

**Informe final\* del Proyecto ME007**  
**Detección de polen de plantas genéticamente modificadas en miel. Fase II**

**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, D.F., 04510  
**Correo electrónico:** [galvez@unam.mx](mailto:galvez@unam.mx)  
**Teléfono/Fax:** 5622-5208 Fax: 56225217  
**Fecha de inicio:** Mayo 15, 2014.  
**Fecha de término:** Enero 15, 2016.  
**Principales resultados:** Informe final.  
**Forma de citar\*\* el informe final y otros resultados:** Gálvez Mariscal, A. 2016. Detección de polen de plantas genéticamente modificadas en miel. Fase II. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. **Informe final SNIB-CONABIO, Proyecto ME007.** 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. En México la superficie de soya (*Glycine max*) cultivada en la Península de Yucatán se ha incrementado sustancialmente en los últimos años. En el mes de febrero de 2012 la compañía Monsanto solicitó la siembra de 60 mil ha sólo en la península de Yucatán. Además, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) informó a inicios del mes de junio de ese 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, que actualmente se encuentra en procedimiento administrativo. Se trata de soya GM SOLUCIÓN FAENA® o Roundup Ready (MON-Ø4Ø32-6) (CIBIOGEM, 2014).

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.

Así mismo, es muy probable que puedan encontrarse secuencias de soya GM en mayores cantidades en las mieles del área, en comparación con los hallazgos de la Fase I del proyecto. Y la consecuencia comercial que atañe de forma grave a los apicultores es que a causa de la detección de polen GM en la miel, baje su precio en los mercados que en Europa demandan miel de Yucatán. El 6 de septiembre de 2011 cambió el estatus del polen contenido en mieles de abeja como consecuencia de una decisión legal promovida por Mr. Karl Heinz Bablok (COURT OF JUSTICE OF THE EUROPEAN UNION. 2011), apicultor alemán del estado de Bayern, ante la corte de Bruselas. A partir de entonces, por decisión del juez, al polen no se le considera como un componente de la miel, sino un ingrediente. Esta sutil diferencia tuvo como consecuencia que a la miel se le considerara dentro de la legislación europea denominada EC No 1830/2003 que indica que los ingredientes de los alimentos que provengan de OGMs requieren de un etiquetado si se encuentran en contenidos superiores al 0.9% (siempre y cuando se trate de un evento de transformación autorizado en Europa para consumo humano REGULATION (EC) No 1830/2003). El hecho de llevar un etiquetado GM en los mercados europeos trae como consecuencia una baja en su precio, ya que los consumidores de ese bloque comercial no aprecian bien los productos GM.

Y ciertamente, en el caso del mercado orgánico al que muchas de estas mieles pueden acceder, habría un rechazo de las mieles mexicanas que contengan residuos de polen GM debido a que las certificadoras orgánicas prohíben por completo el uso de organismos manipulados genéticamente. Esta tolerancia cero

genera afectaciones económicas importantes para los apicultores de la zona de la Península de Yucatán en el comercio de exportación de este producto a Europa.

Hay dos asuntos importantes que atender en este caso. El primero, que ya fue atendido en la Fase I del proyecto, fue conocer la presencia o ausencia de polen en las mieles de Campeche en un primer muestreo llevado a cabo en 2012. En esta Fase I además se implementó una metodología mejorada para la extracción de ADN de buena calidad amplificable del polen residual en muestras de miel, para lo que se generaron los protocolos correspondientes para la extracción de ADN del polen en miel y la extracción de ADN de muestras de polen. Ante los permisos concedidos por la SAGARPA para la siembra de soya GM en la zona, el segundo asunto propuesto fue el monitoreo de las mieles un año después, en relación a la presencia/ausencia y su cuantificación. Lo que se propone hacer en esta Fase II (con muestras de la temporada iniciada en septiembre de 2013 y en 2014, colectadas por Ecosur en el proyecto "Miel y cultivos transgénicos en México: riesgos y precaución. Fase 2") es también conocer el impacto que pueda tener la cercanía a los campos de soya GM, por lo que se conocerá la geolocalización de dichos campos con respecto de la posición de los apiarios.

Es importante mencionar que en el ámbito legal, se han solicitado y concedido amparos de los apicultores ante la siembra de soya GM en la región, por lo que será importante conocer también sus posibles efectos sobre la presencia/ausencia del polen mediante el monitoreo correspondiente. En esta fase se implementará una metodología más sensible para el análisis de pequeñas cantidades de ADN, ya que se sabe que son bajos los niveles encontrados en las mieles colectadas en 2012 y analizadas en la Fase I. Se realizarán los análisis con la metodología de PCR digital, en particular la llamada "droplet digital PCR" (ddPCR) que permite trabajar más rápidamente y con una buena precisión para lograr la cuantificación de cantidades pequeñas de ADN.

Para reiterar: se utilizará la metodología puesta a punto en la Fase I de este proyecto para la extracción de ADN del polen residual en muestras de miel para el monitoreo, la detección y la cuantificación de muestras en tiempos subsecuentes, es decir, de la temporada septiembre-noviembre, 2013 y el inicio de la temporada comercial a inicios de 2014.

El presente proyecto describe la estrategia metodológica, que aplicando los protocolos para la extracción y amplificación del ADN extraído de polen y de polen residual en mieles se desarrolló en la Fase I del proyecto. Primeramente se trata de conocer si existe o no la presencia de polen de soya. Posteriormente conocer si es GM, todo esto en un nuevo muestreo realizado en el proyecto de Ecosur para CONABIO, en 80 muestras de mieles y 80 muestras de polen del estado de Campeche colectadas a partir del mes de septiembre de 2013. Posteriormente se analizarán aproximadamente 30 muestras más de miel y 20 más de polen de la temporada comercial de la producción, en 2014. Se propone utilizar la metodología que se ha montado ya en la Fase I para extraer el ADN del polen hallado como componente residual de las mieles. Una vez extraído el ADN del polen, éste deberá prepararse y amplificarse para poder conocer si las secuencias presentes coinciden con las secuencias GM que son comúnmente encontradas en los OGMs comerciales (p35S y t-nos). Una vez realizado este tamizaje, se buscarán las secuencias que identifiquen soya Solución Faena®, ya que además de las 60 mil Has solicitadas por la empresa Monsanto en 2012, se solicitaron hasta 253,500 Has en la zona de la Península y otros estados (CIBIOGEM, 2014).

Los resultados permitirán conocer si en las muestras de mieles y polen del 2013 e inicios de 2014 existe o no la presencia de secuencias GM, como un primer objetivo, hecho relevante para el caso de la certificación orgánica de las mieles de la zona. 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 alta frecuencia de polen proveniente de cultivos de los alrededores de los apiarios. Debido a que en la Fase I del proyecto se hallaron bajas concentraciones de secuencias de soya GM, se propone en esta segunda fase utilizar la metodología de PCR digital para hacer más sensible la detección.

- 
- \* 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](http://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 II**

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

**Diciembre 2015**

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue la detección y cuantificación de secuencias de polen genéticamente modificado (GM) en miel. Las muestras fueron colectadas en localidades de Campeche en septiembre de 2013 y en febrero de 2014. En la tabla 1 aparecen las localidades de donde provienen las muestras analizadas; adicionalmente, se analizaron muestras de polen de piqueras colectadas en octubre de 2013 por personal de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) en apiarios cercanos a cultivos de soya convencional y soya GM, donde potencialmente pecorean las abejas. El ADN fue extraído del polen usando la guía publicada por el gobierno alemán (Guideline, 2011), y optimizadas en el Laboratorio 312 del Departamento de Alimentos de la Facultad de Química de la UNAM. Los análisis de polen fueron realizados por PCR cuantitativa (qPCR o quantitative PCR por sus siglas en inglés) con el equipo ABI7500. La miel se analizó por PCR digital en nanogotas (ddPCR o droplet digital PCR por sus siglas en inglés) utilizando el equipo BioRad QX200. Los cebadores y las sondas utilizadas tienen secuencias públicas del Joint Research Center (JRC). Se utilizó actina como el gen blanco universal endógeno de planta. Se realizaron reacciones dúplex para la detección de las secuencias P-35S/T-*nos* y para las secuencias especie específica para soya/maíz. Las muestras positivas para secuencias P-35S/T-*nos* fueron analizadas cuantitativamente para los eventos de soya MON04032/MON89788, también en reacción dúplex. En algunos casos se buscó también otro tipo de polen como el de algodón y canola. Aunque las muestras de la temporada de lluvias (septiembre 2013) mostraron la presencia de polen de soya MON04032 en 16 de las 69, los resultados indicaron que las muestras de febrero de 2014 (33 muestras de miel de limpieza) estuvieron libres de polen GM. Además se analizaron 56 muestras de polen de piqueras, para conocer la posible presencia de polen de soya GM. En todas las muestras fueron detectadas cantidades altas de polen de maíz. Los resultados del análisis del polen mostraron un severo aumento comparado a los hallazgos del año 2012 en concentraciones de ADN proveniente de soya GM. Considerando la diversidad de polen que se puede hallar en las mieles multiflorales, como las colectadas en Campeche, se pudo mostrar que la ddPCR permite detectar y cuantificar secuencias GM, aun en proporciones muy bajas, esto es, cuando se encuentra mezclado con una alta cantidad de ADN no-GM. Este método permitió el análisis de secuencias en concentraciones tan bajas como 0.1% (ADN GM/ADN de planta). Los hallazgos de las secuencias GM, que no son aceptadas por las compañías certificadoras para productos orgánicos, comprometen el sobreprecio esperado por más de 10,000 familias que producen y exportan miel orgánica en Campeche (SEMARNATCAM, 2015).

## INTRODUCCIÓN

Entre los cultivos GM de mayor presencia en el mundo se encuentra la soya tolerante a herbicidas. En países como Estados Unidos de Norteamérica, Chile y Argentina se ha reportado la presencia significativa de secuencias genéticamente modificadas (GM) en miel: los laboratorios de la empresa Intertek reportaron en 2012 valores de hasta un 45% en mieles provenientes de esos países (Intertek, 2012). Dichas secuencias se derivan principalmente de la presencia de polen de soya GM, que se encuentra entre los granos de polen de diferentes flores que son un componente natural de la miel. Lo anterior indica que, a pesar de tener poco aroma y néctar, las abejas pecorean en las flores de soya, y de

hecho los agricultores las utilizan para mejorar la producción de grano (Vides y Vandame, 2012; Chiari *et al.*, 2005; Erickson *et al.*, 1978).

En México la producción de miel es de gran importancia económica ya que nuestro país es el tercer productor de miel orgánica en el mundo y son los tres estados de la Península de Yucatán los mayores productores. Además es una labor económicamente importante en las comunidades de la región. Cuarenta mil apicultores de origen indígena viven de esta actividad (Claridades Agropecuarias, 2010; CONABIO, 2011), con más de 10 mil familias sólo en Campeche (SEMARNATCAM, 2014). Los compradores más importantes de esta miel son los países europeos.

Es justamente en la región de la Península de Yucatán que se ha ido incrementando sustancialmente la superficie sembrada de soya GM, desde de los ensayos experimentales iniciados en 2005. A partir de 2007 las superficies autorizadas por SAGARPA, en la región de la Península de Yucatán, fueron de 10,000 hectáreas de soya tolerante al herbicida glifosato, pasando por un importante incremento en 2011 cuando se autorizaron 30 mil. 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 GM 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, 2015a). Específicamente, se trata de permisos de siembra de soya GM Solución Faena® o RoundUp Ready también denominada MON- Ø4Ø32-6 que es la notación de identificador único de la OCDE, y que en este documento se manejará como MON04032.

Debido a estas siembras de soya GM en la región de Yucatán ya algunos importadores alemanes habían mandado analizar muestras de la producción, debido a las reglamentaciones de la Unión Europea y a que en el mercado orgánico no se acepta la presencia de secuencias GM (Organic Market Info, 2013). En nuestro país se presentó en 2013 un acuerdo por el que se dan a conocer los Lineamientos para la Operación Orgánica de las actividades agropecuarias en el marco de la Ley de Productos Orgánicos de 2006. En ambos documentos se indica la prohibición del uso de OGMs. En el artículo 27 de la Ley se indica claramente que “Está prohibido el uso de semillas o material vegetativo procedentes de métodos que son excluidos o de organismos modificados genéticamente o transgénicos, o sus derivados” (Ley de Productos Orgánicos, 2006; Acuerdo para la Ley Productos Orgánicos, 2013). En el año 2012 se hallaron secuencias GM en 10 al 13% de las mieles de la península, como lo expuso Raezke, por lo que en ese año las mieles de alta calidad de la región de la Península de Yucatán corrían el riesgo de perder su certificación orgánica, y fueron rechazadas en el mercado alemán por contener polen de soya GM. Además identificaron residuos de polen del maíz GM denominado T25 (Figura 1), evento de transformación no autorizado en Europa en su momento (Raezke, 2012) y no autorizado para siembra en México, pero sí para consumo, uso y procesamiento en 2007 y como parte de un evento apilado en 2010 (COFEPRIS, 2015). En 2012, debido a una decisión judicial europea (Court of Justice of the European Union, 2011) se consideraba al polen como un ingrediente, no un componente de la miel, lo que hacía aún más astringente a la reglamentación europea ya que el límite máximo de presencia de secuencias GM se restringía al polen total hallado en la miel.

## Annual Report Honey Analysis 2012

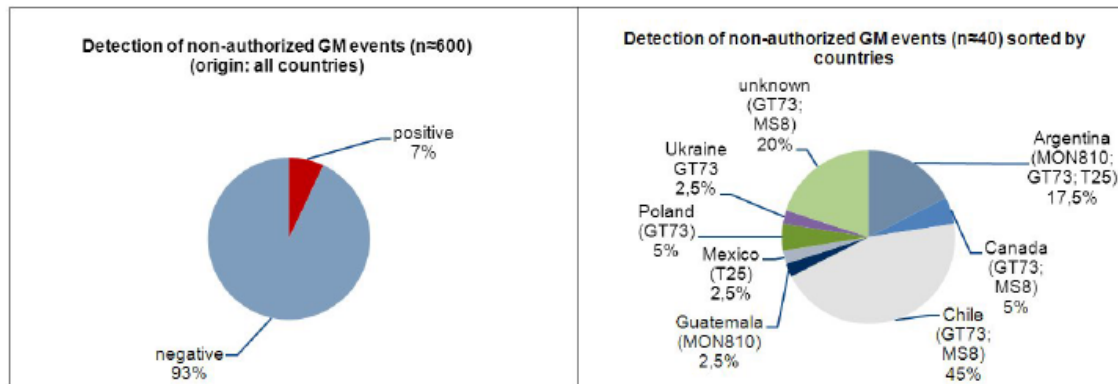


Fig. 10-2: Detection of non-authorized GM events

**Figura 1. Detección de eventos no autorizados en mieles analizadas por la empresa Intertek. Fuente: Informe anual 2012 de (Intertek, 2012).**

Las secuencias GM de soya RoundUp Ready (RR), que es el cultivo transgénico autorizado hasta el año 2013, fueron claramente detectadas en las mieles de esa región (Gálvez *et al.*, 2013 y Villanueva, 2014). Además, por la decisión judicial arriba mencionada, para el mercado europeo de productos convencionales (no orgánicos) en 2012, la concentración crítica de secuencias GM que dispararía el requisito de un etiquetado de OGM era 0.9% en masa de GM en el total del polen, no de la miel, siempre y cuando se tratara de un OGM autorizado en la UE, ya que la tolerancia es cero para el caso de eventos de transformación no autorizados (European Commission, 2003).

El contenido de polen en las mieles es sumamente variable. Puede ir de 0.1 al 0.5% del total de la miel (Vandame, 2015 comunicación personal; Parlamento europeo, 2014a). La cuantificación del polen GM resulta importante ya que la apicultura mexicana hasta hoy en día se encuentra en desventaja en términos de mercadotecnia en el comercio europeo, y a la pérdida del sobreprecio si se trata de miel orgánica, ya que la mera presencia de secuencias GM en el polen implica la pérdida de la certificación que las empresas comercializadoras requieren para acceder al mercado europeo, como ya se mencionó arriba. Así mismo, debería vigilarse que si se encuentran secuencias GM, aunque estén por debajo del 0.9% (del polen o de la miel total), que no pertenezcan a OGMs no autorizados por la UE pues la tolerancia es cero, en este caso también para la miel convencional (European Commission, 2003).

En febrero de 2012, la empresa Monsanto Comercial S.A. de C.V. sometió a la SAGARPA la solicitud de liberación comercial de soya RR de 253,500 ha en regiones de la Península de Yucatán, de la planicie Huasteca y en Chiapas, permiso concedido posteriormente de acuerdo con lo reportado en el sitio web de la CIBIOGEM (CIBIOGEM, 2015a).

En la detección de polen de OGMs en miel de Yucatán se enfrenta el reto de detectarlo en presencia de una gran cantidad de polen diverso, proveniente de las abundantes flores silvestres de la zona, que proporcionan los aromas variados y altamente apreciados característicos de la miel de la región. En los análisis realizados por nuestro laboratorio sobre muestras correspondientes a 2012, recién autorizados los permisos de las enormes superficies citadas, se halló la presencia de una baja concentración, aunque detectable, de soya RR en una de las 56 muestras analizadas. Así mismo se encontró una abundante presencia de polen de maíz no-GM. Estos resultados fueron reportados a la CONABIO y se encuentran disponibles en el Reporte intitulado “Detección de polen de plantas genéticamente modificadas en miel. Fase I” (Gálvez *et al.*, 2013).

En un esfuerzo por conocer la evolución de la presencia de polen GM a través del tiempo, CONABIO y El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) solicitaron al equipo de las Dras. Gálvez y Quirasco se realizaran análisis de muestras del año 2013 y 2014. Para este caso se propuso utilizar la metodología de PCR digital (dPCR) para lograr una cuantificación de la posible presencia de secuencias GM en las muestras colectadas en el proyecto intitulado “Miel y Cultivos Transgénicos en México: Riesgos y Precauciones Fase 2” del Dr. Vandame de Ecosur, colectadas en dos períodos: septiembre – octubre de 2013, que corresponde a la época de crisis de las abejas y en el mes de febrero de 2014, correspondiente a la colecta de miel de limpieza. A pesar de llamarse época de crisis y coincidir con la época de lluvias, siempre hay presencia de flores en las regiones estudiadas. Cuando la soya se encuentra en floración, existe simultáneamente la floración de especies melíferas importantes como el sak káatsim (*Mimosa bahamensis*), el kanasin (*Lonchocarpus rugosus*) y el sak pixoy (*Trema micrantha*) que resultan importantes para el mantenimiento de las colmenas en dicha época de crisis. En febrero las floraciones corresponden a las denominadas tajonal (*Viguiera dentata*) y centenares de especies de las familias de las compuestas, comelinas, verbenáceas, algodones y oréganos silvestres (CONABIO, 2011; CONABIO, 2014).

Como un dato más que aclara el contexto judicial/comercial de la miel de la región, debe recordarse que en 2012 las comunidades mayas de Hopelchén solicitaron un amparo contra la siembra de soya GM en las zonas apícolas de Campeche. La resolución del juez encargado del caso fue conceder el amparo a dos comunidades del municipio de Hopelchén contra el permiso otorgado por la SAGARPA el 6 de junio de 2012 a la empresa Monsanto Comercial S.A. de C.V. que solicitó la siembra comercial de soya RR arriba mencionada, por lo que el estatus de la solicitud se mantuvo “en procedimiento administrativo”. Finalmente, después de casi dos años de litigio se obtuvo el amparo el viernes 7 de marzo de 2014 un mes después de la última colecta realizada en el proyecto “Miel y Cultivos Transgénicos en México: Riesgos y Precauciones Fase 2” de ECOSUR y cuyas muestras fueron entregadas a nuestro laboratorio para su análisis por PCR digital. Es importante mencionar, que a pesar de que la demanda fue presentada sólo por dos comunidades de Hopelchén, al delimitar el alcance de la sentencia, y en una interpretación avanzada de los artículos 1 y 2 de la

Constitución, el juez determinó que los efectos de la misma aplicaban a todos los municipios afectados por el permiso, con lo que quedó cancelada dicha solicitud en todo el estado de Campeche la siembra de soya GM (2000 Agro, 2014).

Finalmente, en su sesión del 15 de enero de 2014, el Parlamento Europeo aclaró su postura respecto del estatus legal que guardaba el polen en la miel, reconsiderando que se trata de un componente de la miel y no un ingrediente, por lo que el umbral del contenido de OGMs que dispararía un etiquetado como OGM es nuevamente de 0.9% con referencia a la miel total y ya no del polen total hallado. La ratificación analizada fue publicada el 3 de junio de 2014 (Parlamento europeo, 2014a). Sin embargo, las reglas del mercado orgánico no se modifican. Sigue siendo rechazada la miel a las que se detecten secuencias GM, y sigue la tolerancia cero para la presencia de secuencias GM no-autorizadas tanto en miel orgánica como en la convencional.

En la Fase I de este proyecto, ya concluida, además de los análisis de la presencia de secuencias GM en el polen residual de muestras de miel del año 2012, se incluyó la implementación y optimización de un método para la extracción apropiada de ADN de calidad amplificable a partir de polen de miel, así como del método para su posterior análisis en búsqueda de OGMs. Se desarrollaron los protocolos experimentales para que CONABIO pudiera contar con la metodología mejorada y realizada en México, para poder ofrecer el servicio a un mayor número de apicultores y a un costo más accesible a comparación de mandar a analizar muestras a empresas extranjeras, para verificar la ausencia de secuencias GM en las mieles de exportación. En esa fase se analizaron mieles muestreadas en la Península de Yucatán, 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 de soya GM, las que fueron incrementándose en superficie en la zona (12 mil ha en 2010 a 30 mil en 2011). El objeto primordial de la Fase I del proyecto era conocer la “línea base” de contenido de polen GM en muestras, en términos de presencia/ausencia. Fue evidente en los resultados de la Fase I, que son bajas las concentraciones de polen de soya (GM o convencional) y de maíz halladas en las mieles, por lo que era necesario buscar metodologías más precisas y que fueran comparables a las utilizadas por las empresas que detectan en Europa la presencia de polen en miel p. ej. Intertek en Alemania.

Una vez sometidos los amparos de Hopelchén, en esta segunda fase del proyecto se planteó la detección de secuencias GM utilizando PCR digital, que es una técnica aún más sensible que la PCR en tiempo real utilizada en la Fase I. Esto se debe a que podrían encontrarse secuencias GM aun en menores proporciones, ya que los permisos sometidos en el 2013, para soya Liberty Link® se encontraban en “procedimiento administrativo” y durante todo el año 2014 no se concedieron permisos en la zona de Campeche o de la Península de Yucatán, de acuerdo con lo reportado en el sitio web de CIBIOGEM (CIBIOGEM, 2015b). Es importante mencionar que las cantidades disponibles para los análisis fueron pequeñas debido a la serie de huracanes que incrementaron fuertemente las lluvias en septiembre y octubre de 2013, por lo que con mayor razón era necesario utilizar la dPCR.



El presente informe reporta los análisis de 69 muestras de miel de 2013 y 33 de 2014, para las cuales se utilizó la metodología implantada en la Fase I del proyecto para la separación del polen y la extracción de su ADN, para su posterior análisis respecto de la presencia de secuencias GM por ddPCR. Además se analizaron las 56 muestras de polen obtenidas de las piqueras de las colmenas en la temporada septiembre-octubre de 2013, en este caso por qPCR, pues sólo se buscaba conocer la presencia/ausencia de secuencias GM. Es importante mencionar que algunas de las muestras proporcionadas por ECOSUR eran duplicados (ver nota en Tabla 7). Se decidió manejar a dichas muestras repetidas como si fueran muestras diferentes, a pesar de que en realidad se tratara de dos muestras tomadas en el mismo apiario o colmena, debido a que se evidenció que no es fácil obtener un muestreo homogéneo por la alta densidad del producto. El conteo original de las muestras de septiembre de ECOSUR podría variar entonces entre 65 y 66 muestras. Así también se propuso estudiar la posible influencia que potencialmente puede ejercer la situación geográfica de los apiarios muestreados, respecto de las distancias a los soyaes y a los maizales más cercanos.

## **MATERIALES Y METODOLOGÍA**

### **Origen de las muestras**

Se analizaron las muestras de miel colectadas por ECOSUR en las temporadas de septiembre-octubre, 2013 y febrero, 2014. Además se analizaron muestras de polen colectadas en septiembre-octubre, 2013. La temporada septiembre-octubre de 2013 correspondió a una época de lluvias complicada debido a la presencia de huracanes en la zona. Cabe aclarar que como no es una temporada de cosecha, sino que es época de crisis para las abejas, se contó con poca cantidad de miel (CONABIO, 2008). Sin embargo, esta época corresponde a la época de floración de la soya, por lo que resultaba importante su análisis para conocer si las abejas ciertamente pecoreaban en las flores de soya, si llevaban polen al panal y si era posible detectar la presencia de secuencias GM en la miel y en el polen colectado directamente de las piqueras.

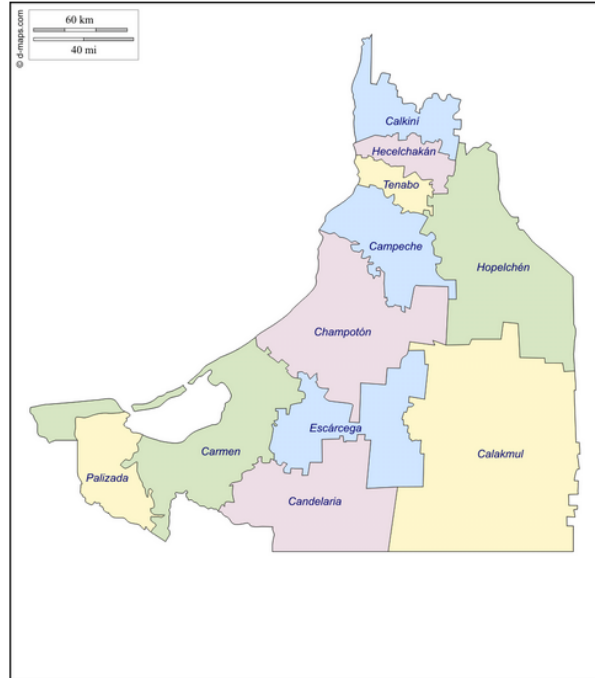
La temporada de febrero, 2014 corresponde al inicio de la temporada de cosecha de miel que se comercializa a mayor escala (CONABIO, 2008), y su análisis era importante para saber si el polen de temporadas anteriores persistía y si era detectable la presencia de secuencias GM.

Las muestras de miel y polen provinieron de las localidades de Campeche que se mencionan a continuación, de acuerdo a lo que fue reportado por ECOSUR (Tabla1).

**Tabla 1. Número de muestras cosechadas por ECOSUR y su localidad de origen.**

<b>Localidad</b>	<b>Número de muestras de miel septiembre - octubre 2013</b>	<b>Número de muestras de polen septiembre - octubre 2013</b>	<b>Número de muestras de miel febrero 2014</b>
Las Flores	9	-	-
Sahcabchén	4	-	1
Ich-Ek	23	15	10
Chencoh	15	8	8
Suc-Tuc	3	8	3
Komchén	6	9	3
Hopelchén	4	7	3
Chaka	5	-	-
Dzibalchén	-	7	2
Pac-Chen	-	-	3
Desconocida	-	2	-
<b>TOTAL</b>	<b>69</b>	<b>56</b>	<b>33</b>

En la Tabla 9, en la sección de resultados y discusión, se anotan las correspondencias entre las localidades donde se tomaron muestras de miel y de polen y se especifica el número de apiario. Así mismo, en la Tabla 11 se detalla el número de apiario y la localidad de cada muestra de miel colectada en 2014. De acuerdo al mapa de Campeche, los apiarios muestreados se localizan principalmente en el noreste del estado (Figura 2).



**Figura 2. Mapa del estado de Campeche y sus municipios.**

Fuente: Campeche mapa gratuito, 2014.

## Procesamiento de muestras

### Miel

Las muestras de miel presentaron pesos entre 75 y 132 g, lo que permitió realizar dos extracciones de ADN independientes para la mayoría de ellas, aunque hubo casos en que sólo se logró hacer una extracción (p. ej. muestra 4). Se siguió el protocolo reportado en la Fase I de este proyecto (Gálvez *et al.*, 2013). En resumen, se separan las impurezas de la miel líquida (en esta ocasión se eliminaron los sólidos presentes en la miel de forma manual debido a la poca cantidad de muestra recibida). La miel se calienta para poder homogeneizarla y separar, en lo posible, dos lotes de 50 g que se dividen en cuatro submuestras de 12.5 g cada una. Se diluye con agua destilada y se centrifuga para recuperar el pellet de polen que posteriormente se lisa con el equipo de disrupción TissueLyzer II y el kit de extracción de ADN DNeasy *Mericon* Food Kit, de Qiagen. Durante el proceso de extracción las cuatro submuestras se reúnen, de tal forma que se termina con el ADN de los dos lotes de miel. De esta forma se cuenta con dos extracciones independientes, que se analizan posteriormente de manera separada. La suspensión de ADN obtenida se cuantificó espectrofotométricamente con el equipo EpochTake 3 de Biotek a 260 y 280 nm para determinar la concentración del ADN extraído y conocer su pureza a través del cálculo de la relación de absorbancias, para ser analizadas posteriormente por PCR digital en nanogotas (droplet digital PCR o ddPCR por sus siglas en inglés).

## Polen

Las muestras de polen recibidas se procesaron siguiendo el mismo protocolo de extracción de ADN, a partir del paso de resuspensión del pellet de polen, se continúa con la lisis y el manejo de muestra indicado en el protocolo. Estas muestras de polen se analizaron por qPCR para conocer la presencia o ausencia de secuencias GM.

## Análisis por qPCR

Se utilizó la química de TaqMan para determinar la cantidad de secuencias del promotor 35S y del terminador *nos*, y se utilizaron además los genes endógenos de soya (*lec* = lectina) y de maíz (*hmg* = high mobility group), para determinar las cantidades de polen de soya y de maíz en las muestras. El gen universal de planta utilizado fue actina.

La qPCR se llevó a cabo en un equipo Applied Biosystems 7500 bajo las siguientes condiciones de reacción (Tablas 2 y 3).

**Tabla 2. Concentración de los componentes para las reacciones de PCR tiempo real.**

Reactivo	Concentración final
Master mix TaqMan®	1X
Cebador F	300nM
Cebador R	300nM
Sonda FAM o VIC	180nM
ADN	20 - 100 ng
Volumen final : 20 µL	

**Tabla 3. 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

Las secuencias para cebadores y sondas utilizados aparecen en la Tabla 4.

**Tabla 4. Descripción de las secuencias de cebadores y sondas utilizados para identificación de genes de referencia y eventos específicos en polen y miel.**

<b>Secuencia blanco</b>	<b>Nombre</b>	<b>Referencia</b>
Promotor <i>35S CaMV</i> ddPCR	Cebador directo 5' GCCTCTGCCGACAGTGGT 3' Cebador reverso 5' AAGACGTGGTTGGAACGTCTT 3' Sonda 5' HEX-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-BHQ 3'	JRC, 2011 <sup>a</sup>
Promotor <i>35S CaMV</i> qPCR	Cebador directo 5' CGTCTTCAAAGCAAGTGGATTG 3' Cebador reverso 5' TCTTGCGAAGGATAGTGGGATT 3' Sonda 5' FAM-TCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCA-TAMRA 3'	JRC, 2011 <sup>b</sup>
Terminador <i>T-nos</i> ddPCR	Cebador directo 5' CAGATCGTTCAAACATTTGGCA 3' Cebador reverso 5' GCACATGCTTAACGTAATTCAACAGA 3' Sonda 5' FAM-ATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGA-BHQ 3'	Este estudio
Terminador <i>T-nos</i> qPCR	Cebador directo 5' CATGTAATGCATGACGTTATTTATG 3' Cebador reverso 5' TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT 3' Sonda 5' FAM-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA 3'	JRC, 2011 <sup>a, c, d</sup>
<i>Mon 04032</i> Roundup Ready® ddPCR	Cebador directo 5' TTCATTCAAATAAGATCATAACATACAGGTT 3' Cebador reverso 5' GGCATTTGTAGGAGCCACCTT 3' Sonda 5' HEX-CCTTTTCCATTTGGG-MGBNFQ 3'	JRC, 2011 <sup>e</sup>
<i>Mon 89788</i> ddPCR	Cebador directo 5' TCCCGCTCTAGCGCTTCAAT 3' Cebador reverso 5' TCGAGCAGGACCTGCAGAA 3' Sonda 5' FAM-CTGAAGGCGGGAAACGACAATCTG-BHQ 3'	JRC, 2011 <sup>f</sup>
<i>hmg</i> High mobility group Maíz - especie ddPCR y qPCR	Cebador directo 5' GCTACATAGGGAGCCTTGTCTT 3' Cebador reverso 5' TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA 3' Sonda 5' FAM-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-TAMRA 3'	JRC, 2011 <sup>g, h</sup>
<i>acc</i> Acetil coenzima A carboxilasa Soya - especie ddPCR	Cebador directo 5' TTCAAGGTGAAGTTCGGGTT 3' Cebador reverso 5' GAATACGACCATGACTCCAAGAATC 3' Sonda 5' HEX-TGAAGGTTGCATCCCAGGTTAGATAATC-BHQ 3'	Este estudio

Secuencia blanco	Nombre	Referencia
<i>lec</i> Lectina Soya – especie qPCR	Cebador directo 5' CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC 3' Cebador reverso 5' GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCC 3' Sonda 5' FAM-CTTCACCTTCTATGCCCTGACAC-TAMRA 3'	JRC, 2011 <sup>i, j, f</sup>
<i>cruA</i> Cruciferina A Canola - especie qPCR	Cebador directo 5' GGCCAGGGTTTCCGTGAT 3' Cebador reverso 5' CCGTCGTTGTAGAACCATTGG 3' Sonda 5' FAM-AGTCCTTATGTGCTCCACTTTCTGGTGCA-BHQ 3'	JRC, 2011 <sup>k, l, m, n</sup>
<i>adhC</i> Alcohol deshidrogenasa C Algodón - especie qPCR	Cebador directo 5' CACATGACTTAGCCCATCTTTGC 3' Cebador reverse 5' CCCACCCTTTTTGGTTTAGC 3' Sonda 5' FAM-TGCAGGTTTTGGTGCCACTGTGAATG-BHQ 3'	JRC, 2011 <sup>o, p</sup>
<i>act</i> Actina de planta ddPCR y qPCR	Cebador directo 5' CAAGCAGCATGAAGATCAAGGT 3' Cebador reverso 5' CACATCTGTTGGAAAGTGCTGAG 3' Sonda 5' FAM-CCTCCAATCCAGACACTGTACTTYCTCTC-BHQ 3'	Laube <i>et al.</i> , 2010

NOTA: Los cebadores y sondas fueron sintetizados por la empresa Integrated DNA Technology (IDT) (Coralville, IA).

## Análisis por ddPCR

Se utilizó el equipo QX200™ Droplet Digital™ PCR system de la marca BioRad. El fundamento de esta técnica es la compartimentalización de la mezcla de reacción de PCR en nanogotas de tal forma que haya un fragmento de ADN por compartimento. Posteriormente se lleva a cabo una amplificación usando la química de TaqMan por lo que se obtiene una señal de fluorescencia en caso de que se encuentre el blanco de amplificación en la nanogota. Enseguida se cuenta el número de gotas totales, las gotas positivas y las negativas, y a través del software propio del equipo (que se basa en un análisis de probabilidad de Poisson) se calcula la concentración en término del número de copias del ADN blanco por microlitro de reacción. Se lleva a cabo la determinación para el transgén y para el gen de referencia, que también fue actina (Tabla 4), para considerar el total de ADN de planta correspondiente al polen. Los transgenes analizados fueron P-35S, T-nos, y los eventos específicos soya RoundUp Ready MON04032 y MON89788, esta última es una soya GM frecuentemente hallada en el mercado internacional, aunque en México no se ha solicitado su autorización, pero se analizó en reacción dúplex en ddPCR con los cebadores disponibles en el laboratorio.

Se eligió utilizar ddPCR debido a que es el método de elección cuando se cuenta con bajas concentraciones del ADN de interés (GM en este caso) en un “background” o trasfondo que cuenta con grandes cantidades de ADN no-blanco (en este caso ADN proveniente de otras plantas cuyo polen también se encuentra en la miel). Esto es de suma importancia cuando la cantidad de ADN para analizar es muy baja, como en este caso. Además la ventaja de este método es que permite cuantificar sin la necesidad de hacer una curva patrón, por lo que en la misma reacción se puede detectar y cuantificar.

Las condiciones de reacción para PCR digital se mencionan a continuación (Tablas 5 y 6).

**Tabla 5. Concentración de los componentes para las reacciones de ddPCR.**

Reactivo	Concentración final
Master mix 2X ddPCR Super Mix Bio-Rad®	1X
Cebador F	909 nM
Cebador R	909 nM
Sonda FAM o VIC	227 nM
ADN	200 - 1000 ng *
Volumen final : 20 µL	

\* Debido a la naturaleza de las muestras no en todos los casos se obtuvo ADN suficiente para utilizar 1000 ng por reacción, pero al menos se utilizó el mínimo de 200 ng. La cantidad de ADN precisa que se utilizó en cada reacción se consideró en los cálculos para las determinaciones cuantitativas.

**Tabla 6. Condiciones de amplificación de ddPCR.**

<b>No. de Ciclos</b>	<b>Condiciones</b>
1 ciclo	95°C, 10 minutos
39 ciclos	94°C, 30 segundos y 60 °C , 1 minuto
1 ciclo	98°C, 10 minutos
1 ciclo	20°C, 1 minuto

### **Estrategia de análisis**

El objetivo de esta segunda fase del proyecto implicó la separación y análisis tanto de polen de soya convencional como de soya GM y polen de maíz que se esperaba fuera convencional, ya que no existen permisos de siembra de maíz GM en la región. De inicio se decidió analizar, la presencia/ausencia de las secuencias del promotor 35S y el terminador *nos* (en reacción dúplex) debido a que son las secuencias presentes en la soya autorizada en la región para siembra comercial (Soya RR).

Así mismo, se detectó la presencia de polen de soya y de maíz, en una reacción dúplex especie-específica.

Finalmente, las muestras que fueron positivas para secuencias GM, que se esperaba fueran de soya RR, se analizaron cuantitativamente con los cebadores y sondas para los eventos GM de soya MON04032 y MON89788. En algunos casos, se buscó la presencia de otras especies GM como algodón o canola que tienen permiso de liberación en el país, como posibles fuentes de secuencias GM, cuando había alguna duda de la cantidad relativa de P-35S y T-*nos*, ambas secuencias presentes en la soya RR.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **La técnica de PCR digital en nanogotas (ddPCR)**

La qPCR o PCR en tiempo real es una técnica ampliamente utilizada para cuantificar ADN dada su alta sensibilidad y precisión. Sin embargo, su uso puede verse limitado seriamente, por un sesgo, si se trata de ADN blanco que se encuentra en baja concentración y/o en un “background” o trasfondo de ADN donde se encuentra un gran número de secuencias que no son blanco de amplificación. También su utilización es frecuente cuando se trata de matrices complejas de alimentos (Sanders *et al.*, 2011).

Para el caso de las muestras de miel, y de acuerdo con los resultados de la Fase I se esperaba obtener cantidades pequeñas de ADN (Gálvez *et al.*, 2013). Además el



trasfondo de ADN del polen de diversas flores y de maíz, se encuentra en grandes cantidades, comparado con las cantidades del polen GM que se espera detectar. Es importante considerar en este punto que las secuencias que se encuentran en la miel provienen de polen, que son células germinales que tienen un genoma haploide, y cuyo estándar (ADN de polen de soya RR) no se encuentra disponible como para realizar curvas estándar. Esta es otra razón por la cual la ddPCR resulta más conveniente.

El fundamento de la técnica de PCR digital (dPCR) es la cuantificación del número absoluto de moléculas blanco presentes en una muestra, realizando diluciones limitantes de la mezcla de reacción de polimerasa en cadena y utilizando la estadística de Poisson. Esta última se basa en una distribución discreta que expresa la probabilidad de que un número dado de eventos ocurran en un intervalo fijo de tiempo, espacio, volumen, etc., si estos eventos suceden en una proporción promedio conocida e independientemente del tiempo transcurrido desde el último evento. Además, para poder aplicarla es necesario contar con al menos un 37% de eventos negativos en el experimento. El equipo QX100 de BioRad produce una nanoemulsión y dentro de cada partícula o nanogota de la emulsión deberá hallarse aproximadamente una molécula de ADN molde. En otras palabras, la mezcla de reacción de la PCR debe diluirse y se distribuye en un gran número de particiones que contendrían teóricamente, cero o una copia del ADN blanco. Una vez llevada a cabo la amplificación, cada partición se detecta con el lector láser de forma que se determina si es positiva para la presencia del producto de PCR "1" o bien si es negativa "0", razón por la cual que se le denomina digital. El número absoluto de moléculas blanco de ADN contenidas en la muestra original, antes de la partición, puede ser calculada directamente de la proporción de positivas en un total de particiones, usando la distribución binomial de Poisson (Morisset *et al.*, 2013; Pinheiro *et al.*, 2012). Para cumplir con la estadística de Poisson, se requiere que al menos un 37% de las nanogotas sean negativas, es decir, donde no exista amplificación. Esto corresponde a un mínimo de 7400 nanogotas negativas que deben encontrarse en cada ensayo de 20,000 nanogotas totales. Además la calidad de la nanoemulsión es sumamente importante: para que la emulsión se considere exitosa deben al menos encontrarse un total de entre 10,000 y 20,000 nanogotas bien formadas. Las nanogotas positivas, negativas y totales se cuentan en el lector láser del equipo utilizando el principio del citómetro de flujo.

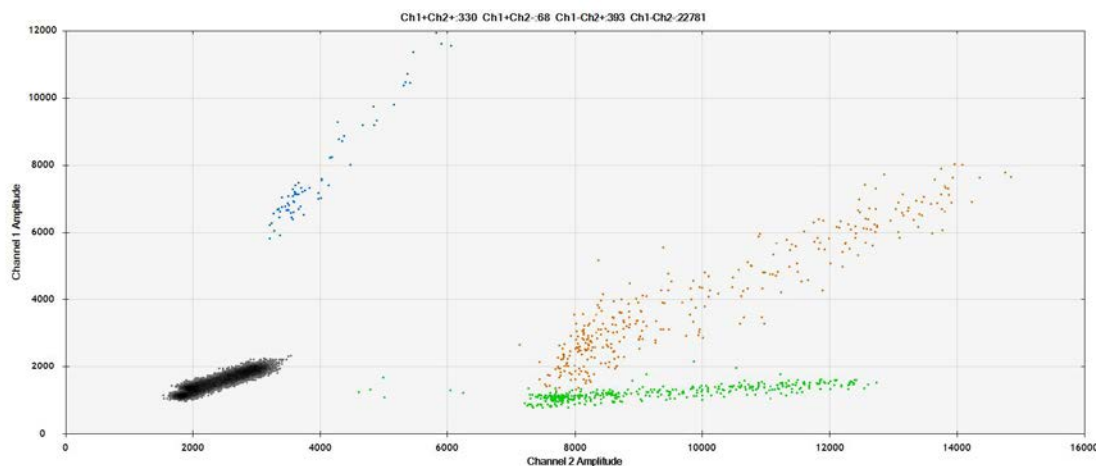
En los experimentos realizados se incluyeron controles positivos (ADN con presencia de los elementos P-35S y T-nos, así como ADN de soya RR) y negativos (reacción sin ADN). De acuerdo a los resultados obtenidos en las condiciones experimentales de ensayo, se estableció que para que una muestra fuera considerada positiva debería mostrar un mínimo de 10 nanogotas con amplificación. Para los experimentos cuantitativos aquí reportados se obtuvieron valores promedio de 12,457 nanogotas totales por ensayo, con 12,406 nanogotas negativas. Por lo anterior se considera que las emulsiones de cada reacción se llevaron a cabo de manera correcta y fueron estables; además de que se cumple con la condición de dilución limitante (al tener más del 37% de compartimentos negativos). Esto último asegura que se tendrá una, o

ninguna, molécula de ADN blanco en cada nanogota, por lo que se puede aplicar la distribución de Poisson para cuantificar la cantidad absoluta de ADN presente en la muestra.

### Muestras de miel de la temporada septiembre-octubre, 2013

Los resultados obtenidos por ddPCR se basaron en la detección de la secuencia del promotor *35S* y del terminador *nos* en reacción dúplex. Ambos elementos presentes en la soya RR son el primer indicador de su presencia y si fuera el caso, podría también ser indicador de la presencia de maíz GM o de cualquier otro evento GM que las contuviera. Sin embargo, en esta Fase no se buscó en específico maíz GM, debido en parte a que existe una enorme variedad de eventos de transformación que han sido autorizados en México para siembras experimentales (ciertamente no en la región de la Península de Yucatán), y no se cuenta con los estándares, ni las secuencias disponibles para realizar el diseño de los cebadores necesarios para poder realizar una buena detección. Por lo tanto en este proyecto los resultados se ciñeron a la detección de soya GM y en específico soya RR que es la que tuvo permisos de siembra a nivel comercial en la región.

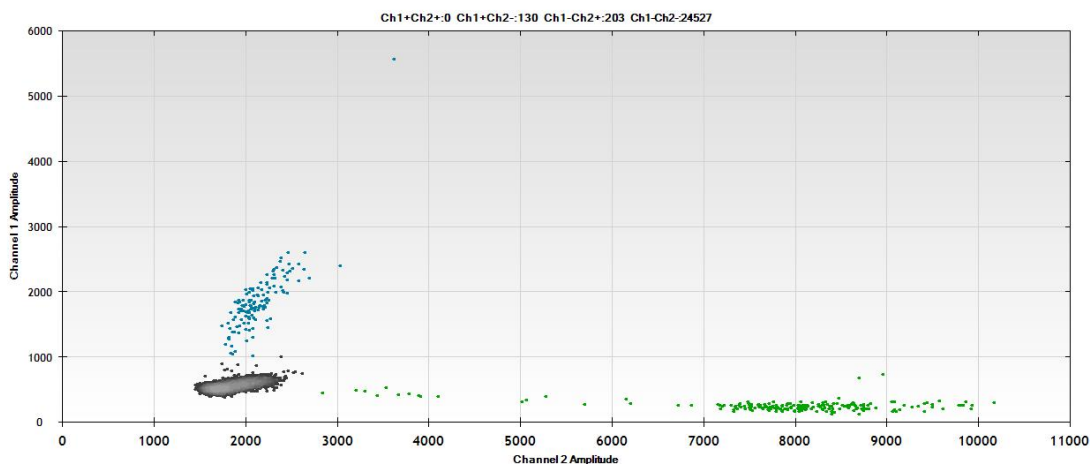
En la Figura 3 se presentan los resultados típicos de un estándar de soya RR positiva al 1% (p/p) en ddPCR. Es positivo para promotor *35S* y terminador *nos*, ambas secuencias determinadas en el equipo QX100™ Droplet Digital™ PCR System de la empresa BioRad. El ensayo del estándar asegura el buen funcionamiento de la técnica.



**Figura 3. Gráfica 2D para un estándar de soya RR 1%, positiva para el promotor *35S* (verde) y terminador *nos* (azul). Cada punto representa un compartimento (nanogota). Los puntos en café son las gotas que contienen ambas secuencias. Los puntos mostrados en negro son las reacciones negativas.**

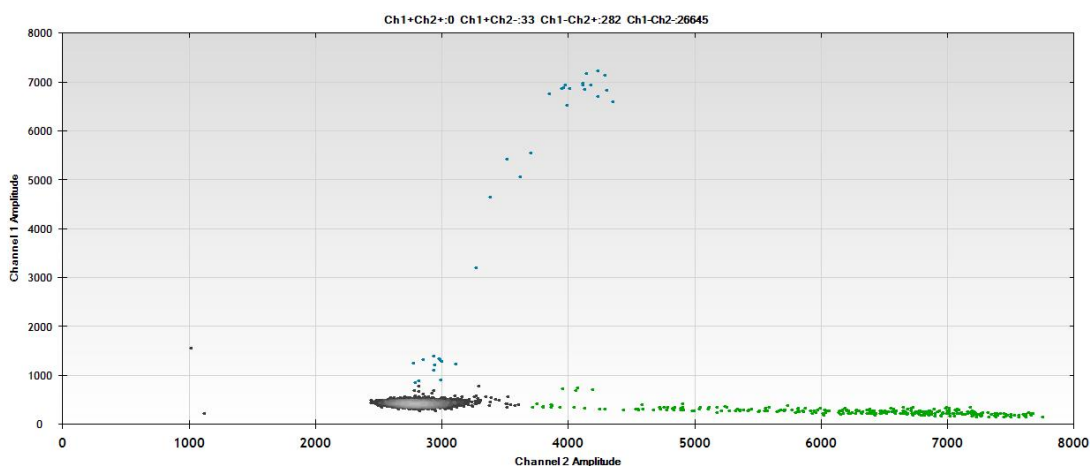
Enseguida se procedió a analizar el ADN extraído del polen de las muestras de miel. En la Figura 4 se presenta, como ejemplo, la determinación de la presencia de

secuencias GM en el polen extraído para la muestra 2 que resultó positiva tanto para el promotor 35S (verde) como para el terminador *nos* (azul). Ver también Tabla 7.



**Figura 4. Análisis de mieles de la cosecha 2013. El ejemplo es de la muestra 2, positiva para promotor 35S (verde) y para terminador *nos* (azul).**

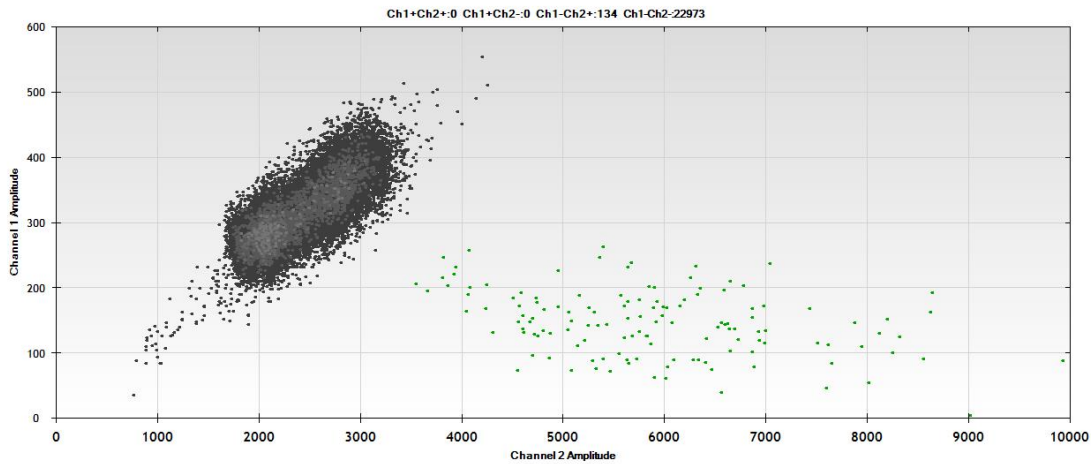
Después de verificar la presencia de secuencias GM, se procedió a buscar la presencia de soya y maíz mediante el uso de secuencias blanco especie específica para dos genes endógenos: el de maíz que es el high mobility group (*hmg*) y el gen de acetil coenzima A carboxilasa (*acc*) de soya. La Figura 5 presenta una gráfica típica, en este caso de la muestra 2 que resultó ser positiva para soya y maíz en el ensayo dúplex (ver Tabla 7).



**Figura 5. Análisis de mieles de la cosecha 2013. El ejemplo es de la muestra 2, positiva para soya (verde) y para maíz (azul).**

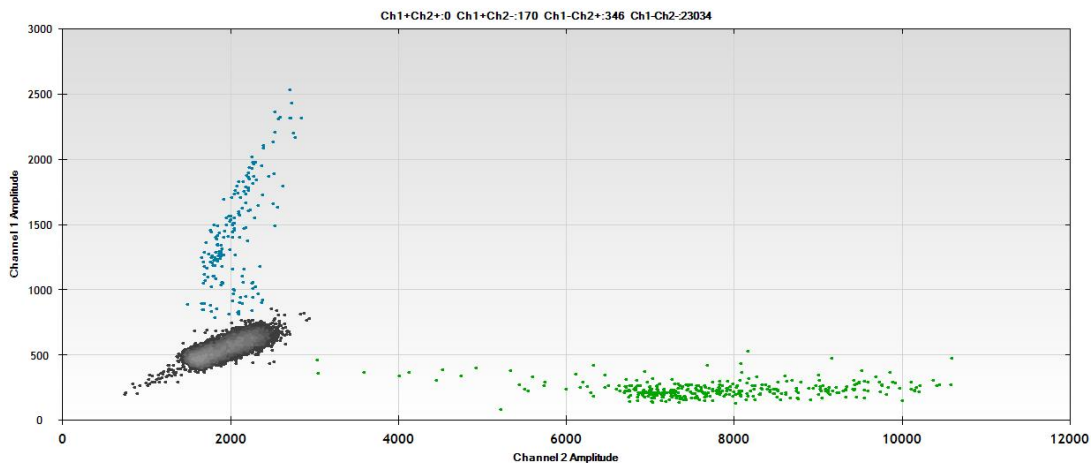
En ella se observan los puntos en verde positivos para soya y en azul positivos para maíz. Una vez hallados elementos GM, y la presencia positiva de soya como especie, se procedió a analizar con secuencias evento específico la posible presencia de dos soyas

GM comerciales: Soya RoundUp Ready evento MON04032 (CERA, 2014a) que contiene el promotor 35S y el terminador *nos*, y la soya evento MON89788 (CERA, 2014b) que solamente contiene el promotor 35S. Los resultados, positivos para soya MON04032 y negativos para soya MON89788 para la misma muestra 2 aparecen en la siguiente figura (Figura 6):



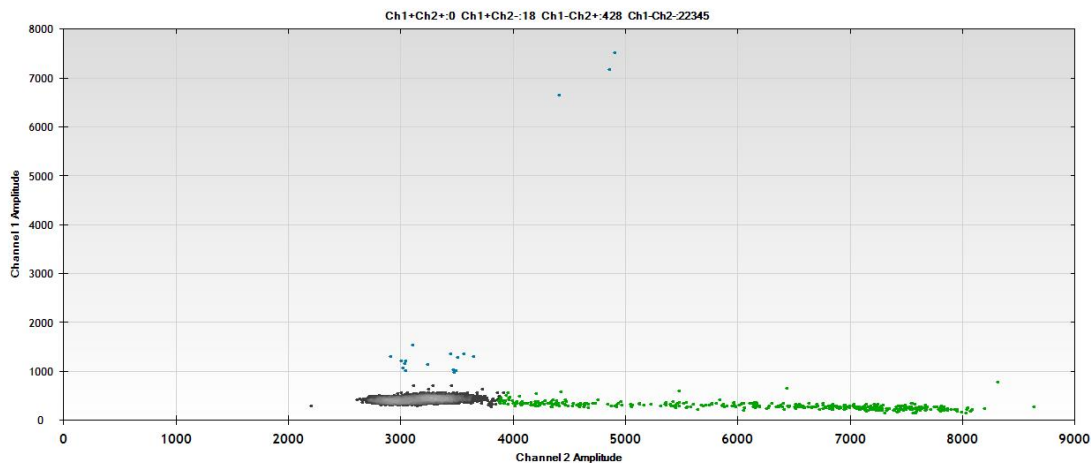
**Figura 6. Análisis de mieles de la cosecha 2013. Muestra 2, positiva para el evento MON04032 (verde) y negativa para el evento MON 89788 (azul).**

Un ejemplo más de las muestras positivas es la número 46 (Figura 7) que mostró presencia de ambos elementos GM: promotor 35S y terminador *nos* en cantidades importantes.



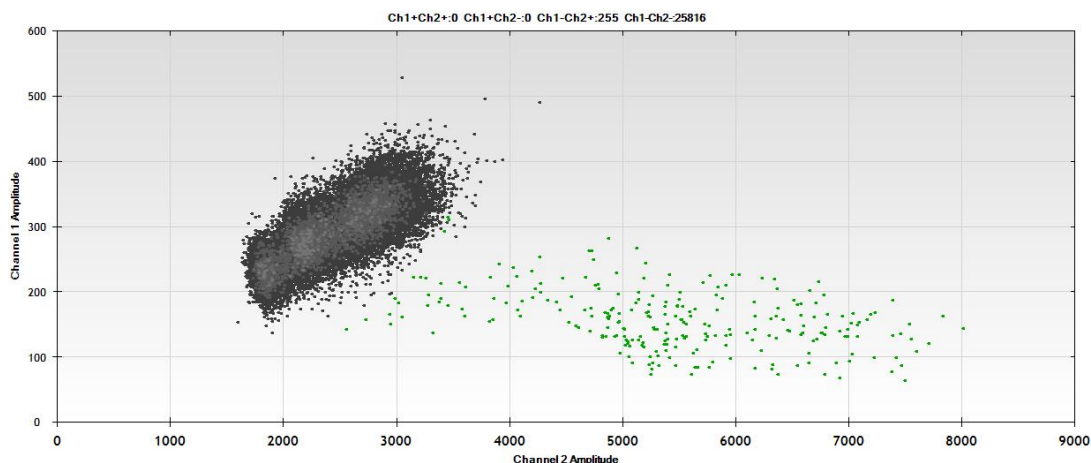
**Figura 7. Análisis de mieles de la cosecha 2013. El ejemplo es de la muestra 46, positiva para promotor 35S (verde) y para terminador *nos* (azul).**

Esta muestra se analizó para conocer si se trataba de soja y/o maíz, y presenta valores positivos para soja en cantidades importantes (pozos en verde), y en menor proporción pozos positivos para maíz (azul) (Figura 8).



**Figura 8. Análisis de mieles de la cosecha 2013. El ejemplo es de la muestra 46, positiva para soja (verde) y para maíz (azul).**

Lo anterior se verificó más adelante con la identificación positiva del evento MON04032 y negativa para soja MON89788 (Figura 9).



**Figura 9. Análisis de mieles de la cosecha 2013. El ejemplo es de la muestra 46, positiva para soya 4032 (verde) y negativa para soya 89788 (azul).**

La totalidad de los resultados para el análisis del polen de 69 muestras de miel colectadas por ECOSUR en la temporada de septiembre-octubre, 2013 aparece en la Tabla 7, donde también se encuentran los resultados de los análisis cuantitativos en el caso de las muestras positivas para soja RR, que se detallan a continuación.

### **Presencia de polen de soya MON04032 en muestras de miel colectada en septiembre-octubre, 2013**

Los datos reportados en esta sección del informe fueron procesados con el software Quanta Soft™ en el equipo ddPCR QX100, para calcular el número de moléculas del evento específico MON04032 y el número correspondiente al gen universal de planta (actina) en el polen separado de la miel. El cociente de ambas cantidades por 100 indicaría el porcentaje de moléculas del evento MON04032 con respecto al total de ADN de planta en el polen. El cálculo se realizó de esa forma porque todavía estaba vigente la decisión europea de considerar al polen como ingrediente. Esto significa que se determinó la cantidad de secuencias GM (correspondientes a moléculas del evento MON04032) en comparación con la cantidad de polen total determinado a través de su análisis con sondas dirigidas al ADN de planta, considerando que el material sólido extraído con el método específico aplicado, corresponde al polen presente de las mieles.

En este muestreo realizado en el mes de septiembre de 2013, se hallaron 16 muestras positivas para soya GM de las 69 muestras analizadas (Tabla 7). Los resultados de las reacciones dúplex de ddPCR indicaron una presencia de soya GM significativamente superior en frecuencia y en cantidades a la hallada en la temporada anterior (2012) en zonas de Campeche (resultados Fase I). Estos resultados corresponden a la época marcada como de crisis para las abejas, ya que es una temporada de fuertes lluvias, que además coincide con la floración de los cultivos de soya. Los resultados muestran que las abejas pecorean también en la soya, ya sea GM o convencional, ya que en esta época del año hay menos recursos florales disponibles para las abejas (Comunicación personal Eric Vides, 2014). Es en esta época de crisis cuando algunos apicultores las alimentan con azúcar y con aislados de soya.

Tabla 7. Análisis presencia/ausencia de secuencias del promotor 35S y terminador nos en muestras de mieles de septiembre-octubre, 2013.

Mtra. No.	Colmena	Apiario	Localidad apiarios	Dist. a soyal más cercano (m)	Dist. a maizal más cercano (m)	Con/ Sin opérculo	P-35S	T-nos	SOYA	MAÍZ	SOYA MON04032	% (moléc. 4032 /moléc. actina)	DS MON 4032	CV MON 4032	SOYA MON89788
1	26	11	Las Flores	500	3300	SIN	+	+	+	+	+	0.86	0.22	25.76	-
2	26	11	Las Flores	500	3300	CON	+	+	+	+	+	2.34	0.40	16.90	-
3	27	11	Las Flores	500	3300	SIN	+	+	+	-	+	0.25	0.06	24.39	-
4	27	11	Las Flores	500	350	CON	+	+	+	-	nd				nd
5	25	10	Las Flores	450	850	CON	+	+	+	-	+	0.79	0.15	19.03	-
6	25	10	Las Flores	450	850	SIN	+	+	+	+	+	0.11	0.02	16.93	-
7	24	9	Sahcabchén	6000	200	CON	-	-	-	+	nd				nd
8	23	9	Sahcabchén	6000	200	CON	-	-	-	+	nd				nd
9	40	17	Ich-Ek	4000	500	CON Y SIN	-	-	-	+	nd				nd
10	23	9	Sahcabchén	6000	200	CON Y SIN	-	-	-	+	nd				nd
11	18	6	Ich-Ek	60	350	CON Y SIN	-	-	-	+	nd				nd
12	24	9	Sahcabchén	6000	200	SIN	-	-	-	+	nd				nd
13	47	23	Chencoh	400	30	CON Y SIN	-	-	-	+	nd				nd
14	96	42	Suc-Tuc	1700	200	CON	-	-	-	-	nd				nd
15	70	32	Komchén	1800	370	SIN	-	-	-	-	nd				nd
16	4	2	Komchén	3500	250	SIN	-	-	-	+	nd				nd
17	67	30	Chencoh	130	50	CON Y SIN	-	-	-	+	nd				nd
18	3	2	Komchén	3500	250	SIN	-	-	-	+	nd				nd
19	88	39	Ich-Ek	1600	1000	CON Y SIN	-	-	-	+	nd				nd
20	50	24	Hopelchén	100	900	SIN	-	-	-	-	-				-
21	77	34	Ich-Ek	350	1200	SIN	-	-	-	-	nd				nd
22	76	34	Ich-Ek	350	1200	SIN	-	-	+	-	-				-
23	30	13	Las Flores	50	3600	SIN	+	+	+	-	+	0.64	0.04	6.06	-
24	30	13	Las Flores	50	3600	CON	-	-	-	-	nd				nd
25	44	21	Suc-Tuc	500	350	CON	-	-	-	-	nd				nd

Mtra. No.	Col - mena	Apia_rio	Localidad apiarios	Dist. a soyal más cercano (m)	Dist. a maizal más cercano (m)	Con/ Sin opérculo	P-35S	T-nos	SOYA	MAÍZ	SOYA MON04032	% (moléc. 4032 /moléc. actina)	DS MON 4032	CV MON 4032	SOYA MON89788
26	33	14	Chencoh	300	4800	CON Y SIN	+	+	+	-	+	2.12	0.06	2.90	-
27	32	14	Chaka	300	4700	SIN	-	-	+	-	-				-
28	77	34	Ich-Ek	350	1200	CON	-	-	-	+	nd				nd
29	30	13	Las Flores	50	3600	CON	-	-	+	-	-				-
30	73	33	Ich-Ek	200	1000	CON	-	-	+	-	-				-
31	45	21	Suc-Tuc	500	350	SIN	-	-	-	-	nd				nd
32	73	33	Ich-Ek	200	1000	SIN	-	-	-	-	-				-
33	31	14	Chaka	300	4800	CON	-	-	+	-	-				-
34	75	33	Ich-Ek	200	1000	SIN	-	-	-	-	nd				nd
35	33	14	Chaka	300	4800	CON Y SIN	+	+	+	-	+	4.41	0.16	3.53	-
36	33	14	Chaka	300	4800	CON Y SIN	-	-	-	-	nd				nd
37	29	13	Chencoh	50	3600	CON	+	+	+	-	+	1.25	0.38	30.77	-
38	87	38	Ich-Ek	1600	1200	CON Y SIN	-	-	-	-	nd				nd
39	74	33	Ich-Ek	200	1000	SIN	-	-	-	-	nd				nd
40	75	33	Ich-Ek	200	1000	SIN	-	-	+	-	-				-
41	33	14	Chaka	300	4800	CON Y SIN	+	-	+	-	+	0.45	0.16	35.77	-
42	29	13	Chencoh	50	3600	CON	+	-	+	-	-				-
43	8	3	Chencoh	200	4400	SIN	+	+	+	-	+	1.80	0.98	54.71	-
44	69	31	Chencoh	200	1300	SIN DATO	-	-	-	-	nd				nd
45	46	22	Chencoh	100	>6000	SIN DATO	+	-	+	+	+	0.87	0.37	42.82	-
46	9	3	Chencoh	200	4400	SIN	+	+	+	-	+	4.33	2.84	65.60	-
47	38	17	Ich-Ek	4000	500	CON	-	-	-	+	nd				nd
48	39	16	Ich-Ek	1650	300	CON Y SIN	-	-	-	+	nd				nd
49	86	37	Ich-Ek	1200	500	CON Y SIN	-	-	-	-	nd				nd
50	2	1	Komchén	900	60	CON	-	-	-	+	nd				nd
51	16	6	Ich-Ek	60	350	CON Y SIN	-	-	-	+	nd				nd
52	84	37	Ich-Ek	1200	500	CON Y SIN	-	-	-	-	nd				nd
53	85	39	Ich-Ek	1600	1000	CON Y SIN	-	-	-	-	nd				nd
54	29	13	Chencoh	50	3600	SIN	+	+	+	+	+	1.49	0.72	48.32	-
55	61	25	Hopelchén	150	3000	CON Y SIN	-	-	-	+	nd				nd
56	2	1	Komchén	900	60	SIN	-	-	+	-	-				-
57	83	38	Ich-Ek	1600	1200	SIN	-	-	-	+	nd				nd



Mtra. No.	Col - mena	Apiario	Localidad apiarios	Dist. a soyal más cercano (m)	Dist. a maizal más cercano (m)	Con/ Sin opérculo	P-35S	T-nos	SOYA	MAÍZ	SOYA MON04032	% (moléc. 4032 /moléc. actina)	DS MON 4032	CV MON 4032	SOYA MON89788
58	82	37	Ich-Ek	1200	500	CON Y SIN	-	-	-	+	nd				nd
59	60	25	Hopelchén	150	3000	CON Y SIN	-	-	-	-	nd				nd
60	13	4	Chencoh	600	4500	CON Y SIN	+	+	+	-	+	22.86	2.43	10.64	-
61	50	24	Hopelchén	100	900	SIN	-	-	-	-	-				-
62	11	4	Chencoh	600	4500	CON	-	-	-	-	nd				nd
63	10	4	Chencoh	600	4500	CON Y SIN	-	-	-	-	-				-
64	36	16	Ich-Ek	1650	300	CON	-	-	-	+	nd				nd
65	94	41	Chencoh	250	2900	SIN	+	+	+	+	+	0.93	0.04	4.71	-
66	46	22	Chencoh	100	>6000	SIN DATO	-	-	-	+	nd				nd
67	17	6	Ich-Ek	60	350	CON Y SIN	-	-	-	+	nd				nd
68	37	17	Ich-Ek	4000	500	SIN	-	-	-	-	nd				nd
69	1	1	Komchén	900	60	SIN	-	-	-	-	-				-

nd = no determinado debido a que no aplica su uso

DS = Desviación estándar

CV = Coeficiente de variación

Se sombrearon en azul claro las celdas que indican presencia de soya RR (Evento 4032)

**NOTA 1:** Algunas de las muestras proporcionadas por ECOSUR eran duplicados, la muestra 24 = muestra 29, la 26 = 35 y la muestra 37 = 42. A pesar de que en realidad se trataba de dos muestras tomadas en el mismo apiario/colmena, para los propósitos de este reporte se manejaron como si fueran muestras diferentes, ya que se evidenció que el muestreo no siempre resulta homogéneo, y los resultados lo indican.

**NOTA 2:** La muestra 4 resultó con muy poco volumen por lo que no se realizaron más que los análisis de promotor 35S y terminador nos

En algunos casos los resultados indicados en la Tabla 7 son inesperados, por ejemplo la muestra 42 no muestra presencia de *T-nos*, pero sí de *P-35S*. A reserva de comprobarlo, podría tratarse de la soya tolerante al herbicida Liberty Link de la empresa Bayer (A5547-127 o ACS-GM006-4). Es importante mencionar que, de acuerdo con los registros de CIBIOGEM, no se concedieron permisos de siembra de soya MON04032 en 2013 debido a la situación de los amparos promovidos en Campeche (CIBIOGEM, 2015a). Sin embargo, sí fue sometido y concedido un permiso en 2013 de la compañía Bayer para soya tolerante al herbicida Liberty Link evento A5547-127 para siembra experimental de 15 ha en la región apícola de la Península de Yucatán (CIBIOGEM, 2015 a y b).

Mientras se deliberaba el caso de los amparos de Hopelchén en teoría debería haberse suspendido toda siembra de soya GM en la región. Otra evidencia similar se encuentra en los resultados del análisis de polen: hay presencia de MON04032 y señales positivas de *P-35S* en algunos casos, sin la presencia de *T-nos*. Podría tratarse de la soya LL, aunque tendría que comprobarse. Los registros de dichas liberaciones de soya GM y sus áreas autorizadas en la Península de Yucatán se reportan en resumen en la Tabla 8, cuyas fuentes se encuentran en el sitio web de la CIBIOGEM, consultadas en enero y julio de 2015.

**Tabla 8. Resumen liberaciones de soya GM en los últimos nueve años en la Península de Yucatán.**

AÑO	TIPO DE SOYA GM	ESTADOS	ÁREAS CONCEDIDAS	TIPO DE LIBERACIÓN	ESTATUS DE LA AUTORIZACIÓN
2005	SOYA RR	QUINTANA ROO, YUCATÁN	Sin dato	experimental	con permiso de liberación
2006	SOYA RR	CAMPECHE	Sin dato	experimental	con permiso de liberación
2007	SOYA RR	CAMPECHE, QUINTANA ROO, YUCATÁN	10,000 Ha	experimental	con permiso de liberación
2008	SOYA RR	CAMPECHE, QUINTANA ROO, YUCATÁN	16,000 Ha	experimental	con permiso de liberación
2009	SOYA RR	NO EN CAMPECHE	---	---	---
2010	SOYA RR	CAMPECHE, QUINTANA ROO, YUCATÁN	12,000 Ha	piloto	con permiso de liberación
2011	SOYA RR	CAMPECHE, QUINTANA ROO, YUCATÁN	30,000 Ha	piloto	con permiso de liberación
2012	SOYA RR	CAMPECHE, QUINTANA ROO, YUCATÁN y otras regiones de la Huasteca	253,500 Ha	comercial	con permiso de liberación
2013	SOYA LL	CAMPECHE, QUINTANA ROO, YUCATÁN Y CHIAPAS.	15 Ha	experimental	con resolución no favorable: solicitud desechada
2013	SOYA LL	CAMPECHE, QUINTANA ROO, YUCATÁN Y CHIAPAS	15 Ha	experimental	Con permiso de liberación, en procedimiento administrativo: bajo suspensión de conformidad con la medida precautoria ordenada por la instancia judicial federal. <b>En julio 2015 aparece ya sin la nota de que se encuentra en procedimiento y al parecer tiene permiso de liberación del 2013.</b> Modificada en sitio web de CIBIOGEM en abril de 2015.
2014	SOYA LL	PLANICIE HUASTECA	4.8 Ha	experimental	En evaluación de riesgo

Fuente: CIBIOGEM, 2015 a, b, c. Consultadas el 13 de julio de 2015.

RR = RoundUp Ready de la empresa Monsanto y LL = Liberty Link de la empresa Bayer

## **Distancias a soyales y maizales más cercanos**

Un elemento novedoso en esta Fase II es el registro que hizo ECOSUR de la distancia (en metros) a soyales y maizales más cercanos a la localidad donde se encontraban los apiarios y colmenas muestreados en 2013, con el propósito de investigar si las distancias pudieran corresponder a mayores o menores concentraciones de las secuencias halladas (ver Tabla 7).

En la Tabla 7 de mieles colectadas en los meses de septiembre – octubre de 2013, se reportan 16 muestras que presentan polen de soya GM y las distancias hasta los soyales más cercanos varían desde 50 hasta 600 m. Tomando como ejemplos la muestra 6, que presenta la menor concentración de soya RR (0.11 %) y la de mayor concentración (muestra 60 con 22.86 %), las distancias no resultan congruentes: 450 y 600 m respectivamente; es decir que la muestra con mayor concentración de soya RR se encontraba a mayor distancia del soyal más cercano que la muestra con la menor concentración de todas. En los registros con las distancias más cortas hasta el soyal más cercano, es decir 50 m (muestras 23 de Las Flores y 37 de Chencoh), ciertamente se encontró presencia de soya MON04032 (0.64 y 1.25 % respectivamente). Sin embargo la muestra 42 de Chencoh también registrada a 50 m de distancia resultó negativa para soya MON04032. La distancia más larga hasta un soyal fue de 600 m y se presentó allí la máxima concentración de MON04032 (22.86 % en la muestra 60). Estos resultados indican que, debido a los diversos patrones de pecoreo de las abejas, no es posible concluir que por alejados que se encuentren los apiarios de las zonas de siembra de OGMs pueda garantizarse que estén libres de la presencia de polen GM. Además, como se mencionó al inicio de esta sección, de acuerdo con los reportes de SAGARPA y CIBIOGEM (SAGARPA, 2015, CIBIOGEM, 2015 a y b) no se concedieron permisos para la siembra de soya GM en el región de la Península de Yucatán durante el año 2013, pero en los meses de septiembre y octubre, posteriores a las fechas de floración de la soya sí se detectó la presencia de soya MON04032 (Tabla 7).

A pesar de haberse hallado una alta frecuencia de muestras positivas para soya RR (MON04032) en época de crisis (septiembre-octubre, 2013), en el mes de febrero de 2014 se detectó nula presencia de secuencias GM en el polen proveniente de las mieles de limpieza colectadas en ese mes.

## **Análisis de la presencia de polen de maíz convencional**

Las grandes cantidades de polen de maíz halladas en algunas muestras de miel, se deben a la abundante presencia de maizales en las regiones estudiadas de Yucatán. En esta porción del estudio, se evidenció que aun a la máxima distancia registrada a maizales (muestras 45 y 66, provenientes de Chencoh) que resultó ser de aproximadamente 6000 m, se registró la presencia significativa de polen de maíz. Además, aún a cortas distancias de los maizales (60 – 200 m, muestras 56 y 14 respectivamente), no necesariamente se encuentra polen de maíz. Resulta difícil adjudicar entonces la presencia del polen a los campos de cultivo cercanos a los apiarios. Más bien depende del pecoreo de las abejas y que éste presenta patrones muy variables.

## **Análisis de polen de canola y algodón**

Debido a que la intensidad de la señal de 35S con la de soya 4032 (datos no desglosados) no parecía coincidir en todas las muestras, se decidió analizar algunas otras especies GM que pudieron estar presentes. Por lo anterior, para dichas muestras, se realizó una batería de tres análisis especie específicos por qPCR para canola, algodón y maíz. En ellos se encontraron resultados que indicaron la presencia de canola en las muestras de miel 5 y 6. No hay autorizaciones para la liberación de canola GM en la región, por lo que tendrían que realizarse más experimentos para identificar inequívocamente la presencia de canola GM o de otra *Brassica* convencional que pudiera explicar los resultados. En este experimento no se detectó la presencia de polen de algodón en ninguno de los análisis realizados.

La otra posibilidad que explica una señal más pronunciada del P-35S comparada con la señal de T-nos sería por la presencia de soya LL como se mencionó arriba, pero en este proyecto no se realizó ese análisis.

## **Muestras directas de polen de piqueras, 2013**

De esa misma temporada septiembre-octubre, 2013, se analizaron por qPCR muestras del polen obtenido de las piqueras, resultados que indicaron igualmente un severo aumento en concentraciones de ADN proveniente de soya GM en comparación con la miel analizada en 2012 (Tabla 9).

Como se mencionó anteriormente, no es posible hacer una cuantificación de secuencias GM en el polen por qPCR. Esta técnica requiere de la construcción de una curva estándar para poder realizar la determinación relativa. No hay disponible el estándar hecho de polen puro de soya RR para hacer una curva estándar y la cuantificación relativa. Los resultados de las determinaciones por qPCR en este informe están reportados como valores de Ct. El Límite de Detección (LOD) definido para este estudio fue de un valor de Ct de 35.5. Por lo tanto, los resultados de la tabla 9 si presentan un Ct>35.5 se considera estar debajo del límite de detección. Y por lo tanto, a pesar de encontrarse con una amplificación, ésta no es un resultado positivo verdadero, estadísticamente hablando.

Tabla 9. Muestras directas de polen de piqueras, 2013. Valores de Ct obtenidos para 56 muestras por PCR en tiempo real (qPCR). El ADN de cada muestra se analizó contra cebadores específicos para genes endógenos de maíz y de soya.

Muestra	Apiario	Localidad	Correspondencia a miel número	Ct P-35S	Ct T-nos	Ct gen endógeno maíz (hmg)	Ct gen endógeno soya (lec)
Control positivo 1 (Estándar de harina de maíz libre de OGM)				nd	nd	19.95 ± 0.83	nd
Control positivo 2 (Estándar de harina de soya libre de OGM)				nd	nd	nd	18.95 ± 0.54
Control positivo 3 (Estándar de harina de soya OGM 100% para P-35S)				19.23 ± 0.57	23.58 ± 0.10	nd	19.34 ± 0.10
Control positivo 4 (Estándar de harina de maíz OGM 60% para P-35S)				21.06 ± 0.44	nd	20.33 ± 0.19	nd
Control positivo 5 (Harina de polen comercial)				nd	nd	nd	nd
Control positivo 6 (Estándar de harina de soya OGM 100% RoundUpReady®)				20.40 ± 0.18	23.56 ± 0.37	nd	20.48 ± 0.11
Control positivo 7 (ADN de Maíz OGM 100% para NK603)				22.61 ± 0.02	23.91 ± 0.23	21.08 ± 0.01	nd
Polen 1	25	Hopelchén	-	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Polen 2	25	Hopelchén	-	NEGATIVO	NEGATIVO	30.31 ± 0.55	35.34 ± 0.53
Polen 3	6	Ich-Ek	-	NEGATIVO	NEGATIVO	26.41 ± 0.30	31.88 ± 0.24
Polen 4	5	Ich-Ek	-	NEGATIVO	NEGATIVO	24.54 ± 0.54	> LOD 35.78 ± 0.88
Polen 5	26	Hopelchén	-	NEGATIVO	NEGATIVO	23.81 ± 0.29	> LOD (36.34 ± 0.98)
Polen 6	23	Chencoh	-	29.96 ± 0.13	> LOD (35.89 ± 0.41)	30.19 ± 0.25	29.72 ± 0.34
Polen 7	23	Chencoh	-	30.30 ± 0.43	34.60 ± 0.61	29.57 ± 0.14	29.48 ± 0.30
Polen 8	18	Suc-Tuc	-	NEGATIVO	NEGATIVO	29.22 ± 0.09	NEGATIVO
Polen 9	30	Chencoh	-	30.28 ± 0.18	34.77 ± 0.33	30.96 ± 0.42	29.87 ± 0.24
Polen 10	30	Chencoh	-	29.55 ± 0.37	33.83 ± 0.40	30.38 ± 0.31	29.62 ± 0.44

Muestra	Apiario	Localidad	Correspondencia a miel número	Ct P-35S	Ct T-nos	Ct gen endógeno maiz (hmg)	Ct gen endógeno soya (lec)
Polen 11	39	Ich-Ek	-	NEGATIVO	NEGATIVO	26.16 ± 0.4	NEGATIVO
Polen 12	37	Ich-Ek	-	NEGATIVO	NEGATIVO	24.57 ± 0.08	29.99 ± 0.23
Polen 13	41	Chencoh	-	> LOD (37.22±0.283)	NEGATIVO	26.07 ± 0.25	34.32 ± 0.48
Polen 14	18	Suc-Tuc	-	NEGATIVO	NEGATIVO	29.49 ± 0.29	NEGATIVO
Polen 15	17	Ich-Ek	-	NEGATIVO	NEGATIVO	25.02 ± 0.21	NEGATIVO
Polen 16	16	Ich-Ek	<b>48, 64</b>	33.16 ± 0.55	> LOD (38.42 ± 0.47)	23.76 ± 0.23	33.44 ± 0.68
Polen 17	15	Chencoh	-	> LOD (35.75 ± 1.21)	> LOD (37.66 ± 1.10)	26.55 ± 0.55	34.29 ± 0.61
Polen 18	2	Komchén	<b>16, 18</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	27.21 ± 0.13	NEGATIVO
Polen 19	42	Suc-Tuc	<b>14</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	26.08 ± 0.12	NEGATIVO
Polen 20	32	Komchén	<b>15</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	32.36 ± 0.24	NEGATIVO
Polen 21	2	Komchén	<b>16, 18</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	29.12 ± 0.07	NEGATIVO
Polen 22	25	Hopelchén	-	NEGATIVO	NEGATIVO	28.22 ± 5.12	> LOD (37.97±1.8)
Polen 23	16	Ich-Ek	<b>48, 64</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	25.46 ± 0.18	> LOD (36.91 ± 0.77)
Polen 24	SIN DATO	SIN DATO	-	NEGATIVO	NEGATIVO	26.15 ± 0.22	> LOD (35.61 ± 0.77)
Polen 25	SIN DATO	SIN DATO	-	NEGATIVO	NEGATIVO	31.01 ± 0.15	NEGATIVO
Polen 26	6	Ich-Ek	-	NEGATIVO	NEGATIVO	26.39 ± 0.15	> LOD (36.44 ± 0.06)
Polen 27	37	Ich-Ek	-	> LOD (37.92±0.672)	NEGATIVO	27.31 ± 0.16	> LOD (37.49 ± 0.42)
Polen 28	17	Ich-Ek	-	NEGATIVO	NEGATIVO	29.06 ± 0.29	NEGATIVO
Polen 29	38	Ich-Ek	<b>38, 57</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	29.19 ± 0.24	32.14 ± 0.26
Polen 30	12	Ich-Ek	-	33.87 ± 0.67	> LOD (38.54 ± 0.47)	27.78 ± 0.28	34.70 ± 0.50
Polen 31	28	Hopelchén	-	NEGATIVO	NEGATIVO	29.62 ± 0.29	> LOD (38.17 ± 0.45)
Polen 32	16	Ich-Ek	<b>48, 64</b>	NEGATIVO	NEGATIVO	26.32 ± 0.33	34.60 ± 1.28
Polen 33	40	Dzibalchén	-	29.61 ± 0.20	35.23 ± 0.14	31.52 ± 0.26	30.05 ± 0.26
Polen 34	40	Dzibalchén	-	30.91 ± 0.21	35.42 ± 0.60	31.31 ± 0.41	31.43 ± 0.24
Polen 35	7	Dzibalchén	-	31.22 ± 0.39	> LOD (36.50 ± 0.11)	30.54 ± 0.16	30.86 ± 0.12
Polen 36	7	Dzibalchén	-	30.80 ± 0.37	35.25 ± 0.58	31.65 ± 0.56	31.32 ± 0.08

Muestra	Apiario	Localidad	Correspondencia a miel número	Ct P-35S	Ct T-nos	Ct gen endógeno maiz (hmg)	Ct gen endógeno soya (lec)
Polen 37	8	Dzibalchén	-	34.22 ± 0.82	> LOD (39.40 ± 0.41)	32.35 ± 0.29	33.89 ± 0.32
Polen 38	8	Dzibalchén	-	29.41 ± 0.12	35.48 ± 0.32	29.41 ± 0.23	29.89 ± 0.27
Polen 39	27	Hopelchén	-	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Polen 40	1	Komchén	50, 56, 69	NEGATIVO	NEGATIVO	35.28 ± 0.43	NEGATIVO
Polen 41	27	Hopelchén	-	NEGATIVO	NEGATIVO	> LOD (36.45 ± 0.47)	NEGATIVO
Polen 42	42	Suc-Tuc	14	> LOD (35.98 ± 1.01)	NEGATIVO	29.26 ± 0.21	33.89 ± 0.61
Polen 43	36	Suc-Tuc	-	NEGATIVO	NEGATIVO	27.53 ± 0.13	31.14 ± 0.30
Polen 44	1	Komchén	50, 56, 69	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Polen 45	2	Komchén	16, 18	NEGATIVO	NEGATIVO	28.49 ± 0.52	NEGATIVO
Polen 46	2	Komchén	16, 18	NEGATIVO	NEGATIVO	27.15 ± 0.49	NEGATIVO
Polen 47	42	Suc-Tuc	14	NEGATIVO	NEGATIVO	27.82 ± 0.38	NEGATIVO
Polen 48	7	Dzibalchén	-	NEGATIVO	NEGATIVO	29.58 ± 0.18	>LOD (35.52 ± 0.63)
Polen 49	30	Chencoh	-	NEGATIVO	NEGATIVO	33.99 ± 0.54	NEGATIVO
Polen 50	6	Ich-Ek	-	NEGATIVO	NEGATIVO	27.32 ± 0.07	NEGATIVO
Polen 51	5	Ich-Ek	-	NEGATIVO	NEGATIVO	25.92 ± 0.36	33.55 ± 0.79
Polen 52	29	Chencoh	-	35.44 ± 0.22	NEGATIVO	> LOD (36.44 ± 0.13)	> LOD (35.79 ± 1.47)
Polen 53	35	Suc-Tuc	-	NEGATIVO	NEGATIVO	32.42 ± 0.18	NEGATIVO
Polen 54	35	Suc-Tuc	-	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	> LOD (36.545±0.35)
Polen 55	32	Komchén	15	NEGATIVO	NEGATIVO	33.27 ± 0.29	> LOD (37.05±0.071)
Polen 56	1	Komchén	50, 56, 69	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

nd = no determinado debido a que no aplica al caso

NEGATIVO= no hay señal alguna de amplificación

LOD = Ct 35.5

>LOD = Valor de Ct mayor al límite de detección (LOD): a pesar de hallarse amplificación, se considera como un valor negativo.



Para estas muestras directas de polen colectado de las piqueras, la extracción se llevó a cabo de la misma manera que para el polen obtenido de las mieles, y fueron analizadas por PCR en tiempo real (qPCR). Los valores de Ct obtenidos fueron tan bajos como 29.41, Ct para la muestra no. 38. Siete de las 56 muestras contenían los dos elementos de la soya GM, con valores de Ct entre 29.4 y 35.44. Además de las 56 muestras, 49 presentaron cantidades significativas de polen de maíz, con valores de Ct tan bajos como 23.76 (polen 16). Es importante recordar que los valores de Ct indican que las reacciones de amplificación de la PCR se inician más rápidamente porque hay una mayor cantidad de secuencia molde, es decir del OGM que se amplifica, y los valores de Ct resultan además exponenciales.

De las 56 muestras además se hallaron 16 de ellas con polen de soya convencional, con valores de Ct mucho mayores que para el caso del polen de maíz, que fueron de 29.48 a 35.52 ciclos.

En algunas muestras sólo se encontraron valores positivos para P-35S y no para el T-nos, y todas ellas mostraron la presencia tanto de soya como de maíz (Tabla 10).

**Tabla 10. Selección de muestras de polen de piqueras que presentan únicamente la secuencia del P-35S.**

Muestra	Ct P-35S	Ct T-nos	Ct Maíz	Ct Soya
6	29.96	> LOD	30.19	29.72
16	33.16	> LOD	23.76	33.44
30	33.87	> LOD	27.78	34.7
35	31.22	> LOD	30.54	30.86
37	34.22	> LOD	32.35	33.89
52	35.44	NEGATIVO	> LOD	> LOD

Nota: >LOD = Valor de Ct mayor al límite de detección (LOD): a pesar de hallarse amplificación, se considera como un valor negativo.

Se requeriría hacer sobre estas muestras análisis para detectar la soya LL ya que coinciden el P-35S en cantidad con la soya, excepto en la muestra 52 que no presenta ni soya ni maíz.

### **Relación entre distancia a los apiarios/localidades con miel /polen positivos a soya GM.**

A pesar de coincidir algunos de los apiarios donde se colectaron muestras de polen y de miel (Tabla 7 y Tabla 9), no siempre se encuentran valores congruentes de la presencia de secuencias GM, debido probablemente a la dificultad para realizar un muestreo homogéneo, y a que el polen analizado a partir de miel se encuentra diluido en comparación con las muestras de polen colectado directo de las piqueras. Además el polen en miel puede

provenir de actividad de pecoreo en un tiempo distinto que el tiempo cuando se recolecte en las piqueras (Eric Vides, 2014. Comunicación personal). Un ejemplo de lo aquí discutido lo constituye la muestra de polen no. 16 que resultó positiva a soya y se le detectó presencia del promotor 35S, sin embargo la miel de esa misma localidad (muestras 48 y 64) resultaron negativas a estas secuencias por ddPCR.

Las mieles en las que se hallaron secuencias GM en el polen de época de crisis (septiembre – octubre de 2013) y se muestran en la Tabla 7, se colectaron de las siguientes comunidades: Las Flores (muestras 1 a 3, 5, 6 y 23), Chencoh (muestras 26, 37, 43, 45, 46, 54, 60 y 65) y Chaka (muestras 35 y 41).

Para el caso de muestras de polen de 2013 (Tabla 9) donde se hallaron secuencias GM provinieron de la localidad Dzibalchén (muestras 33, 34, 36 y 38) y Chencoh (muestras 7, 9 y 10).

### **Análisis por ddPCR de la colecta de miel de limpieza, febrero 2014**

En la Tabla 11 se reportan los resultados de los análisis realizados sobre 33 muestras de miel de limpieza de la temporada febrero, 2014 de apiarios de Campeche, muestreados por ECOSUR. Los resultados mostrados indican que la miel no presentó presencia de secuencias GM (para el promotor 35S o el terminador *nos*), por lo que no tenía caso realizar los análisis evento específico para las soyas GM MON04032/MON89788

**Tabla 11. Muestras de miel de limpieza de febrero, 2014. Análisis del polen de muestras de miel para determinar presencia/ausencia de secuencias del promotor 35S y terminador *nos*. Se analizaron las muestras por ddPCR con cebadores y sonda especie específicos para soya (gen *acc*), para maíz (gen *hmg*).**

Consecutivo	Mtra. No.	Apiario	Localidad apiarios	P-35S	T- <i>nos</i>	SOYA	MAÍZ
1	2	2	Komchén	-	-	-	+
2	3	1	Komchén	-	-	-	+
3	6	32	Komchén	-	-	-	-
4	7	9	Sahcabchén	-	-	-	+
5	8	13	Chencoh	-	-	-	+
6	13	30	Chencoh	-	-	nd	nd
7	14	17	Ich-Ek	-	-	-	+
8	17	31	Chencoh	-	-	-	+
9	20	24	Hopelchén	-	-	-	+
10	21	34	Ich-Ek	-	-	-	+
11	22	33	Ich-Ek	-	-	-	+
12	23	23	Chencoh	-	-	-	+
13	32	37	s/m 2013 Ich-Ek	-	-	-	+
14	38	38	Ich-Ek	-	-	-	+

Consecutivo	Mtra. No.	Apiario	Localidad apiarios	P-35S	T-nos	SOYA	MAÍZ
15	39	26	s/m 2013 Hopelchén	-	-	-	+
16	43	15	s/m 2013 Chencoh	-	-	-	-
17	47	4	Chencoh	-	-	-	-
18	48	16	s/m 2013 Ich-Ek	-	-	-	-
19	52	6	Ich-Ek	-	-	-	+
20	53	39	Ich-Ek	-	-	nd	nd
21	55	25	Hopelchén	-	-	-	+
22	57	18	s/m 2013 Suc-Tuc	-	-	-	+
23	58	19	s/m 2013 Suc-Tuc	-	-	-	+
24	59	29	s/m 2013 Chencoh	-	-	-	+
25	63	7	s/m 2013 Dzibalchen	-	-	-	+
26	64	5	s/m 2013 Ich-Ek	-	-	-	+
27	65	41	Chencoh	-	-	-	+
28	68	21	Suc-Tuc	-	-	nd	nd
29	72	43	Ich-Ek	-	-	-	-
30	73	44	Pac-chen	-	-	-	+
31	74	45	Pac-chen	-	-	nd	nd
32	75	8	s/m 2013 Dzibalchen	-	-	-	+
33	76	46	Pac-chen	-	-	-	-

nd = no determinado debido a falta de muestra  
s/m 2013 = sin muestra en 2013

En ninguna de las 33 muestras correspondientes al muestreo de febrero de 2014, se encontró la presencia de secuencias GM. Considerando que el análisis se realizó con un método muy sensible (ddPCR), se puede decir con un alto nivel de confianza que dicha miel es apta para ser vendida en el mercado orgánico y/o en el convencional. También se realizó el análisis para la detección especie específica de soya y maíz. Los resultados indican una presencia significativa de polen de maíz, mientras que hubo ausencia de polen de soya.

### **Presencia de polen de maíz en mieles de limpieza de febrero de 2014**

En 23 de las 33 muestras de miel de limpieza analizadas (Tabla 11), se encontró polen de maíz y no se detectaron secuencias de las construcciones más utilizadas (P-35S y T-nos),

por lo que puede decirse que se trata de maíz no-GM. Su presencia se puede explicar debido a que existen maizales de riego cercanos a los apiarios muestreados (Eric Vides, 2015. Comunicación personal). Como ejemplo están las dos figuras siguientes (muestras 14 y 38) donde en azul aparecen los puntos positivos para maíz (azul) determinado por la presencia del gen que codifica para *hmg* (high mobility group) específico de maíz.

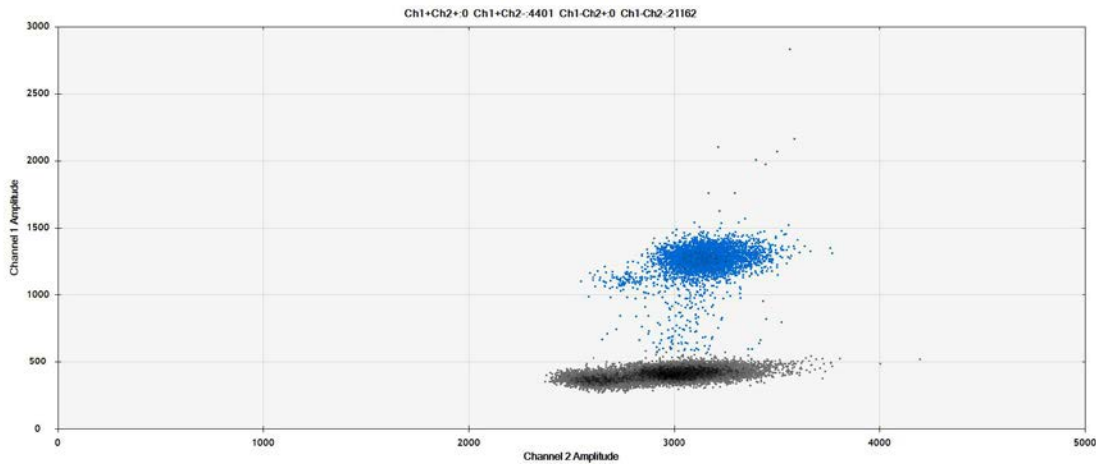


Figura 9. Análisis de mieles de la cosecha 2014. El ejemplo es de la muestra 14, negativa para soya (verde) y positiva para maíz (azul).

La muestra 38, presenta también una abundante señal para polen de maíz.

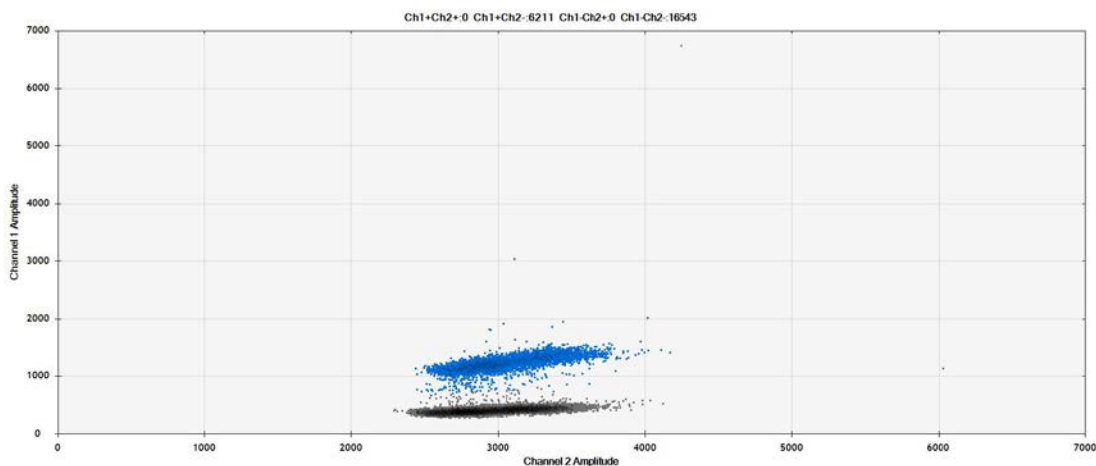


Figura10. Análisis de mieles de la cosecha 2014. El ejemplo es de la muestra 38, negativa para soya (verde) y positiva para maíz (azul).

## **Consideraciones relevantes al caso de la presencia de secuencias transgénicas en mieles de la Península de Yucatán**

### **Presencia de polen de maíz convencional en miel y muestras de polen de piqueras**

La detección de polen de maíz (reacción especie específica) presentó una alta frecuencia: 23/33 muestras de la temporada de limpieza (febrero, 2014) y en la época de crisis de las abejas (septiembre, 2013) se halló en 28 de las 69 muestras de miel analizadas. Las autoras expresan la siguiente preocupación: se vislumbra un problema si se compara el número de eventos de transformación de maíz GM cuya autorización es vigente en México para siembras experimentales, con las autorizaciones concedidas en Europa, que son frecuentemente asíncronas, es decir, que no necesariamente se autorizan al mismo tiempo todos los eventos GM en ambas regiones (EU, 2014). Esto hace pensar que la probabilidad de encontrar polen de maíz GM en miel, si se autorizara su siembra en la Península de Yucatán, sería muy alta lo que impediría prácticamente la posibilidad de venderla en el mercado orgánico. Y por supuesto, si los eventos hallados en la miel no están autorizados en Europa, ese bloque comercial la rechazaría pues la tolerancia en ese caso es cero. Cabe recordar que el maíz es un cultivo de polinización abierta, cuyo polen se dispersa por el viento principalmente (Darrah *et al.*, 2003), aunque polinizadores como las abejas también juegan un importante papel y son la razón por la cual se ha encontrado tal cantidad de polen de maíz en las muestras de miel.

### **Efecto de la introducción de un monocultivo en zonas apícolas con alta biodiversidad**

En la Península de Yucatán, en las zonas donde se siembra soya GM, se cultiva también la soya Huasteca, que es convencional y que presenta buenos rendimientos en la región. Se considera que es capaz de rendir 1,808 kg/ha (INIFAP, 2008). Su polen no causaría problemas para la certificación orgánica de la miel. Sin embargo es importante mencionar que en el paquete tecnológico de ambos cultivos (GM y convencional) se aplican herbicidas en el campo, con el costo ecológico concomitante. El incremento previsto de áreas de cultivo de soya traerá como consecuencia que en el ecosistema, donde habrá residuos de los herbicidas usados, se elimine vegetación silvestre fuente de polen y néctar como son arbustos, árboles, enredaderas y bejucos (CONABIO, 2011). Por lo anterior, sería altamente recomendable realizar estudios caso por caso sobre el efecto de los residuos de herbicidas y plaguicidas utilizados en la agricultura de la zona y, particularmente, el impacto que pudieran tener sobre la vegetación melífera silvestre que es esencial para la buena nutrición de las abejas europeas (*Apis mellífera*) y las abejas meliponas (*Melipona becheeii*) (CONABIO, 2008a).

Entre los nutrimentos de las abejas mejor estudiados se encuentran los carbohidratos y las proteínas (Brodschneider y Crailsheim, 2010). Sin embargo, falta revalorizar otros componentes presentes en el néctar como son las vitaminas, los minerales y otros micronutrimentos encontrados en el polen y el néctar de las diversas flores. De aquí se deduce que entre más variada sea la nutrición de las abejas, como la de cualquier otro organismo, mejores posibilidades hay de contar con todos los elementos primordiales para mantener una buena salud y luchar contra las enfermedades.

En la región de la Península de Yucatán, la diversidad biológica del ambiente en el que pecorean las abejas las provee actualmente de una buena nutrición y, a diferencia de otros sitios, no presentan el Síndrome de Colapso de las Colmenas o Colony Collapse Disorder (CCD), como sí ocurre en los EEUU, Medio Oriente, Japón o Europa donde se reportan pérdidas de 50 % a 90 % de las colmenas de abejas en pocas semanas, lo que se refleja en una repentina desaparición de apiarios (Valdés, 2013). Algunas causas de dicho síndrome, además de la mala nutrición de las abejas, pueden ser el movimiento de colmenas, la dispersión y propagación de plagas y enfermedades que las atacan (Watanabe, 2010), así como los cambios en el hábitat por implementación de prácticas agrícolas, como el uso de ciertos pesticidas. En la Península de Yucatán el ecosistema es diverso y no se practica aun una agricultura extensiva, como se pretende con las autorizaciones que suman 253 mil ha solicitadas y concedidas en 2012 por la autoridades competentes de México. Un profundo estudio sobre la buena nutrición y salud de las colonias apícolas de la Península de Yucatán, aunado al posible impacto de la aplicación de herbicidas y plaguicidas, podría fortalecer la teoría de que una biodiversidad saludable significa buena nutrición y buena salud de las abejas, que aseguran no sólo el modo de vida de los apicultores de la región, sino que dan pie a la toma de decisiones correctas que impacten positivamente la salud de estos importantísimos polinizadores.

La presión al medio ambiente de un monocultivo podría tener efectos graves sobre las poblaciones de abejas. Los cambios en el uso del suelo impulsados por la siembra de soya en la región de la Península se deben a las ventajas conocidas de mejorar el rendimiento de un cultivo si se utilizan polinizadores (Erickson *et al.*, 1978; Garibay *et al.*, 2011). La decisión de sembrar mayores áreas de soya en las planicies de la región de la Península aprovecha a corto plazo la importantísima población de abejas de la región, con consecuencias potencialmente deletéreas a mediano y largo plazo para la biodiversidad de la región y para la apicultura orgánica, como ya se explicó.

## CONCLUSIONES

La cuantificación de polen GM no es posible mediante la utilización de qPCR debido a la ausencia de un estándar apropiado para la determinación cuantitativa que se realizaría mediante la comparación relativa de la señal de fluorescencia de las muestras y del estándar. El polen es una célula germinal y en términos estrictos no se trata de un OGM, por lo que las empresas desarrolladoras no ponen a disposición del público el material germinal (polen GM puro) que se requeriría para realizar la determinación relativa. La opción para superar este escollo es la utilización de la dPCR que es una técnica, como se menciona en el texto de este informe, que realiza una determinación absoluta ya que permite cuantificar directamente la señal fluorescente de moléculas individuales fraccionadas en un gran número de particiones, en este caso en forma de nanogotas, donde la reacción se lleva a cabo de forma individual en cada partición. Esto permite detectar de forma más eficiente las señales positivas y realizar la cuantificación directa, es decir, sin la necesidad de una curva estándar, además de mostrar una mayor sensibilidad que la qPCR.

Los resultados obtenidos por dPCR indicaron en las muestras de miel cosechada en septiembre-octubre, 2013 (época de crisis para las abejas) la presencia de polen de soya MON04032 en 16 de las 69 muestras de mieles analizadas. En contraste, la miel cosechada en el mes de febrero de 2014 se mostró libre de secuencias GM, aun en muestras de los mismos apiarios que resultaron positivos a la presencia de soya GM en el muestreo de 2013. Debe recordarse en este punto que las muestras de este estudio fueron muestras tomadas directamente de los apiarios y las piqueras. Por los objetivos establecidos para este estudio, no se analizaron muestras comerciales de miel o muestras de acopiadores, quienes conjuntan mieles de diversas regiones y de distintos tiempos de colecta. Es decir que las muestras positivas para polen de soya GM bien pueden ser mezcladas en la práctica cotidiana con muestras como las de miel de limpieza que está libre de secuencias GM, por lo que no es fácil de esta forma garantizar, sólo por el manejo, que se preserve su certificación orgánica, es decir, libre de secuencias GM, lo que proporciona en promedio un precio de venta un 30-35 % superior al de la miel no-orgánica (Imagen Agropecuaria, 2009).

Además, se comprobó una alta frecuencia de polen de maíz debido a la abundante siembra de maizales en las regiones rurales de Yucatán. Esta presencia fue también detectada en la miel analizada en el año 2012. Por lo anterior es de vital importancia considerar que, en el dado caso de la autorización de la siembra de maíz GM en la región de la Península de Yucatán, se invalidaría casi en su totalidad la certificación orgánica con la que cuentan las mieles yucatecas, y por ende, el sobreprecio que se consigue se perdería.

Una de las interrogantes a elucidar en este estudio fue la posibilidad de correlacionar la cantidad de polen GM hallada en las muestras y las distancias hacia los soyaes. No fue posible concluir que por alejados que se encuentren los apiarios de las zonas de siembra de OGMs pueda garantizarse que estén libres de la presencia de polen GM. En este estudio se halló la presencia de polen de soya MON 04032, en cantidades del 22% del polen total, en una muestra que se localizaba a 600 m del soyal más cercano; y la muestra con la menor concentración detectada (0.11%) se localizaba a sólo 450 m. Esto puede deberse a los diversos patrones de pecoreo de las abejas y, probablemente también, a los fenómenos meteorológicos del otoño de 2013. Lo anterior indica que las medidas acostumbradas que establecen a qué distancia deben sembrarse los cultivos GM para evitar flujo génico, en el caso de la presencia de abejas, no tienen sentido.

## REFLEXIONES Y RECOMENDACIONES SOBRE EL TEMA.

México es el tercer exportador de miel a nivel mundial. La producción promedio de miel en los últimos ocho años fue de 56 mil 500 toneladas, lo que sitúa al país en el quinto lugar mundial (SAGARPA, 2014). Cuarenta por ciento de la miel nacional se obtiene de Yucatán, Campeche y Quintana Roo, y el 98 por ciento de la miel de la Península se exporta a la Unión Europea (Claridades Agropecuarias, 2010). Alrededor de 43 mil apicultores de origen indígena viven de esta actividad y se tiene el registro de 1.9 millones de colmenas. Las ventas de 2014 de este bien agroalimentario alcanzaron un valor superior a los 123 millones de dólares. El coordinador general de Ganadería, Francisco Gurría Treviño indicó

que esta actividad tiene una gran importancia socioeconómica y ecológica, ya que es considerada como una de las principales actividades pecuarias generadora de divisas. Todos los productos y subproductos que se obtienen de la apicultura generan ingresos directos y fuentes de trabajo para los habitantes del medio rural, añadió (SAGARPA, 2014).

La autorización de granos GM tolerantes a herbicidas en una región con la más abundante actividad apícola obra en contra de los apicultores que no sólo basan su economía en la venta de miel a Europa, sino que pertenecen a sectores menos favorecidos, pero que se sustentan gracias a la miel de exportación. La razón de incluir esta observación se detalla enseguida. En México no existe aún el fenómeno tan frecuente en los EEUU y Europa del Síndrome del Colapso de las Colmenas. La biodiversidad en la zona de Yucatán compuesta por la flora melífera es abundante y provee de buena nutrición a las abejas europeas (*Apis mellifera*) y la abeja sin aguijón llamada melipona (*Melipona beecheii*) nativa de la región. Los residuos de los herbicidas utilizados para el cultivo de la soya tolerante a glifosato o glufosinato quedarían en suelo y cuerpos de agua, posterior a su utilización. Estos podrían movilizarse a zonas donde se encuentra la flora silvestre que alimenta de manera diversa y variada a las abejas en México. Las autoras de este reporte proponen la hipótesis de que el valor nutrimental proporcionado por la biodiversidad ha contribuido a evitar que haya Colapso de las Colmenas en este país, apoyando los hallazgos reportados por Watanabe en 2008 y Brodschneider en 2010, a diferencia de lo que sucede en los EEUU, Medio Oriente y en Europa.

El uso de herbicidas presenta un importante riesgo potencial para la vegetación silvestre de la región. Los herbicidas aplicados a la soya RR, a otros cultivos GM que sean tolerantes, y a la soya convencional que los requiere, matarán a las hierbas presentes en los campos de cultivo que pueden ser melíferas y/o nectaríferas. Además, sus residuos permanecerán en la tierra y podrán migrar, por el viento y las lluvias, a zonas aledañas a esos campos donde, por su clima benéfico y su amplia diversidad crecen cientos de especies de plantas silvestres nativas cuya flora melífera actualmente alimenta a animales polinizadores y a las abejas, ya que por su amplia variedad les proporciona una buena nutrición. Se trata de 849 especies melíferas ya identificadas en la región, que no sólo rinden servicios para los apicultores, sino para la nutrición de otros insectos como hormigas y mariposas, a los que hay que sumar otras especies como pájaros y murciélagos entre otros (Flores Guido, 2010). Por lo tanto, impulsar un monocultivo como el de la soya en una zona como la Península de Yucatán desplazaría a la vegetación melífera nativa poniéndola en riesgo por el uso de los herbicidas que se verterían en cantidades mucho mayores de las que actualmente se utilizan. Es imperioso conservar herbáceas como el tajonal, y centenares de especies más de familias de las compuestas, comelinas, verbenáceas, algodones y oréganos silvestres donde pecorean las abejas (CONABIO, 2011). Estas especies importantes para el mantenimiento de las colmenas se encontrarían ciertamente afectadas si se ponen en contacto con los herbicidas residuales que se aplican en las plantas convencionales o en las plantas GM tolerantes. Las evaluaciones de riesgo que se requieren para conceder los permisos deben considerar al paquete tecnológico completo: cultivo, agroquímico asociado a ese cultivo y sus impactos en el medio ambiente como un todo. Debe crearse la cultura de evaluar los impactos específicos de cada herbicida utilizado en áreas naturales que difieren enormemente de las áreas netamente agrícolas, porque las especies no-blanco del



herbicida no se encuentran directamente bajo el control del manejo del agroquímico. Los herbicidas inevitablemente impactarán a las especies no-blanco, debido a que no son selectivos. La persistencia del herbicida en el suelo y los intervalos de las aplicaciones repetidas son factores clave para determinar los impactos dañinos sobre las plantas nativas. El comprender a fondo la persistencia del herbicida y los tiempos para volver a aplicarlo permitirían generar prescripciones para el manejo que minimicen los efectos a las importantes plantas no-blanco (que además en el caso del Yucatán tiene impactos importantes de carácter socioeconómico). Hoy en día la interfase de la ecología y el manejo de los agroquímicos sigue recibiendo poca atención por parte de quienes usan y venden los agroquímicos y por los mismos investigadores (Crone, E. *et al.* 2009).

La variedad de soya GM, tolerante al herbicida Liberty Link (glufosinato de amonio) impondría al medio ambiente riesgos potenciales similares a los de la Soya RR, puesto que cantidades residuales del herbicida una vez concluida su utilización se estarían acumulando en el medio ambiente donde crece la flora melífera. Así mismo deberían realizarse análisis tendientes a la determinación de la posible presencia de maíz GM, si se generaran datos suficientes que sugirieran que las secuencias halladas de 35S pudieran provenir de maíz. El problema del analizar maíz GM es la enorme cantidad de eventos que se han autorizado para siembras experimentales en México y la falta de disponibilidad de los estándares correspondientes. El maíz GM es la posibilidad que explicara una presencia más marcada de secuencias del promotor 35S, como se mencionó arriba. Otra explicación es la sensibilidad de la prueba del terminador *nos*, que resulta ser menor que la sensibilidad que muestra el promotor 35S, lo que ha sido considerado para redactar las conclusiones de esta fase del proyecto.

Una vez que se ha reconsiderado la postura del juez en Alemania y que se ha regresado al polen a un estatus de componente, y no ingrediente, puede decirse que la miel aunque tenga en su totalidad polen GM nunca requeriría de un etiquetado en Europa como alimento GM puesto que el polen se encuentra en pequeñas concentraciones que van del 0.1 al 0.5% del total de miel. No es probable que se eleve y rebase el 0.9% que es el umbral que desencadena el etiquetado GM (Parlamento europeo, 2014a). Sin embargo la presencia de secuencias GM no es fácilmente aceptada por las compañías certificadoras orgánicas internacionales.

Es imperativo mejorar las condiciones de vida de los apicultores, quienes habitaron la región desde mucho antes de que llegaran las empresas transnacionales que solicitan los permisos de siembra (CIBIOGEM 2015 a, b y c) en esta zona donde las abejas bien pueden mejorar la producción del grano de soya GM ya que es ampliamente conocida su utilización como polinizadores (Erickson, 1978; Chiari *et al.* 2005; Vides y Vandame, 2012). Los apicultores conservan la biodiversidad con su actividad económica, pero hacen faltan alternativas, tanto para promover cultivos amigables con el ambiente regional y para revalorizar a la miel de la Península de Yucatán. Una de ellas sería el poder correlacionar sus características organolépticas con el origen botánico del polen presente en ellas. Esto permitiría diferenciarlas en el mercado lo que podría aumentar su valor agregado. Idealmente este esfuerzo de agregar valor a su producto debería verse reflejado

directamente en el bienestar económico de los apicultores y les ayudaría a conservar la biodiversidad de mejor manera.

Basadas en los estudios existentes y proyectos como el presente, deben echarse a andar acciones que permitan mejorar la cadena de valor de la miel mexicana paralelamente a los estudios del impacto por el cambio de vocación del suelo de la región hacia un cultivo extensivo de soya. El papel de las abejas como polinizadores de toda clase de cultivos no debe minimizarse, pues se pone en riesgo la producción de alimentos en general, no sólo de la miel orgánica de la región de Yucatán.

## REFERENCIAS

2000 AGRO, 2014. Ganan amparo contra Monsanto dos comunidades mayas de Campeche <http://www.2000agro.com.mx/agroindustria/ganan-amparo-contra-monsanto-dos-comunidades-mayas-de-campeche/>

Acuerdo para la Ley Productos Orgánicos, 2013. Cámara de diputados. Diario oficial de la federación. [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5319831&fecha=29/10/2013](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5319831&fecha=29/10/2013)

SEMARNATCAM, 2014. Apicultura  
<http://www.semarnatcam.campeche.gob.mx/apicultura/>

Brodshneider, R. and K. Crailsheim. 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41: 278–294 Available online at <http://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/2010/03/m09120.pdf>

Campeche mapa gratuito, 2014. D-maps.com  
[http://d-maps.com/carte.php?num\\_car=24505&lang=es](http://d-maps.com/carte.php?num_car=24505&lang=es)

CERA, 2014a. GM Crop Data Base. <http://www.ceragmc.org/GmCropDatabaseEvent/GTS%2040-3-2>

CERA, 2014b. GM Crop Data Base. <http://www.ceragmc.org/GmCropDatabaseEvent/MON89788>

CERA, 2014c. GM Crop Data Base. <http://www.ceragmc.org/GmCropDatabaseEvent/A5547-127>

CIBIOGEM, 2015a. Sobre los permisos de liberación concedidos en 2012. <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/solicitudes/permisos-de-liberacion/solicitudes-de-permisos-de-liberacion-2014>

CIBIOGEM, 2015b. Sobre los permisos de liberación concedidos en 2014. <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/solicitudes/permisos-de-liberacion/solicitudes-de-permisos-de-liberacion-2014>

CIBIOGEM, 2015c. Sobre los permisos de liberación concedidos en 2013. <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/solicitudes/permisos-de-liberacion/solicitudes-de-permisos-de-liberacion-2015>

CLARIDADES AGROPECUARIAS, 2010. Exportaciones Mexicanas de miel. No. 199. Marzo.

CHIARI W.C., A. Toledo Vagner de Alencar , M. C. C. Ruvolo-Takasusuki, A. J. Braz de Oliveira, E. Shiguero Sakaguti, V. M. Attencia, F. Martins Costa and M. Hitomi Mitsu. 2005. Pollination of Soybean (*Glycine max* L. Merrill) by Honeybees (*Apis mellifera* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48 (1): 31-36.

COFEPRIS, 2015. Lista de evaluación de inocuidad caso por caso de los organismos genéticamente modificados (OGMS). Comisión federal para la protección contra riesgos sanitarios, COFEPRIS. Secretaría de salud. [http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/sistema\\_nacional/registro/lista-evaluacion-inocuidad.pdf](http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/sistema_nacional/registro/lista-evaluacion-inocuidad.pdf). Consultada en julio 2015.

CONABIO, 2011. Denominación de origen de mieles de la Península de Yucatán. Una propuesta. [http://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/mieles/pdf/PlanRector\\_DenominaOrigenMielesPeninsulaYucatan.pdf](http://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/mieles/pdf/PlanRector_DenominaOrigenMielesPeninsulaYucatan.pdf)

CONABIO, 2008. Mapa de mieles peninsulares y diversidad. [www.biodiversidad.gob.mx/ usos/mieles/mieles\\_peninsulares.html](http://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/mieles/mieles_peninsulares.html)

CONABIO, 2008a. Mieles. Abejas nativas. <http://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/mieles/abejas.html>

COURT OF JUSTICE OF THE EUROPEAN UNION, 2011. Press release No. 79/11. Judgment in Case C-442/09 Karl Heinz Bablok and Others v Freistaat Bayern. Honey and food supplements containing pollen derived from a GMO are foodstuffs produced from GMOs which cannot be marketed without prior authorisation. <http://curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/2011-09/cp110079en.pdf>

CRONE, E., M. Marler and Pearson D.E. 2009. Non-target effects of broadleaf herbicide on a native perennial forb: a demographic framework for assessing and minimizing impacts. *Journal of Applied Ecology*. 46, 673-682 . DOI: 10.1111/j.1365-2664.2009.01635.x

DARRAH, L.L., M.D. McMullen and M.S. Zuber. Breeding, genetics and seed corn production. En: White, P.J. and Johnson, L.A. (Eds.) 2003. CORN: Chemistry and Technology. Second edition. American Association of Cereal Chemists, Inc. Pp. 35-38.

ERICKSON, E. H., G. A. Berger, J. G. Shannon and J. M. Robins. 1978. Honey Bee Pollination Increases Soybean Yields in the Mississippi Delta Region of Arkansas and Missouri. *J. of Entomology* 71:601-603. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jee/71.4.601> 601-603.

European Commission, 2014. EU Register of authorised GMOs: maize.  
[http://ec.europa.eu/food/dyna/gm\\_register/index\\_en.cfm](http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm)

European Commission, 2003. Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. [http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/labelling/Reg\\_1829\\_2003\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/labelling/Reg_1829_2003_en.pdf)

FLORES GUIDO, J.S., 2010. Flora Melífera. En: Durán R. y M. Méndez (Eds). Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán. CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA. 496 pp. Cap. VII, Uso de la flora y fauna silvestre.  
(<http://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap7/05%20Flora%20melifera.pdf>).

GÁLVEZ MARISCAL, A., Peña Montes, C., Quirasco Baruch, M., Estrada Hernández, C.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. <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfKE007.pdf>

GARIBAY, S., P. Gänz, R. Vandame, U. Broecker and S. Bogdanov, 2011. Organic Beekeeping: Opportunities and Risks. En H. and Kilcher, L. (Eds.): *The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2011*. IFOAM, Bonn, & FiBL.

“Guideline on sampling and analysis for the detection of pollen from genetically modified plants in honey”. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Oficina Federal de Protección al Consumidor y de Seguridad Alimentaria Alemana) 2011.

IMAGEN AGROPECUARIA, 2009. Sobreprecio de miel orgánica atractivo para apicultor convencional. <http://imagenagropecuaria.com/2009/sobreprecio-de-miel-orgánica-atractivo-para-apicultor-convencional/>

INIFAP, 2008. Soya Huasteca 400, nueva variedad de soya para el trópico húmedo. <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/489.pdf>

INTERTEK FOOD SERVICE GmbH, 2012. Annual Report 2012 Honey Analysis. Bremen. Germany p. 58

JRC Reference Reports, 2011a. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GM). European Network of GMO Laboratories (ENGL). P. 180  
<https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc-reference-report-2011-publ.pdf>

JRC Reference Reports, 2011b. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GM). European Network of GMO Laboratories (ENGL). P. 154

[https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc\\_reference\\_report\\_2011\\_publ.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc_reference_report_2011_publ.pdf)

JRC Reference Reports, 2011c. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GM). European Network of GMO Laboratories (ENGL). P. 204

[https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc\\_reference\\_report\\_2011\\_publ.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc_reference_report_2011_publ.pdf)

JRC Reference Reports, 2011d. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GM). European Network of GMO Laboratories (ENGL). P. 207

[https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc\\_reference\\_report\\_2011\\_publ.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc_reference_report_2011_publ.pdf)

JRC Reference Reports, 2011e. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GM). European Network of GMO Laboratories (ENGL). P. 103

[https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc\\_reference\\_report\\_2011\\_publ.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc_reference_report_2011_publ.pdf)

JRC Reference Reports, 2011f. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GM). European Network of GMO Laboratories (ENGL). P. 106

[https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc\\_reference\\_report\\_2011\\_publ.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc_reference_report_2011_publ.pdf)

JRC Reference Reports, 2011g. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GM). European Network of GMO Laboratories (ENGL). P. 35

[https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc\\_reference\\_report\\_2011\\_publ.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc_reference_report_2011_publ.pdf)

JRC Reference Reports, 2011h. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GM). European Network of GMO Laboratories (ENGL). P. 55

[https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc\\_reference\\_report\\_2011\\_publ.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc_reference_report_2011_publ.pdf)

JRC Reference Reports, 2011i. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GM). European Network of GMO Laboratories (ENGL). P. 100

[https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc\\_reference\\_report\\_2011\\_publ.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc_reference_report_2011_publ.pdf)

JRC Reference Reports, 2011j. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GM). European Network of GMO Laboratories (ENGL). P. 104

[https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc\\_reference\\_report\\_2011\\_publ.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc_reference_report_2011_publ.pdf)

JRC Reference Reports, 2011k. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GM). European Network of GMO Laboratories (ENGL). P. 134  
[https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc\\_reference\\_report\\_2011\\_publ.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc_reference_report_2011_publ.pdf)

JRC Reference Reports, 2011l. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GM). European Network of GMO Laboratories (ENGL). P. 137  
[https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc\\_reference\\_report\\_2011\\_publ.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc_reference_report_2011_publ.pdf)

JRC Reference Reports, 2011m. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GM). European Network of GMO Laboratories (ENGL). P. 140  
[https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc\\_reference\\_report\\_2011\\_publ.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc_reference_report_2011_publ.pdf)

JRC Reference Reports, 2011n. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GM). European Network of GMO Laboratories (ENGL). P. 143  
[https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc\\_reference\\_report\\_2011\\_publ.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc_reference_report_2011_publ.pdf)

JRC Reference Reports, 2011o. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GM). European Network of GMO Laboratories (ENGL). P. 110  
[https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc\\_reference\\_report\\_2011\\_publ.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc_reference_report_2011_publ.pdf)

JRC Reference Reports, 2011p. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GM). European Network of GMO Laboratories (ENGL). P. 113  
[https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc\\_reference\\_report\\_2011\\_publ.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/gmo-jrc_reference_report_2011_publ.pdf)

LAUBE, I., H. Hird, P. Brodmann, S. Ullmann, M. Schöne-Michling, J. Chisholm, H. Broll. 2010. Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey. Food Chemistry 118: 979–986.

LEY DE PRODUCTOS ORGÁNICOS, 2006. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. Diario Oficial de la Federación. DOF 07-02-2006

MORISSETT, D., D. Stebih, M. Milavec, K. Gruden and Zel, J. 2013. Quantitative Analysis of Food and Feed Samples with Digital PCR. PLOS One. Vol. 8 Issue 5 e62583. Pp. 1-5

ORGANIC MARKET INFO, 2013. Organic beekeepers call for moratorium on genetic engineering in Mexico. [http://www.organic-market.info/web/Know\\_How/Mexico/219/0/0/12207.html](http://www.organic-market.info/web/Know_How/Mexico/219/0/0/12207.html)

PARLAMENTO EUROPEO, 2014a. El Parlamento Europeo aclara el etiquetado de la miel con polen modificado genéticamente. Comisión de Medio Ambiente, Salud Pública y Seguridad

Alimentaria. Comisión Plenaria 15-01-2014-14:25. [http://www.europarl.europa.eu/pdfs/news/expert/infopress/20140110IPR32407/20140110IPR32407\\_es.pdf](http://www.europarl.europa.eu/pdfs/news/expert/infopress/20140110IPR32407/20140110IPR32407_es.pdf)

PARLAMENTO EUROPEO, 2014b. European Parliament legislative resolution of 16 April 2014 on the proposal for a directive of the European Parliament and of the Council amending Council Directive 2001/110/EC relating to honey.

<http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?type=TA&reference=P7-TA-2014-0442&format=XML&language=EN>

PINHEIRO LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J., Hindson BJ, et al. 2012. Evaluation of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification. *Anal. Chem* 83:1003-1011.

PROCESO, 2014. Denuncian siembra ilegal de soya transgénica en Campeche. <http://www.proceso.com.mx/?p=384338>

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

SAGARPA, 2014. Prevé SAGARPA nuevo récord en las exportaciones de miel. México, D.F., lunes 6 de octubre de 2014. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2014B778.aspx#>

SAGARPA, 2015. Estatus General de Solicitudes 2008-2015 <http://www.senasica.gob.mx/?doc=25576>

SANDERS, R., JF Huggett, CA Bushell, S Cowen. DJ Scott & CA Foy. 2011. Evaluation of Digital PCR for Absolute DNA Quantification. *Anal. Chem.*, 83, 6474–6484.

SEMARNATCAM, 2015. Apicultura. Gobierno del Estado de Campeche plan 2015-2022. <http://www.semarnatcam.campeche.gob.mx/apicultura/>

VALDÉS, P., 2013. Situación mundial del Síndrome de Colapso de las Abejas. Agrimundo. Inteligencia Competitiva para el sector Agroalimentario. Reporte no. 2. Agosto, 2013. ([http://www.agrimundo.cl/wp-content/uploads/130826\\_reporte\\_apicultura\\_n22.pdf](http://www.agrimundo.cl/wp-content/uploads/130826_reporte_apicultura_n22.pdf))

VIDES, B. E. y Vandame, R, 2012. 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.

R. VILLANUEVA-GUTIÉRREZ, C. Echazarreta-González, D. W. Roubik and & Y. B. Moguel-Ordóñez. 2014. Transgenic soybean pollen (*Glycine max* L.) in honey from the Yucatán peninsula, Mexico. Nature SCIENTIFIC REPORTS | 4 : 4022 | DOI: 10.1038/srep04022

WATANABE, M., 2008. Colony Collapse Disorder: Many Suspects, No Smoking Gun BioScience 58(5):384-388. doi: <http://dx.doi.org/10.1641/B580503>

### **Anexo 1. Base de datos**

Índice de la base de datos anexa a este reporte en versión Excel:

Hoja 1. Resultados Polen Piqueras 2013.

Hoja 2. Resultados miel 2013.

Hoja 3. Cálculos con Actina miel 2013.

Hoja 4. Resultados miel 2014.