nos118-r	gACACCgCgCgCgATAATTTATCC		

yield. Methods 1), 2) and 3) yielded DNA in the same value range (Figure 1), except for some of the tissues extracted with method 2), specifically grain and dry plant leaf. In contrast, method 4) yielded DNA one order of magnitude higher than the other methods with values from 472 ng mg⁻¹ in grains to 4120 ng mg⁻¹ in dry leaf (Figure 1). Even for a single method, there are noticeable differences depending on the type of plant tissue tested. Although in a kernel about 50 % of the extracted DNA comes from the endosperm and the other 50 % from the embryo (Trifa and Zhang, 2004), low DNA yields from whole grains were typically obtained because of the high starch content in the endosperm. Given the high DNA content in embryos, after their manual dissection, DNA was obtained in the best case with a 20-fold enrichment with method 2). DNA from embryos was used as an experimental ideal sample not proposed to be performed as a tissue

sin ADN molde se incluyeron para cada corrida de PCR. Todos los amplicones obtenidos se clonaron en un vector pGEM y se secuenciaron para verificar la identidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación espectrofotométrica de rendimiento y pureza de ADN

Hubo un grado de heterogeneidad alto entre los métodos de extracción evaluado como rendimiento de ADN. Los métodos 1), 2) y 3) produjeron una cantidad de ADN en el mismo rango (Figura 1), excepto algunos de los tejidos extraídos con el método 2), específicamente grano y hoja seca. En contraste, el método 4) proporcionó ADN de un orden de magnitud superior a los otros métodos con valores de 472 ng mg⁻¹ en granos a 4120 ng mg⁻¹ en hoja seca (Figura 1). Incluso para un solo método, hay

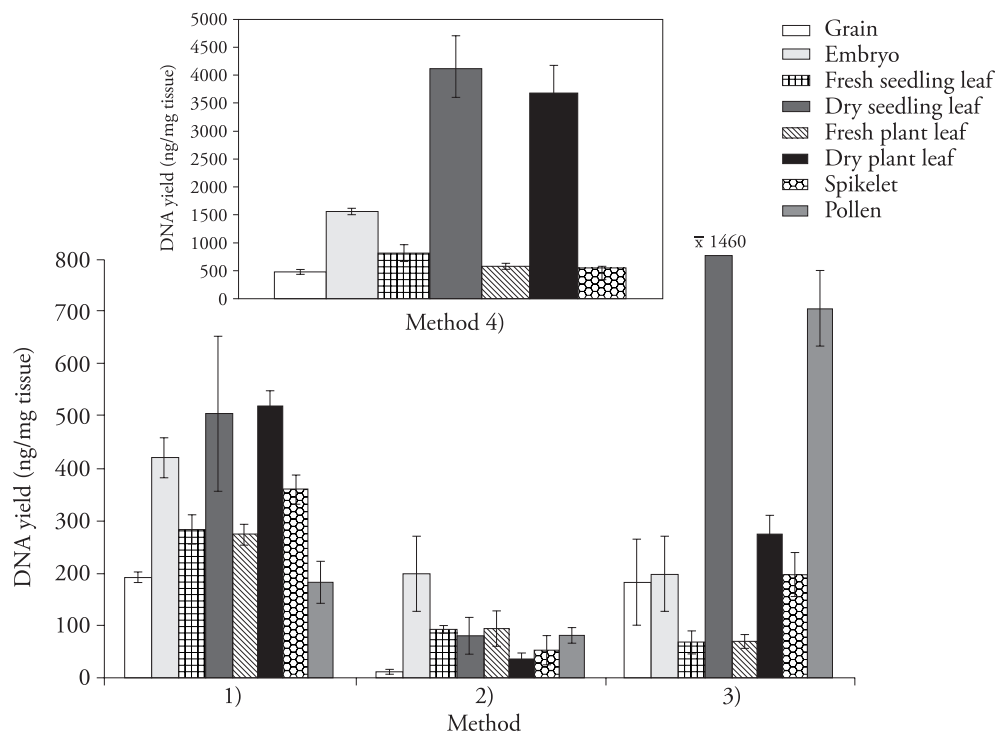


Figure 1. Comparative yields of genomic DNA extracted from various maize tissues using four extraction methods. 1) Qbiogene Fast DNA kit; 2) Qiagen DNeasy plant kit; 3) Invitrogen DNAzol; 4) Invitrogen Easy DNA. Values are means $\pm$ S.D. of three independent extractions.

Figura 1. Rendimientos comparativos de ADN genómico extraído de diversos tejidos de maíz con cuatro métodos de extracción. 1) Kit Qbiogene Fast DNA; 2) Kit Qiagen DNeasy para planta; 3) DNAzol Invitrogen; 4) Easy DNA Invitrogen. Los valores son promedios $\pm$ D. E. de tres extracciones independientes.

for a routine analysis procedure, but that could be useful for special individual plant analyses. In general when leaves were dried, a two-to-four-fold increase in DNA yield was obtained with methods 1) and 3) with respect to the fresh tissue. In contrast, method 2) yielded the same or a lower amount of DNA in dry tissue when compared with the fresh counterpart. Spikelets and pollen were considered as tissues to be analyzed due to their potential application in gene flow and cross fertilization studies to define isolation distances for transgenic maize plots (Sanvido *et al.*, 2008). Pollen grains were not easily lysed using any of the manufacturer protocols, so a grinding step with liquid nitrogen was performed before DNA extraction. In this manner, satisfactory DNA yields were obtained from a low amount of tissue (Figure 1).

A fifth DNA extraction method (method 5) was also included in this study in view of the good quality DNA it rendered in a study by Quirasco *et al.* (2008). DNA from grains and fresh leaves rendered low yields similar to the ones obtained with method 2), being 21 and 35 ng DNA mg⁻¹ tissue. Although UV spectrophotometry (A_{260}) is widely used for nucleic acids quantification, it has shortcomings: it measures double-stranded DNA but if the sample carries RNA, single-stranded DNA or other compounds, such as phenols, and absorbance increases accordingly. Both, DNA degradation and denaturation contribute to this hyperchromic effect. Degraded DNA may yield single-stranded fragments and upon denaturation, strand separation occurs (Demeke and Jenkins, 2010; Gryson, 2010). Reliable, absolute quantification of DNA by UV spectrophotometry is difficult to achieve unless a pure double-stranded DNA sample is dissolved and evenly distributed in solution. Other methods to quantify DNA rely in intercalating agents, such as SYBR Green and PicoGreen. These fluorescent dyes bind preferentially to double-stranded DNA yielding, a very sensitive method. However, SYBR Green methods may overestimate DNA concentrations by 15 to 50 % (Nielsen *et al.*, 2008).

DNA extracted is intended for further molecular analyses requiring high purity in order to obtain reliable and consistent results. For PCR analysis, DNA suitability is usually assessed measuring absorbance at 230, 260 and 280 nm (Table 2). The A_{260}/A_{280} ratio indicates the DNA preparation purity regarding to the presence of contaminant

diferencias notables dependiendo del tipo de tejido vegetal de prueba. Aunque en un grano alrededor del 50 % del ADN extraído proviene del endospermo y el otro 50 % del embrión (Trifa y Zhang, 2004), los rendimientos bajos de ADN de granos enteros se deben típicamente al contenido alto de almidón en el endospermo. Dado el alto contenido de ADN en los embriones, después de su disección manual, el ADN se obtuvo en el mejor caso con un enriquecimiento 20 veces mayor con el método 2). El ADN de embriones se usó como una muestra experimental ideal no propuesta para ser usada para un procedimiento de análisis de rutina, pero que podría ser útil para el análisis individual de una planta en especial. En general, cuando se secaron las hojas, se obtuvo un rendimiento de ADN dos a cuatro veces mayor con los métodos 1) y 3) con respecto al tejido fresco. En contraste, el método 2) produjo la misma o una cantidad menor de ADN en el tejido seco comparado con la contraparte fresca. Las espiguillas y polen se consideraron como tejidos a analizar debido a su aplicación potencial en la evaluación del flujo de genes y los estudios de fertilización cruzada para definir las distancias de aislamiento para las parcelas de maíz transgénico (Sanvido *et al.*, 2008). Los granos de polen no se lisaron fácilmente usando cualquiera de los protocolos del fabricante, por lo que se realizó una etapa de molienda con nitrógeno líquido antes de la extracción de ADN. De esta manera, se obtuvieron rendimientos satisfactorios de ADN desde una cantidad baja de tejido (Figura 1).

Un quinto método de extracción de ADN (método 5) también se incluyó en este estudio en vista de la buena calidad de ADN proporcionado en un estudio de Quirasco *et al.* (2008). El ADN de granos y hojas frescas proporcionó rendimientos bajos similares a los obtenidos con el método 2), siendo de 21 y 35 ng de ADN mg tejido⁻¹. Aunque la espectrofotometría UV (A_{260}) se usa ampliamente para la cuantificación de ácidos nucleicos, tiene limitaciones: mide el ADN de cadena doble, pero si la muestra contiene ARN, ADN de una sola hebra u otros compuestos, como fenoles y la absorbancia aumenta en consecuencia. Tanto la degradación del ADN como su desnaturalización contribuyen a ese efecto hipercrómico. El ADN degradado puede producir fragmentos monocatenarios y desnaturalización, y se produce la separación de cadenas (Demeke y Jenkins, 2010; Gryson, 2010). Lograr una

Table 2. Values of absorbance 260/280 ratios of DNA extracted from various maize tissues with five different methods. Cuadro 2. Valores de las relaciones de absorbancia 260/280 de ADN extraído de diversos tejidos de maíz con cinco métodos diferentes.

Tissue	Extraction method				
	1)	2)	3)	4)	5)
Dry grain	2.1 ± 0.02	4.0 ± 0.72 (0.86)	2.1 ± 0.24	1.7 ± 0.01	1.77 ± 0.03 (1.00)
Embryo from dry grain	1.9 ± 0.07	1.7 ± 0.02 (1.43)	1.9 ± 0.07	1.9 ± 0.03 (1.50)	N.D.
Fresh leaf from seedling	1.9 ± 0.08	1.8 ± 0.06 (1.50)	2.1 ± 0.05	1.5 ± 0.10 (1.58)	1.8 ± 0.03 (0.55)
Dry leaf from seedling	1.5 ± 0.09	2.3 ± 0.37 (1.50)	1.1 ± 0.01 (0.50)	1.4 ± 0.10 (1.00)	N.D.
Fresh leaf from plant	1.7 ± 0.01	1.7 ± 0.05 (1.75)	2.0 ± 0.01	1.7 ± 0.04	N.D.
Dry leaf from plant	1.6 ± 0.03	1.5 ± 0.11 (1.00)	1.7 ± 0.02	1.3 ± 0.04	N.D.
Spikelet	2.1 ± 0.02	1.8 ± 0.12 (1.07)	1.9 ± 0.10	N.D.	N.D.
Pollen	2.0 ± 0.10	1.4 ± 0.10 (1.33)	1.5 ± 0.10	1.9 ± 0.03 (0.65)	1.7 ± 0.01 (0.52)

Methods: 1) Qbiogene Fast DNA kit; 2) Qiagen DNeasy plant kit; 3) Invitrogen DNAzol; 4) Invitrogen Easy DNA; 5) Genetic ID Fast DNA kit. N.D. Not determined. Values are means ± S.D. of three independent extractions. The A_{260}/A_{230} ratio was calculated for those samples that showed A_{230} values below 2.00 and are indicated in parenthesis ♦ Métodos: 1) Kit Qbiogene Fast DNA; 2) Kit Qiagen DNeasy plant; 3) DNAzol Invitrogen; 4) Easy DNA Invitrogen; 5) Kit Genetic ID Fast DNA. N.D. No determinado. Los valores son promedios ± D.E. de tres extracciones independientes. La relación A_{260}/A_{230} se calculó para aquellas muestras que mostraron valores menores a 2.00 y están indicados en paréntesis.

proteins, and although the values obtained in most DNA preparations seemed to be adequate (values between 1.8 and 2.0) (Sambrook and Russell, 2001; Gryson, 2010), it is not an absolute criterion. A further quality indicator for DNA extracts can be obtained from the ratio of A_{260}/A_{230} , it is recommended to be ≥ 1.7 , which means that the A_{260} would lead to an accurate DNA quantification. A value below 1.7 is associated with the presence of carbohydrate and phenolic compounds that may interfere with PCR (Corbisier *et al.*, 2007; Demeke *et al.*, 2009; Gryson, 2010). For most of the DNA preparations, the A_{230} value was well above 2.0, so the corresponding ratio could not be calculated (Table 2). Results showed that only a few of the samples obtained meet the mentioned standard value, and that purity assessed by absorbance was not necessarily related to amplification capability by a given DNA template, as shown below.

Some buffer components present in the DNA extraction kits might contribute to the absorbance.

cuantificación absoluta y confiable de ADN por espectrofotometría UV es difícil, a menos que se disuelva una muestra pura de ADN de cadena doble y la molécula se distribuya uniformemente en solución. Otros métodos para cuantificar el ADN se basan en agentes intercalantes, como SYBR Green y PicoGreen. Estos colorantes fluorescentes se unen preferentemente al ADN de cadena doble, lo que es un método muy sensible. Sin embargo, los métodos SYBR Green pueden sobreestimar las concentraciones de ADN entre 15 a 50 % (Nielsen *et al.*, 2008).

El ADN extraído se podría usar en otros análisis moleculares que requieren pureza alta para obtener resultados confiables y reproducibles. Para el análisis por PCR, la idoneidad del ADN por lo general se evalúa midiendo la absorbancia a 230, 260 y 280 nm (Cuadro 2). La relación A_{260}/A_{280} indica la pureza de preparación del ADN con respecto a la presencia de proteínas contaminantes, y aunque los valores obtenidos en la mayoría de las preparaciones de

Substances like guanidine-HCl, EDTA or phenol could be carried over the process and absorb at 230 or 280 nm. Other compounds that might be in the plant such as aromatics, humic acids, carbohydrates, and peptides absorb at 230 nm as well (Sambrook and Russell, 2001; Demeke and Jenkins, 2010). A scan throughout 200 and 320 nm was useful for detecting contaminations or carryover of reagents from the extraction procedures. UV scan profiles from DNA extracted with methods 1) and 3) showed outstanding out-of-range values at wavelengths below 260 nm. Moreover, no inflection point was observed, probably indicating an important carryover of the chaotropic salt used in the extraction procedure.

Electrophoretic evaluation of DNA integrity

Because the most common sources to obtain DNA for GMO analyses are grains and fresh leaves, these preparations were further analyzed for DNA integrity in 0.8 % agarose gels. Tissue source also affected DNA integrity, as illustrated for methods 2), 4) and 5) which showed a smear in DNA from leaf, consistent with DNA fragmentation; however, DNA molecular size was big enough to obtain good amplification, as shown further on by end-point PCR. In the case of method 1) for leaf DNA, any band could be observed. Due to the fact that A_{260} was used to estimate DNA concentration in order to load 125 ng per lane, it is clear that DNA amount was overestimated because of the presence of contaminants that absorbed at that wavelength. In contrast, DNA obtained from dry grain was observed as a distinct high-molecular weight band, in particular the ones obtained with methods 1), 4) and 5). Method 3) yielded DNA with a similar electrophoretic pattern for both tissues, as a faint high-molecular weight band with a discrete smear underneath and an intense high-mobility smear. Quirasco *et al.* (2004) applied method 5) to detect and quantify the *cry9C* transgene in highly processed corn products such as baked and fried tortillas. Despite the extreme pH and temperature treatments, that lead to DNA degradation and make difficult the PCR analysis (Gryson, 2010), down to 0.1 % (w/w) GMO was detected in most products.

ADN parecían adecuadas —valores entre 1.8 y 2.0— (Sambrook y Russell, 2001; Gryson, 2010), no es un criterio absoluto. Otro indicador de calidad para los extractos de ADN puede obtenerse a partir de la relación de A_{260}/A_{230} , se recomienda que sea de ≥ 1.7 , lo que significa que la A_{260} daría lugar a una cuantificación precisa de ADN. Un valor menor que 1.7 se asocia con la presencia de compuestos fenólicos e hidratos de carbono que pueden interferir con la PCR (Corbisier *et al.*, 2007; Demeke *et al.*, 2009; Gryson, 2010). Para la mayoría de las preparaciones de ADN, el valor A_{230} fue mayor que 2.0, por lo cual la relación correspondiente no pudo calcularse (Cuadro 2). Los resultados mostraron que sólo algunas de las muestras obtenidas cumplen con el valor estándar mencionado, y que la pureza evaluada por absorbancia no estuvo necesariamente relacionada con la capacidad de amplificación de un ADN determinado, como se muestra a continuación.

Algunos componentes del amortiguador presentes en los kits de extracción de ADN pueden contribuir a incrementar la absorbancia. Sustancias como hidrocloreuro de guanidina, EDTA o fenol podrían acarrear en el proceso de extracción y también absorben a 230 o 280 nm. Otros compuestos que podrían estar en la planta, como aromáticos, ácidos húmicos, carbohidratos, péptidos también absorben a 230 nm (Sambrook y Russell, 2001; Demeke y Jenkins, 2010). Un barrido entre 200 y 320 nm fue útil para detectar contaminaciones o el arrastre de reactivos de los protocolos de extracción. Los perfiles del barrido en UV del ADN extraído con los métodos 1) y 3) mostraron valores notablemente fuera del intervalo de longitudes de onda inferiores a 260 nm. Además, no se observó ningún punto de inflexión, lo que probablemente indica un arrastre importante de la sal caotrópica usada en el procedimiento de extracción.

Evaluación electroforética de la integridad del ADN

Dado que las fuentes más comunes para obtener ADN para los análisis de OGM son los granos y hojas frescas, estas preparaciones se analizaron además para comprobar la integridad del ADN en geles de agarosa al 0.8 %. La fuente del tejido también afectó la integridad del ADN, ilustrado para los métodos 2), 4) y 5) que mostraron un barrido en el ADN

DNA as substrate for PCR amplification

A wide array of methods have been developed and adapted to extract and purify DNA for various agricultural diagnostic applications. Purification methods are based on different principles that range from DNA precipitation to anion-exchange techniques and selective adsorption of DNA. Demeke and Jenkins (2010) point out 18 DNA extraction methods and kits; some of them have variations or are coupled, *e.g.*, the CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) DNA extraction procedure followed by a DNA purification kit. An essential test for PCR-based analyses is to determine if the extracted DNA is a good substrate for DNA polymerase amplification, as plant tissues contain compounds that inhibit this reaction. The biochemical composition of each tissue is quite different, representing a whole array of compounds that hinders the attainment a DNA preparation suitable for molecular analysis. Whereas the whole maize grain contains high amounts of polysaccharides, green leaf tissues contain phenolic and polyphenolic compounds that might also interfere with the DNA polymerase activity (Gryson, 2010). Neutral polysaccharides such as 2 % starch and 4 % dextran, do not inhibit the PCR amplification. In contrast, the acidic polysaccharides alginic acid and dextran sulfate, as well as glucuronic acid, inhibit amplification, even at concentrations below 0.02 % (Holden *et al.*, 2003). Plant phenolic compounds co-purified with DNA may inhibit the PCR amplification by binding to the DNA polymerase or to the DNA itself (Wilson, 1997; Schrader *et al.*, 2012). To assess this, the amplification of a 225-bp fragment of a *Z. mays* endogenous gene, invertase (*ivr1*), was performed using the DNA extractions obtained before as templates. Methods 2), 3) and 4) were chosen because they represent different methodological approaches, and they showed the extremes regarding DNA yield. According to results, not all preparations obtained with methods 3) and 4) yielded amplifiable DNA, in contrast to the amplification achieved from all DNA samples extracted with method 2) (Figure 2). These results were consistently obtained in the replicated samples and reactions, suggesting the presence of an inhibitor of the PCR in DNA preparations coming from methods 3) and 4). It is noteworthy that for method 4) the highest DNA yields were obtained

de hoja consistente con la fragmentación del ADN; sin embargo, el tamaño molecular del ADN fue lo suficientemente grande para obtener una amplificación buena, como se muestra más adelante por PCR punto final. En el caso del método 1) para el ADN de la hoja, no pudo observarse ninguna banda. Debido a que la A_{260} se usó para estimar la concentración de ADN con el fin de cargar 125 ng por carril, está claro que la cantidad de ADN se sobrestimó por la presencia de contaminantes absorbidos en esa longitud de onda. En contraste, el ADN obtenido de grano seco fue observado como una banda bien definida de peso molecular alto, particularmente, los obtenidos con los métodos 1), 4) y 5). El método 3) produjo ADN con un patrón electroforético similar para ambos tejidos, como una banda débil de alto peso molecular tenue con una mancha discreta debajo y un intenso barrido de alta movilidad. Quirasco *et al.* (2004) aplicaron el método 5) para detectar y cuantificar el transgén *cry9C* en los productos de maíz altamente procesados como tortillas horneadas y fritas. A pesar de los tratamientos extremos de pH y temperatura, que llevan a la degradación del ADN y dificultan el análisis de PCR (Gryson, 2010), en dicho estudio se detectó hasta 0.1 % (p/p) de OGM en la mayoría de los productos.

ADN como sustrato para la amplificación por PCR

Una gama amplia de métodos se ha desarrollado y adaptado para extraer y purificar ADN para diversas aplicaciones de diagnóstico agrícolas. Los métodos de purificación se basan en diferentes principios que van desde precipitación de ADN hasta técnicas de intercambio aniónico y la adsorción selectiva de ADN. Demeke y Jenkins (2010) señalan 18 métodos y kits de extracción de ADN; algunos de ellos tienen variaciones o están acoplados, por ejemplo, el procedimiento de extracción de ADN con CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) seguido por un kit de purificación de ADN. La prueba esencial para los análisis basados en la PCR es determinar si el ADN así obtenido es un buen sustrato para la amplificación con la ADN polimerasa, ya que los tejidos de las plantas contienen compuestos que inhiben esta reacción. La composición bioquímica de cada tejido varía, y representa toda una serie de compuestos que dificulta obtener

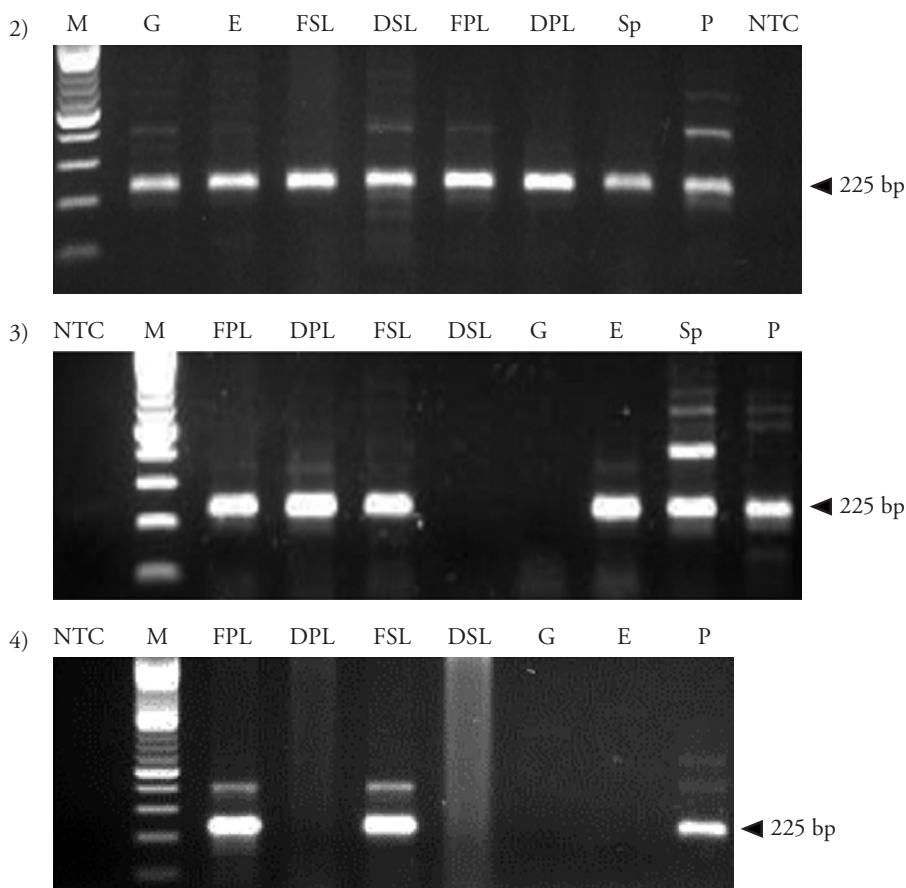


Figure 2. Analysis of DNA extracted with different methods from maize grain (G), embryo (E), fresh seedling leaf (FSL), dry seedling leaf (DSL), fresh plant leaf (FPL), dry plant leaf (DPL), spikelet (Sp) and pollen (P). DNA quality was examined by using it as template for PCR amplification of a 225-bp fragment of the invertase gene. For the PCR reaction 100 ng of genomic DNA were employed, with the primers indicated in Table 1. Amplicons were resolved in a 2 % agarose gel. Lane M, 100-bp DNA ladder size standard. Lane NTC, non-template control. DNA extraction methods: 2) Qiagen DNeasy plant kit; 3) Invitrogen DNazol; 4) Invitrogen Easy DNA.

Figura 2. Análisis de ADN extraído con diferentes métodos de un grano de maíz (G), embrión (E), hoja fresca de plántula (FSL), hoja seca de plántula (DSL), hoja fresca de planta (FPL), hoja seca de planta (DPL), espiga (Sp) y polen (P). La calidad del ADN se examinó usándolo como molde para amplificación PCR de un fragmento de 225 pb del gen invertasa. Para la reacción de PCR se usaron 100 ng de ADN genómico con los iniciadores indicados en el Cuadro 1. Los amplicones se resolvieron en un gel de agarosa al 2 %. Carril M, escalera de ADN de 100 pb. Carril NTC, testigo sin ADN molde. Métodos de extracción de ADN: 2) Kit Qiagen DNeasy para planta; 3) DNazol Invitrogen; 4) Easy DNA Invitrogen.

(Figure 1), as well as an acceptable UV spectrum and DNA integrity for preparations coming from fresh tissues. However, DNA amplification of the endogenous gene could not be achieved from DNA preparations for all tissues tested. These results might be explained by a non-accurate DNA estimation that

una preparación de ADN adecuada para un análisis molecular. Mientras que el grano de maíz completo contiene cantidades altas de polisacáridos, los tejidos de hojas verdes contienen compuestos fenólicos y polifenólicos que también podrían interferir con la actividad de la ADN polimerasa (Gryson, 2010).

led to an underload in the PCR mix, whereas other substances that absorb at 260 nm are included in the reaction (Holden *et al.*, 2003). Particularly the DNA extracted from dry tissues with methods 3) and 4) (Figure 2, lanes DPL and DSL) did not yield any amplicon due to the fact that inhibitors might be more concentrated than in the corresponding fresh tissues. There was a brownish color in dry tissues, which might be caused by phenolic compounds and polymers such as lignin. These contaminants might explain amplification inhibition.

In Table 2, dry tissue values for A_{260}/A_{280} are approximately 1.4, indicating either a high protein concentration or the presence of phenolic compounds in relation to DNA amounts. As for embryo tissue, contaminants not easily detectable spectrophotometrically might be present. The results obtained were similar to other reports concluding that methods yielding high DNA concentration might contain impurities that hinder proper amplification, as compared to those yielding a lower amount of DNA compromising yield in order to produce a more purified preparation (Terry *et al.*, 2002; Corbisier *et al.*, 2007). Altogether, these results reflect the diverse composition of the various maize tissues employed, and that not all extraction methods could yield acceptable DNA preparations across the board.

The limitations of some of the methods tested were confirmed when DNA was extracted with the same five methods from grain and plant leaf from three transgenic events (NK603, MON810 and Bt11) and tested as substrate for end-point PCR for the amplification of invertase gene, as before. For all these reactions, a non-template control was included and no amplicon was obtained (data not shown). DNA prepared with methods 1), 2) and 5) served as an adequate template for PCR amplification, generating consistently a 225-bp amplicon regardless of tissue or maize genotype (Figure 3). Amplification from DNA prepared with method 1) reflected the fact that DNA from leaves is usually more fragmented than DNA from grains, as the band intensity of the amplicon from the three leaf samples is clearly lower than that obtained from grains. Besides, an inaccurate DNA estimation by A_{260} could have led to an overestimation resulting in a lower DNA load in the PCR. DNA prepared with methods 3) and 4) was a poor template for

Los polisacáridos neutros como almidón al 2 % y dextrana al 4 %, no inhiben la amplificación por PCR. En contraste, los polisacáridos ácidos como ácido algínico y sulfato de dextrana, así como ácido glucorónico, inhiben la amplificación, incluso en concentraciones menores a 0.02 % (Holden *et al.*, 2003). Los compuestos fenólicos vegetales copurificados con el ADN pueden inhibir la amplificación por PCR al unirse al ADN polimerasa o al ADN en sí (Wilson, 1997; Schrader *et al.*, 2012). Para evaluar esto, se amplificó un fragmento de 225 pb de un gen endógeno de *Z. mays* —invertasa (*ivr1*)— usando las extracciones de ADN obtenidas como moldes. Los métodos 2), 3) y 4) fueron elegidos porque representan diferentes enfoques metodológicos, y porque mostraron los extremos con respecto a rendimiento de ADN. De acuerdo con los resultados, no todas las preparaciones obtenidas con los métodos 3) y 4) produjeron ADN amplificable, en contraste con la amplificación lograda a partir de todas las muestras de ADN extraídas con el método 2) (Figura 2). Estos resultados fueron obtenidos consistentemente en las muestras y reacciones repetidas, sugiriendo la presencia de un inhibidor de la PCR en las preparaciones de ADN procedentes de los métodos 3) y 4). Vale la pena notar que para el método 4) se obtuvieron los rendimientos más altos de ADN (Figura 1), así como también un espectro UV e integridad del ADN aceptables, para las preparaciones desde tejidos frescos. Sin embargo, la amplificación de ADN del gen endógeno no pudo realizarse desde las preparaciones de ADN de todos los tejidos analizados. Estos resultados podrían explicarse por una estimación de ADN imprecisa que llevó a una carga menor en la mezcla de PCR, mientras que otras sustancias que se absorben a 260 nm se incluyeron en la reacción (Holden *et al.*, 2003). En particular, el ADN extraído de tejidos secos con los métodos 3) y 4) (Figura 2, carriles DPL y DSL) no produjo ningún amplicón debido a que los inhibidores podrían estar más concentrados que en los correspondientes tejidos frescos. Hubo un color parduzco en los tejidos secos, cuya causa pudo ser compuestos fenólicos y polímeros como la lignina. Estos contaminantes podrían explicar la inhibición de la amplificación.

En el Cuadro 2, los valores de A_{260}/A_{280} para el tejido seco son aproximadamente 1.4, lo que indica una concentración alta de proteína en relación con

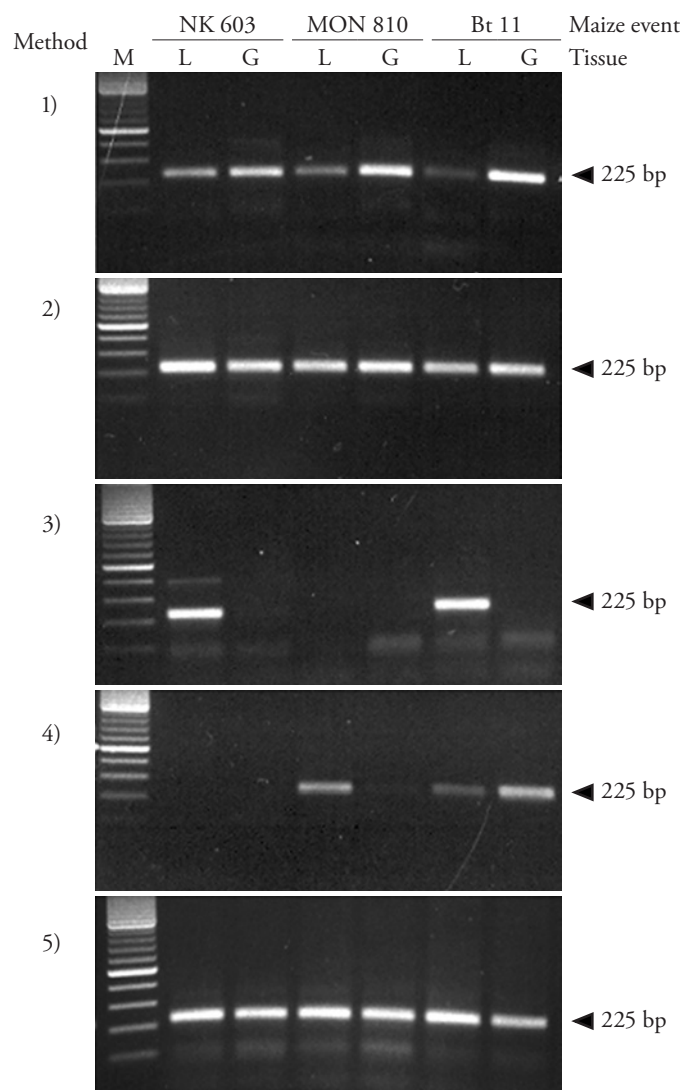


Figure 3. Analysis of DNA extracted with five methods from maize grain (G) and fresh plant leaf (L). DNA quality was examined by using it as template for PCR amplification of a 225-bp fragment of the invertase gene. DNA was extracted from the indicated tissues from three genetically modified maize events. For the PCR reaction 100 ng of genomic DNA were employed with the primers indicated in Table 1. Amplicons were resolved in a 2 % agarose gel. Lane M, 100-bp DNA ladder size standard. DNA extraction methods: 1) Qbiogene Fast DNA kit; 2) Qiagen DNeasy plant kit; 3) Invitrogen DNAzol; 4) Invitrogen Easy DNA; 5) Genetic ID Fast DNA kit.

Figura 3. Análisis de ADN extraído con cinco métodos de grano de maíz (G) y hoja fresca de planta (L). La calidad del ADN se examinó usándolo como molde para amplificación por PCR de un fragmento de 225 pb del gen invertasa. El ADN se extrajo de los tejidos indicados desde tres eventos de maíz genéticamente modificado. Para la reacción de PCR se usaron 100 ng de ADN genómico con los iniciadores indicados en el Cuadro 1. Los amplicones se resolvieron en un gel de agarosa al 2 %. Carril M, escalera de ADN de 100 pb. Métodos de extracción de ADN: 1) Kit Qbiogene Fast DNA; 2) Kit Qiagen DNeasy para planta; 3) DNAzol Invitrogen; 4) Easy DNA Invitrogen; 5) Kit Genetic ID Fast DNA.

PCR with very inconsistent amplification of the endogenous gene.

The same DNA samples were also used in end-point PCR to detect the *CaMV 35S* promoter and the *Agrobacterium tumefaciens nos* terminator sequences, two common elements in genetically engineered plants. Again, the DNA prepared by methods 2) and 5) yielded a consistent 123-bp amplicon corresponding to the *CaMV 35S* promoter, regardless of the tissue or maize genotype (Figure 4). DNA prepared with methods 1), 3) and 4) also yielded the amplicon, but in an inconsistent manner, as faint bands were observed for some preparations. A similar behavior was observed for DNA preparations when the 118-bp amplicon from the *nos* terminator was synthesized, due to the fact that DNA extracted

cantidades de ADN o la presencia de compuestos fenólicos. Respecto a los tejidos de embriones, podrían estar presentes contaminantes no fácilmente detectables por espectrofotometría. Los resultados obtenidos fueron similares a otros reportes que concluyen que en los métodos que producen una alta concentración de ADN, éste puede contener impurezas que dificultan una amplificación adecuada, comparada con los que producen una menor cantidad de ADN, comprometiendo el rendimiento para producir una preparación más pura (Terry *et al.*, 2002; Corbisier *et al.*, 2007). En conjunto, estos resultados reflejan la composición diversa de los distintos tejidos de maíz empleados, y que no todos los métodos de extracción podrían producir preparaciones de ADN aceptables.

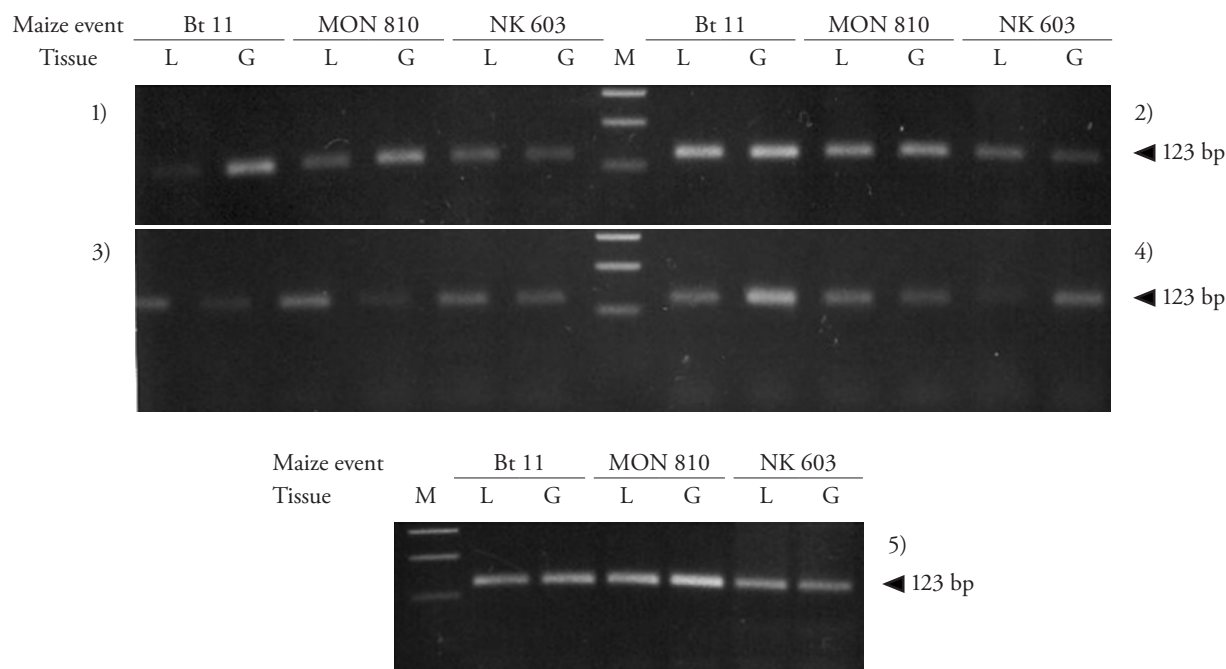


Figure 4. Detection of the *CaMV 35S* promoter sequence in three genetically modified maize events using genomic DNA extracted with five methods from grain (G) and fresh plant leaf (L) as template. The 123-pb amplicon was obtained using the primers indicated in Table 1. Amplicons were resolved in a 2 % agarose gel. Lane M, 100-bp DNA ladder size standard. DNA extraction methods: 1) Qbiogene Fast DNA kit; 2) Qiagen DNeasy plant kit; 3) Invitrogen DNAzol; 4) Invitrogen Easy DNA; 5) Genetic ID Fast DNA kit.

Figura 4. Detección de la secuencia del promotor *CaMV 35S* en tres eventos de maíz genéticamente modificado usando ADN genómico extraído con cinco métodos de grano (G) y hoja fresca de planta (L) como patrón. El amplicon de 123 pb se obtuvo usando los iniciadores indicados en el Cuadro 1. Los amplicones se resolvieron en un gel de agarosa al 2 %. Carril M, escalera tamaño estándar de ADN de 100 pb. Métodos de extracción de ADN: 1) Kit Qbiogene Fast DNA; 2) Kit Qiagen DNeasy para planta; 3) DNAzol Invitrogen; 4) Easy DNA Invitrogen; 5) Kit Genetic ID Fast DNA.

with methods 3) and 4) was the less adequate for a reliable amplification (data not shown). The identity of all amplicons presented in the previous results was verified by sequencing the respective clones.

As for GM detection, these results show that DNA quality (purity and integrity) is essential for an accurate analysis. In a similar study, six DNA extraction and purifications methods were tested to analyze Roundup Ready[®] soybean. The authors found that the DNA extraction and purification method has a profound effect on the recovery and quality of DNA. Actually, the method that produce the best preparation for qRT-PCR was DNA extracted with CTAB and further purified with a fast spin column technology (Demeke *et al.*, 2009). A study comparing eight extraction methods to isolate genomic DNA from several medicinal plants found that DNA preparations varied widely in yield and purity. Because the DNA was used in PCR-

Las limitaciones de algunos de los métodos analizados se confirmaron cuando el ADN se extrajo con los mismos cinco métodos a partir del grano y hoja de la planta de tres eventos transgénicos (NK603, MON810 y Bt11) y probados como sustrato para PCR punto final para la amplificación del gen invertasa, como los anteriores. Para todas estas reacciones se incluyó un testigo sin ADN molde y no se obtuvo ningún amplicón (datos no mostrados). El ADN preparado con los métodos 1), 2) y 5) fue un molde adecuado para la amplificación por PCR, por lo que generó consistentemente un amplicón de 225 pb independientemente del tejido o genotipo de maíz (Figura 3). La amplificación del ADN preparado con el método 1) reflejó el hecho de que el ADN de las hojas está generalmente más fragmentado que el ADN de los granos, ya que la intensidad de la banda del amplicón de las tres muestras de hojas es claramente menor que la obtenida desde granos. Además, una

based sequencing reactions the authors suggest to expand the A_{260}/A_{280} range to values between 1.3 and 2.3 where DNA samples might be amplifiable (Llongeras *et al.*, 2013). Such criteria are useful for this type of studies as a broad range of tissues were tested and each one of them presents certain difficulties to yield high-quality genomic DNA.

As this investigation was prompted by the Ministry of Environment and Natural Resources of Mexico to develop techniques for high-throughput screening of GMO events, a post-PCR hybridization assay could be implemented for confirmation. For example, detection and confirmation of transgenes in soybean is achieved by the use of an aequorin-oligonucleotide conjugate that allows the bioluminometric hybridization of *CaMV 35S* promoter, *nos* terminator and lectin DNA sequences in microtiter wells (Glynou *et al.*, 2004). In the second part of this investigation, DNA preparations obtained with the same commercial kits are evaluated for their performance in transgene quantification by real-time PCR.

CONCLUSIONS

Although ratios of A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} are considered to assess DNA purity, PCR inhibitors might be present in certain tissues and are not detected by spectrophotometry, thus leading to false negative results. The methods that involve the use of silica membrane columns and washing buffers showed to be an efficient combination for PCR inhibitors removal; besides, they are the most time-saving and practical, especially when a large number of samples must be processed. This study shows that adequate DNA preparations for PCR amplification could be obtained from several maize tissues and even from plant debris. This comparison of methods provides useful information for the Ministry of Environment analytical laboratories, so they can be implemented along with appropriate field sampling protocols in order to track the presence in the field of GM maize events.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was financed by CONACYT-SEMARNAT (grant 2004-C01-266). We thank M. Nájera-Martínez (UNAM, Faculty of Chemistry) for her technical assistance.

estimación imprecisa de ADN por A_{260} pudo llevar a una sobreestimación y resultar en una carga de ADN inferior en la PCR. El ADN preparado con los métodos 3) y 4) fue un molde deficiente para la PCR, con amplificación muy inconsistente del gen endógeno.

Las mismas muestras de ADN también se usaron en PCR punto final para detectar el promotor *CaMV 35S* y las secuencias del terminador *nos* de *Agrobacterium tumefaciens*, dos elementos comunes en las plantas genéticamente modificadas. De nuevo, el ADN preparado con los métodos 2) y 5) produjo un amplicón consistente de 123 pb que corresponde al promotor *CaMV 35S*, independientemente del tejido o genotipo de maíz (Figura 4). El ADN preparado con los métodos 1), 3) y 4) también produjo el amplicón, pero de una manera inconsistente, ya que se observaron bandas tenues para algunas preparaciones. Un comportamiento similar se observó para las preparaciones de ADN al sintetizar el amplicón de 118 pb del terminador *nos*, debido a que el ADN extraído con los métodos 3) y 4) fue el menos adecuado para una amplificación confiable (datos no mostrados). La identidad de todos los amplicones presentados en los resultados anteriores se verificó por la secuenciación de las clonas respectivas.

Respecto a la detección de GM, los resultados muestran que la calidad del ADN (pureza e integridad) es esencial para un análisis preciso. En un estudio similar, se probaron seis métodos de extracción y purificación de ADN para analizar soya Roundup Ready®. Los autores encontraron que el método de extracción y purificación de ADN tiene un gran efecto en la recuperación y en la calidad de ADN. De hecho, la mejor preparación de ADN para qRT-PCR fue la extraída con CTAB y purificado después con una tecnología spin de columna rápida (Demekke *et al.*, 2009). En un estudio se comparó ocho métodos de extracción para aislar ADN genómico de varias plantas medicinales y se encontró que las preparaciones de ADN variaban mucho en rendimiento y pureza. Dado que se usó ADN en reacciones de secuenciación basadas en PCR, los autores sugieren ampliar el rango A_{260}/A_{280} a valores entre 1.3 y 2.3, donde las muestras de ADN podrían ser amplificables (Llongeras *et al.*, 2013). Tales criterios son útiles para este tipo de estudios ya que se probó una amplia gama de tejidos y cada uno de ellos presenta ciertas dificultades para producir ADN genómico de alta calidad.

LITERATURE CITED

- Bonfini, L., W. Moens, E. Ben, M. Querci, B. Aygun, P. Corbisier, D. Morisset, J. Zel, and G. Van den Eede. 2007. Analytes and related PCR primers used for GMO detection and quantification. JRC Sci. Technol. Rep. EUR 23059 E. 1-51.
- CIBIOGEM (Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los OGM). 2012a. Solicitudes de Registro de OGMs 2012. Updated to June 25, 2012 http://www.cibiogem.gob.mx/OGMs/Paginas/Solicitudes_Reg_OGMs.aspx. (Accessed: October 2013).
- CIBIOGEM (Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los OGM). 2012b. Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los OGM. Updated to June 27, 2012 <http://www.cibiogem.gob.mx/redes/RedMexOGMs/Paginas/inicio.aspx> (Accessed: October, 2013).
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2009. Biodiversidad Mexicana. <http://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/maices/maiz1.html> (Accessed: October, 2013).
- Corbisier, P., W. Broothaerts, S. Gioria, H. Schimmel, M. Burns, A. Baoutina, K. R. Emslie, S. Furui, Y. Kurosawa, M. J. Holden, H. H. Kim, Y. M. Lee, M. Kawaharasaki, D. Sin, and J. Wang. 2007. Toward metrological traceability for DNA fragment ratios in GM quantification. 1. Effect of DNA extraction methods on the quantitative determination of Bt176 corn by real-time PCR. J. Agric. Food Chem. 55: 3249-3257.
- Demeke, T., and G. R. Jenkins. 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. Anal. Bioanal. Chem. 396: 1977-1990.
- Demeke, T., I. Ratnayaka, and A. Phan. 2009. Effects of DNA extraction and purification methods on real-time quantitative PCR analysis of Roundup Ready[®] soybean. J. AOAC Int. 92: 1136-1144.
- Glynou, K., P. C. Ioannou, and T. K. Christopoulos. 2004. Detection of transgenes in soybean via a polymerase chain reaction and a simple bioluminometric assay based on a universal aequorin-labeled oligonucleotide probe. Anal. Bioanal. Chem. 378: 1748-1753.
- GMO Compass. 2010. Genetically modified plants: Global Cultivation Area. Maize. Updated to March 29, 2010 http://www.gmo-compass.org/eng/agri_biotechnology/gmo_planting/341.genetically_modified_maize_global_area_under_cultivation.html (Accessed: October, 2013).
- Gryson, N. 2010. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. Anal. Bioanal. Chem. 396: 2003-2022.
- Holden, M., J. R. Blasic, L. Bussjaeger, C. Kao, L. A. Shokere, D. C. Kendall, L. Freese, and R. Jenkins. 2003. Evaluation of extraction methodologies for corn kernel (*Zea mays*) DNA for detection of trace amounts of biotechnology-derived DNA. J. Agric. Food Chem. 51: 2468-2474.
- Ley de Bioseguridad de organismos genéticamente modificados. 2005. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. Secretaría General. Secretaría de Servicios Parlamentarios. Centro de Documentación, Información y Análisis. <http://>

La presente investigación fue solicitada por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales de México para desarrollar técnicas de tamizaje de alta capacidad de procesamiento para la detección de eventos OGM, para la confirmación de resultados podría implementarse una prueba de hibridación post PCR. Por ejemplo, la detección y confirmación de transgenes en soya se consigue usando un conjugado de aequorina-oligonucleótido que permite la hibridación bioluminométrica del promotor *CaMV 35S*, terminador *nos* y secuencias de lectina de ADN en pocillos de microtitulación (Glynou *et al.*, 2004). En la segunda parte de esta investigación, se evalúan las preparaciones de ADN obtenidas con los mismos kits comerciales por su desempeño en la cuantificación del transgén por PCR tiempo real.

CONCLUSIONES

Aunque las relaciones de $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ se consideran para evaluar la pureza del ADN, podrían estar presentes inhibidores de PCR en ciertos tejidos y no ser detectados por espectrofotometría, lo que conduce a resultados negativos falsos. Los métodos que implican el uso de columnas de membrana de sílica y amortiguadores de lavado mostraron ser una combinación eficiente para la eliminación de inhibidores de PCR; además, ahorran más tiempo y son más prácticos, especialmente cuando se debe procesar un gran número de muestras. Este estudio muestra que se pueden obtener preparaciones adecuadas de ADN para la amplificación por PCR a partir de varios tejidos de maíz e incluso de restos vegetales. Esta comparación de métodos proporciona información útil para los laboratorios de análisis de la Secretaría del Medio Ambiente, por lo que pueden implementarse junto con los protocolos de muestreo de campo apropiados con el fin de rastrear la presencia en el campo de los eventos de maíz GM.

—Fin de la versión en Español—



www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LBOGM.pdf (Accessed: October, 2013).

Longeras, J. P., S. Nair, D. Salas-Leyva, and A. E. Schwarzbach. 2013. Comparing DNA extraction methods for analysis of

- botanical materials found in anti-diabetic supplements. *Mol. Biotechnol.* 53: 249-256.
- Nielsen, K., H. Smidt Mogensen, J. Hedman, H. Niederstätter, W. Parson, and N. Morling. 2008. Comparison of five DNA quantification methods. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2: 226-230.
- Ortiz-García S., E. Ezcurra, B. Schoel, F. Acevedo, J. Soberon, and A. A. Snow. 2005. Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico (2003-2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 12338-12343.
- Piñeyro-Nelson A., J. Van Heerwaarden, H. R. Perales, A. Serratos-Hernandez, A. Rangel, M. B. Hufford, P. Gepts, A. Garay-Arroyo, R. Rivera-Bustamante, and E. Alvarez-Buylla. 2009. Transgenes in Mexican maize: Molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Mol. Ecol.* 18: 750-761.
- Quirasco M., B. Schoel, P. Chhalliyil, J. Fagan, and A. Galvez. 2008. Real-time and conventional PCR detection of Liberty Link® rice varieties and transgenic soy in rice sampled in the Mexican and American retail markets. *Anal. Bioanal. Chem.* 392: 395-404.
- Quirasco M., B. Schoel, J. Plasencia, J. Fagan, and A. Galvez. 2004. Suitability of real-time quantitative polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for cry9C detection in Mexican corn tortillas: fate of DNA and protein after alkaline cooking. *J. AOAC Int.* 87: 639-646.
- Reglamento de la Ley de Bioseguridad de organismos genéticamente modificados. 2009. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. Secretaría General. Secretaría de Servicios Parlamentarios. Centro de Documentación, Información y Análisis. <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regla.htm> (Accessed: October, 2013).
- Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Press, USA.
- Sanvido, O., F. Widmer, M. Winzeler, B. Streit, E. Szerencsits, and F. Bigler. 2008. Definition and feasibility of isolation distances for transgenic maize cultivation. *Transgenic Res.* 17: 317-335.
- Schrader, C., A. Schielke, L. Ellerbroek, and R. Johne. 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113: 1014-1026.
- SIAP. 2011. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. Maíz: Números esenciales de un cultivo fundamental. Updated to October 3, 2011 http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=367:numeros-fundamentales-de-un-cultivo-fundamental&catid=6:boletines&Itemid=569 (Accessed: October, 2013).
- Terry, C. F., N. Harris, and H. C. Parkes. 2002. Detection of genetically modified crops and their derivatives: Critical steps in sample preparation and extraction. *J. AOAC Int.* 85: 768-774.
- Trifa, Y., and D. Zhang. 2004. DNA content in embryo and endosperm of maize kernel (*Zea mays* L.): impact on GMO quantification. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1044-1048.
- USDA. 2012. United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. Corn: Area, Yield, and Production. Updated to September 12, 2012 <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=BVS&hidReportRetrievalID=884&hidReportRetrievalTemplateID=1> (Accessed: October, 2013).
- Wilson, I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3741-3751.