

Informe final* del Proyecto V027
Evaluación de la presencia de transgenes en maíces criollos de Oaxaca y Puebla

Responsable: Dra. Elena Álvarez Buylla
Institución: Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Ecología
Departamento de Ecología Evolutiva
Dirección: Av. Universidad # 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, DF,
04510 , México
Correo electrónico: eaalvarez@biomail.ucsd.edu; abuylla@servidor.unam.mx
Teléfono/Fax: Tel: 5622 9013 Fax: 5616 1976
Fecha de inicio: Septiembre 28, 2001
Fecha de término: Junio 9, 2004
Principales resultados: Informe final
Forma de citar el informe final y otros resultados:** Álvarez Buylla, E. 2004. Evaluación de la presencia de transgenes en maíces criollos de Oaxaca y Puebla. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. V027.** México D. F.

Resumen:

Dado que México es el centro de origen y diversificación temprana del maíz, aunado al hecho de que aquí se encuentran sus parientes silvestres más cercanos (teocintles) es necesario evaluar el impacto que la introducción del maíz transgénico pueda tener en la biodiversidad de variedades de maíz criollo mexicano así como en los agroecosistemas asociados. En este trabajo se evalúan la frecuencia de dos marcadores genéticos presentes en el maíz transgénico: el promotor CaMV35S y el terminador NOS en poblaciones de maíz criollo recolectado en 21 localidades de los estados de Puebla y Oaxaca para cuantificar fenómenos de introgresión y flujo génico.

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

**INFORME FINAL DEL PROYECTO: EVALUACIÓN DE
LA PRESENCIA DE TRANGENES EN MAÍCES
CRIOLLOS DE OAXACA Y PUEBLA.**

11 de Mayo de 2004

**ELENA ALVAREZ-BUYLLA ROCES
LAB. GENÉTICA MOLECULAR, DESARROLLO Y EVOLUCIÓN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
UNAM**

**AP POSTAL 70-275
MÉXICO DF 04510
TEL/FAX: 56229013
E-MAIL: abuylla@servidor.unam.mx**

RESUMEN

Dado que México es el centro de origen y diversificación temprana del maíz, aunado al hecho de que aquí se encuentran sus parientes silvestres más cercanos (teocintles) es necesario evaluar el impacto que la introducción del maíz transgénico pueda tener en la biodiversidad de variedades de maíz criollo mexicano así como en los agroecosistemas asociados. En este trabajo se evalúan la frecuencia de dos marcadores genéticos presentes en el maíz transgénico: el promotor CaMV35S y el terminador NOS en poblaciones de maíz criollo recolectado en 21 localidades de los estados de Puebla y Oaxaca para cuantificar fenómenos de introgresión y flujo génico.

ANTECEDENTES

México está localizado en la región mesoamericana que se considera un centro de origen y diversidad de maíz y de sus parientes silvestres. La variedad de razas de maíz mexicano constituye una riqueza invaluable para México y el mundo entero. Colectivamente las razas diversas de maíz mexicano y sus especies silvestres (*i.e.*, los teocintles) forman potencialmente el recurso de germoplasma de *Zea* más diverso genéticamente en todo el mundo (Senadhira 1976; Hancock 1992). Esta riqueza consiste de 50 razas claramente reconocidas (Sánchez *et al.*, 1993) aunque podría haber 60 o más (Dr. B. Benz, comunicación personal). La gran mayoría de las razas de maíz y de sus especies silvestres se encuentran en México (Bretting y Goodman 1989). Tanto el análisis de isoenzimas (Doebley *et al.*, 1985) como el análisis de características morfológicas (Sánchez y Goodman, 1992; Sánchez *et al.*, 1993) indican que la variabilidad entre razas es significativa. En un estudio reciente (Tenaillon *et al.*, 2001) sobre la diversidad en razas de maíz y maíz mejorado, se observó un promedio de un polimorfismo nucleotídico por cada 104 pares de bases a lo largo de 21 *loci*, indicando que el maíz es el sistema más diverso que se ha estudiado hasta ahora. Esta diversidad es el resultado de una larga historia coevolutiva entre el maíz y las poblaciones humanas de Mesoamérica. La biodiversidad del maíz está íntimamente ligada a una diversidad de tecnologías tradicionales, sistemas de producción asociados a su cultivo, tradiciones culturales que implican al maíz en diversas formas y a los ambientes naturales en que éstas se llevan a cabo (Hernández, 1985; Wellhausen *et al.*, 1952).

La introducción de maíz transgénico para plantaciones semi-comerciales y comerciales en México puede tener impactos negativos importantes en la conservación de las razas de maíz criollo mexicano y en los ambientes en donde se cultivan. El maíz ocupa un lugar preponderante en la producción agrícola de México y en la vida de las poblaciones indígenas y de los agricultores de pequeña escala. A su vez, ellos juegan un papel primordial en las dinámicas espacio-temporales de movimiento de semillas en el territorio nacional y con ello determinan en gran medida la dinámica y distribución de las razas y variedades de maíz (Louette, 1995). El impacto de la introducción de razas transgénicas puede ser directo por contaminación de las razas nativas por los transgenes y también indirecto por los efectos sobre la tecnología tradicional asociada al cultivo del maíz en México. Existe el riesgo de que los transgenes se diseminen en las razas criollas y en los ambientes naturales que circundan los cultivos de maíz por eventos de polinización cruzada entre las variedades transgénicas y las razas criollas y entre las primeras y los parientes silvestres del maíz. Finalmente, los transgenes pueden también afectar otras especies no objeto de la biotecnología. En suma, el efecto tecnológico y de la introgresión por medio de flujo génico puede tener efectos ambientales y sobre la biodiversidad que deben ser analizados y evaluados detallada y objetivamente.

A su vez, es necesaria la implementación de mejores técnicas de análisis molecular para abordar estos fenómenos, así como elaborar un marco conceptual y experimental que permita evaluar los riesgos objetivos de esta tecnología, tanto para el ser humano como para el medio.

OBJETIVOS

Establecer la frecuencia de secuencias provenientes del promotor del mosaico de la coliflor (CaMV35S) y del terminador NOS en granos de maíz colectados en Oaxaca y Puebla. Probar si se expresa la proteína Bt en las hojas de una muestra de las plántulas germinadas mediante pruebas de ELISA. Establecer si existen plántulas de maíz germinadas de los mismos granos que sean resistentes al herbicida BASTA. Identificar mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los individuos que presenten las secuencias de los marcadores genéticos antes mencionados. Utilizar la técnica de hibridación de ADN tipo "*Southern Blot*" para determinar si dichas secuencias están presentes en el genoma de una muestra de granos colectados de varias de las mazorcas estudiadas.

METODOS

Para este fin se elaboraron colectas por la Dra. Sol Ortiz García en 21 localidades de los estados de Oaxaca y Puebla, así como en un centro de distribución de grano y en un mercado. De estas colectas se germinaron semillas individuales para poder medir la frecuencia de eventos de polinización por granos de polen con transgenes de alguna naturaleza. A su vez, se llevaron a cabo extracciones de ADN para cada plántula. Estos ADN's se almacenaron a -70 C para su uso en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) en nuestro laboratorio y en otros laboratorios que comprueben nuestros ensayos. Los análisis de PCR se han realizado con oligonucleótidos derivados de las secuencias del promotor constitutivo (35S) que se usa para expresar los transgenes, de las secuencias del terminador de la Nopalina Sintetaza (3'NOS) utilizado en eventos de transformación por *Agrobacterium tumefaciens*. También se realizaron PCR control para asegurar la calidad del ADN con secuencias de genes ribosomales (16s) y con algunos oligonucleótidos que no deban amplificar y sirvan para controles negativos.

Se realizaron pruebas exhaustivas para establecer las condiciones de PCR que permitieran la amplificación tanto de las secuencias del promotor 35S, como del terminador 3'. Se analizaron granos de un total de 50 mazorcas. De cada mazorca se sembraron un total de 30 semillas. De las plántulas se colectaron 15 y de éstas se extrajo ADN con un protocolo optimizado en el laboratorio. Se analizaron un total de 750 semillas, después de hacer experimentos exhaustivos de PCR para montar las condiciones de amplificación para las secuencias del promotor del 35S y del terminador 3'NOS.

Se germinó una submuestra de las semillas incluidas en los experimentos de PCR y se sometieron a un tratamiento con el herbicida BASTA a una dilución del 0.4%. Esto se hizo empapando un algodón en el herbicida y tallándolo sobre una superficie fija de una de las hojas de la plántula. Se repitió la aplicación sobre la hoja más madura y la más joven. Previamente, se colectó material foliar de todas estas plántulas para extraer ADN y realizar pruebas reactivas de Bt con tiras de ELISA. Para esto se usaron Kits de AGDIA (1. Pathoscreen Kit; BtCry1Ab; PSB05500/0480; \$593,30 2. Pathoscreen Kit; Bt Cry9C; PSB 05600/0488; \$593,30). Estos experimentos están en curso.

Finalmente se están extrayendo ADN's de una submuestra de las plántulas que han resultado positivas y negativas para la resistencia a BASTA y para la prueba de ELISA para por hibridación ADN-ADN tipo *Southern-Blot* probar si se encuentra la presencia de las secuencias transgénicas. Se usará un protocolo estándar de Hibridación.

RESULTADOS OBTENIDOS

***Este es un informe de los resultados que se pudieron obtener con los recursos proporcionados por la CONABIO (el proyecto sigue con otros apoyos)**

En la tabla 1 se adjunta un resumen de los resultados obtenidos durante el desarrollo de este proyecto y en la tabla 2 se resumen los análisis e interpretación de estos datos en conjunto con los datos obtenidos por el Dr. Rafael Rivera del CINVESTAV, Irapuato. En la tercera tabla se muestran los resultados actualizados del laboratorio de la UNAM.

Además de los resultados mostrados, se han realizado hibridaciones tipo Southern blot para otras cinco familias con 20 individuos para cada una. En estos casos no se encontraron positivos con esta técnica.

Tabla 1. Se muestran las familias de semillas recolectadas y el resultado positivo o negativo para la presencia de diferentes proteínas de origen transgénico en diferentes individuos según lo obtenido por pruebas de ELISA, así como su resistencia al herbicida BASTA y la amplificación del promotor 35s en 2 PCR separados. La amplificación del 16s sirve como control de la calidad del DNA usado como templado.

FAM	IND.	RES. BASTA			Cry 9C	Cry1 AB	35S	35-corr	16S		
1	3.1	1			no	NO	NO	negativo	negativo	positivo	
2		2			si	NO	NO	negativo	negativo	positivo	
3		3			no	NO	NO	negativo	negativo	positivo	
4		4			no	NO	NO	negativo	negativo	positivo	
5		5			si	NO	NO	negativo	negativo	positivo	
6		6			si	SI	NO	negativo	negativo	positivo	
7	4.1	1	si	si	si	no ?	NO	NO	negativo	negativo	positivo
8		2	no	no	muerta		NO	NO	negativo	negativo	positivo
9		3	no	no	no	no	NO	NO	negativo	negativo	positivo
10		4	no	no	no		NO	NO	negativo	negativo	positivo
11		5	no	no	no	no	NO	NO		negativo	
12		6	no	muerta	muerta		NO	NO	negativo	negativo	positivo

13	4.2	1				si	NO	NO	negativo negativo positivo
14		2				no	NO	NO	negativo negativo positivo
15		3				si	NO	NO	negativo negativo positivo
16		4				no	NO	NO	negativo negativo positivo
17		5				no	NO	NO	negativo negativo positivo
18		6				no	NO	SI	negativo negativo positivo
19	5.1	1				si	NO	SI	negativo negativo positivo
20		2				si	NO	NO	negativo negativo positivo
21		3				si	NO	NO	negativo negativo positivo
22		4				si	SI	NO	positivo POSITI positivo
23		5				si	NO	SI	positivo POSITI positivo
24		6				si	NO	NO	negativo negativo positivo
25		7				si	NO	NO	negativo negativo positivo
26		8				si	NO	NO	negativo negativo positivo
27		9				si	NO	NO	negativo negativo positivo
28		10				si	SI	NO	negativo POSITI positivo
29		11				si	SI	SI	positivo POSITI positivo
30		12				si	NO	NO	negativo negativo positivo
31		13				si	NO	NO	positivo POSITI positivo
32		14				si	NO	NO	positivo POSITI positivo
33		15				si	SI	NO	negativo negativo negativo
34	5.3	1	no	no	no	no	NO	NO	negativo negativo positivo
34		2	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
35		3	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
36		4	no	no	no	no	NO	NO	negativo negativo positivo
37		5	no	no	no	no	NO	NO	negativo negativo positivo
38		6	no	no	no	no	NO	NO	negativo negativo positivo
39		7				si	NO	NO	negativo
40		8				no	NO	NO	negativo
41		9				si	NO	NO	negativo
42		10				no	NO	NO	negativo
43		11				si	NO	NO	negativo
44		12				si	NO	NO	negativo
45		13				si	SI	NO	negativo
46		14				si	SI	NO	negativo
47		15				si	NO	NO	negativo
48		16				si	SI	NO	negativo
49		17				si	NO	NO	negativo

50		18	si	SI	NO	negativo
51	6.3	1	si	SI	SI	positivo POSITI positivo
52		2	si	NO	NO	negativo negativo positivo
53		3	si	NO	NO	positivo POSITI positivo
54		4	si	NO	NO	negativo negativo positivo
55		6	si	SI	NO	positivo POSITI positivo
56		7	si	NO	NO	negativo negativo positivo
57		8	si	NO	NO	negativo negativo positivo
58		9	si	SI	NO	negativo POSITI positivo
59		10	si	NO	NO	negativo negativo positivo
60		11	si	NO	NO	negativo negativo positivo
61		12	si	SI	NO	positivo negativo positivo
62		13	si	NO	NO	negativo negativo positivo
63		14	si	NO	NO	negativo negativo positivo
64		15	si	SI	NO	positivo POSITI positivo
65		16	no	NO	SI	positivo POSITI positivo
66		17	no	SI	NO	positivo negativo positivo
67		18	no	NO	NO	negativo negativo positivo
68		19	si	NO	NO	negativo negativo positivo
69		20	si	NO	NO	negativo negativo positivo
70		21	si	NO	NO	negativo negativo positivo
71	7.1	1	si	NO	NO	negativo negativo positivo
72		2	si	NO	NO	negativo negativo positivo
73		3	si	NO	NO	negativo negativo positivo
74		4	si	NO	NO	negativo negativo positivo
75		5	si	NO	NO	negativo negativo positivo
76		6	si	NO	NO	negativo negativo positivo
77		7	si	NO	NO	negativo negativo positivo
78		8	si	NO	NO	negativo negativo positivo
79		9	si	NO	NO	negativo negativo positivo
80		10	si	NO	NO	negativo negativo positivo
81		11	si	NO	NO	negativo negativo positivo
82		12	si	NO	NO	negativo negativo positivo
83		13	si	NO	NO	negativo negativo positivo
84	7.2	1	si	NO	NO	negativo negativo positivo
85		2	si	NO	NO	POSITI POSITI positivo
86		3	si	NO	NO	negativo negativo positivo
87		4	si	NO	NO	negativo negativo positivo

88		5				si	NO	NO	positivo negativo positivo
89		6				si	NO	NO	positivo negativo positivo
90		7				si	NO	NO	negativo negativo positivo
91		8				si	NO	NO	negativo negativo positivo
92		9				si	NO	NO	negativo negativo positivo
93		10				si	NO	NO	negativo negativo positivo
94		12				si	NO	NO	negativo
95		13				si	NO	NO	POSITIVO? negativo positivo
96		14				si	NO	NO	positiv ? negativo positivo
97		15				si	NO	NO	positivo negativo positivo
98		16				si	NO	NO	negativo negativo positivo
99		17				si	SI	SI	POSITIVO
100	7.5	1	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
101		2	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
102		3	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
103		4	no	no	no		NO	NO	negativo POSITI positivo
104		5	no	no			NO	NO	positivo POSITI positivo
105		6	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
106		7	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
107		8	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
108		9	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
109		10	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
110		11	no	no	no		NO	NO	negativo POSITI positivo
111		12	si	si		no	NO	NO	negativo POSITI positivo
112		13	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
113		14	no	no	no		NO	NO	negativo
114		15	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
115		16	no	no	no		NO	NO	negativo POSITI positivo
116		17	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
117		18	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
118		19	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
119		20	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
120	8.2	1	no	no			NO	NO	negativo negativo positivo
121		2	no	no			NO	NO	positi ? negativo positivo
122		3	si	si	si	si	SI	NO	positivo POSITI positivo
123		5	no	no			NO	NO	negativo negativo positivo
124		6	no	no			NO	NO	negativo negativo positivo
125		7				no	SI	NO	negativo negativo positivo

126		8				si	SI	NO	negativo negativo positivo
127		9				si	NO	NO	negativo negativo positivo
128		10				no	SI	NO	positivo POSITI positivo
129		11				si	NO	NO	negativo negativo positivo
130	9.1	1				si	NO	NO	negativo negativo positivo
131		2				no	NO	NO	negativo negativo positivo
132		3				si	NO	NO	negativo negativo positivo
133		4				si	NO	NO	negativo negativo positivo
134		5				si	NO	NO	negativo negativo positivo
135		6				si	NO	NO	negativo
136	9.3	1	no	no			NO	NO	negativo negativo positivo
137		2	no	no			NO	NO	negativo negativo positivo
138		4	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
139	10.1	1	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
140		2	si	si	si		NO	NO	negativo negativo positivo
141		3	si	si	si		NO	NO	negativo negativo positivo
142		4	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
143		5	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
144		6	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
145		7	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
146		8	no	no	no		SI	NO	negativo
147		9	no	no	no		SI	NO	POSITI POSITI positivo
148		10	no	no	no		SI	NO	POSITI POSITI positivo
149		11	no	no	no		SI	NO	negativo
150		12	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
151		13	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
152		14	no	no	no		NO	NO	negativo
153		15	no	no	no		NO	NO	negativo
154	10.3	1				si	NO	NO	negativo negativo positivo
155		2				si	NO	NO	negativo negativo positivo
156		3				si	SI	NO	negativo POSITI positivo
157		4				si	NO	SI	negativo POSITI positivo
158		5				si	NO	NO	negativo negativo positivo
159		6				si	NO	NO	negativo negativo positivo
160		7				si	NO	NO	negativo negativo positivo
161		8				si	NO	NO	negativo negativo positivo
162		9				si	NO	NO	NEGAT negativo positivo
163		10				si	NO	NO	NEGAT negativo positivo

164		11				si	NO	NO	negativo negativo positivo
165		12				si	NO	NO	negativo negativo positivo
166		13				si			
167	11.1	1	si	si	si	si	NO	NO	negativo negativo positivo
168		2	si	si	si		NO	NO	negativo negativo positivo
169		3	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
170		4	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
171		5	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
172		6	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
173		7	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
174		8	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
175		9	no	no	no		NO	NO	positi ? negativo positivo
176		11	no	no	no		NO	NO	positi negativo positivo
177		12	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
178		13	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
179		14	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
180		15				si	SI	NO	positi ? POSITI positivo
181		16				no	NO	NO	negativo negativo positivo
182		17				no	NO	NO	negativo negativo positivo
183		18				no	NO	NO	negativo negativo positivo
184		19				no	NO	NO	negativo negativo positivo
185		20				no	SI	NO	positi ? POSITI positivo
186		21				no	NO	NO	negativo negativo positivo
187		22					NO	NO	negativo
188		23				si	NO	NO	negativo negativo positivo
189		24				si	NO	NO	negativo negativo positivo
190		25				si	NO	NO	negativo negativo positivo
191		26				si	SI	NO	negativo POSITI positivo
192		27				si	NO	SI	positivo POSITI positivo
193		28				si	NO	NO	negativo negativo positivo
194		29				no	NO	NO	negativo negativo positivo
195	13.3	1	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
196		2	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
197		3	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
198		4	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
199		5	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
200		6	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
201		7	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo

202		9	no	no	no	no	NO	NO	negativo negativo positivo
203		10				si	NO	SI	positi ? POSITI positivo
204	14.2	1	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
205		2	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
206		3	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
207		4	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
208		5	no	no	no		SI	NO	positivo negativo positivo
209		6	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
210		8	no	no	no		SI	NO	negativo negativo positivo
211		9				si	NO	NO	negativo negativo positivo
212		10				si	SI	NO	negativo POSITI positivo
213		11				si	SI	NO	negativo POSITI positivo
214		12				no	NO	NO	negativo negativo positivo
215		13				si	NO	SI	negativo POSITI positivo
216		14				no	NO	NO	negativo negativo positivo
217		16					NO	NO	negativo negativo positivo
218		17				no	NO	NO	negativo negativo positivo
219		18				no	NO	NO	negativo negativo positivo
220		19				no	SI	NO	negativo negativo
221		20				no	NO	NO	negativo negativo
222	15.1	1	no	no	no		NO	SI	positivo POSITI positivo
223		2	no	no	no		NO	SI	positivo POSITI positivo
224		3	no	no			NO	SI	positivo POSITI positivo
225		4	no	no	MUERTA				
226	17.1	1	no	no	no		NO	SI	positivo POSITI positivo
227		2	no	no	no	no	NO	SI	positivo POSITI positivo
228		3	no	no	no		NO	SI	positivo POSITI positivo
229		4	no	no	no		NO	SI	positivo POSITI positivo
230		5	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
231		6	no	no	no	no	NO	NO	negativo negativo positivo
232		7	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
233		8	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
234		9				si	NO	NO	negativo negativo positivo
235		10				si	NO	SI	positivo POSITI positivo
236		11				si	NO	SI	positivo POSITI positivo
237		12				si	NO	SI	positivo POSITI positivo
238		13				no	NO	NO	negativo negativo positivo
239		14				si	NO	NO	negativo negativo positivo

240		15				si	SI	SI	positivo POSITI	positivo	
241		16				no	SI	SI	positivo POSITI	positivo	
242		17				no	NO	NO	negativo negativo	positivo	
243	18.1	1	no	no	no		NO	NO	negativo negativo	positivo	
244		2	no	no	no		NO	SI	negativo negativo	negativo	
245		3	no	no	no		NO	NO	negativo negativo	positivo	
246		4	no	no	no		NO	NO	negativo negativo	positivo	
247		5	no	no	no		NO	SI	negativo negativo	positivo	
248		6	no	no	no		NO	NO	negativo negativo	positivo	
249		7	no	no	no		NO	NO	negativo negativo	positivo	
250		8	no	no	no		NO	NO	negativo negativo	positivo	
251		9	no	no	no		NO	NO	negativo negativo	positivo	
252		10	no	no	no		NO	NO	negativo negativo	positivo	
253		11				no	NO	NO	negativo negativo	positivo	
254		12				si	NO	NO	negativo negativo	positivo	
255		13				si	NO	NO	negativo negativo	positivo	
256		14				si	NO	NO	negativo negativo	positivo	
257		15				si	NO	SI	negativo negativo	positivo	
258		16				si	NO	SI	negativo negativo	positivo	
259		17				si	NO	NO	negativo negativo	positivo	
260		18				si					
261	19.2	1				si	NO	NO	negativo	positivo	
262		2				si	NO	NO	POSITI	positivo	
263		3				si	NO	NO	negativo	positivo	
264		4				si	NO	NO	negativo	positivo	
265		5				si	NO	NO	negativo	positivo	
266		6				no			negativo	positivo	
267		7					NO	NO	negativo	positivo	
268		8					NO	NO	negativo	positivo	
269		9				si	SI	NO	negativo	positivo	
270		10				si	SI	NO	negativo	positivo	
271		11				si	NO	NO	negativo	positivo	
272		12				no	NO	NO	negativo	positivo	
273		13				si	NO	NO	negativo	positivo	
274		14				si	NO	NO	negativo	positivo	
275	19.4 OJO	1	si	si	si	si	NO	NO	negat	negat	positivo
276		2	no	no	no	no	NO	NO	negativo negativo	positivo	
277		3	no	no	no	no	NO	SI	negativo	positivo	

278		4	no	no	no	no	SI	NO	negativo positivo
279		5	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
280		6	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
281		7	si	si	si		NO	NO	negativo negativo positivo
282	20.2	1	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
283		2	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
284		3	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
285		4	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
286		5	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
287		6	no	no	no		?	NO	negativo negativo positivo
288		7	no	no	no		?	SI	negativo negativo positivo
289		8	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
290		9	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
291		10	no	no	no		NO	NO	negativo negativo positivo
292	21.1	1	no	no	no		SI	NO	positi ? POSITI positivo
293		2	no	no	no		NO	NO	negativo
294		3	no	no					negativo negativo positivo
295	22.1	1	no	no	no	no	NO	NO	negativo negativo positivo
296		2	no	no	no	no	NO	NO	negativo negativo positivo
297		3	no	no	no	no	NO	NO	negativo negativo positivo
298		4	no	no	no	no	NO	NO	negativo negativo positivo
299		5	no	no	no	no	NO	NO	negativo negativo positivo
300		6	no	no	no	no	NO	NO	negativo negativo positivo
301	23.1	1				si			negativo negativo positivo
						muerta	SI	NO	negativo negativo positivo
302		3				no	NO	NO	negativo negativo positivo
303		4				no	NO	NO	negativo negativo positivo
304		5				no	NO	NO	negativo negativo positivo
305		6				no	NO	NO	negativo negativo positivo
306		7				no	NO	NO	negativo negativo positivo
307		8				no	NO	NO	negativo negativo positivo
308		9				no	NO	NO	negativo
309		10				no	NO	NO	negativo negativo positivo
310		11				no	NO	NO	positi ? negativo positivo
311		12				si	NO	NO	negativo negativo positivo
312		13				si	NO	NO	negativo negativo positivo
313		14				si	NO	NO	negativo negativo positivo
314		15				si	NO	NO	negativo negativo positivo

En nuestro laboratorio (UNAM) las pruebas de ELISA fueron realizadas en una submuestra aleatoria de 331 individuos que fueron germinados a plántulas utilizando tejido de hoja para detectar la presencia de Cry1Ab. Más del seis por ciento (6.7%) resultaron positivas tanto para esta proteína como para la amplificación del promotor 35s por PCR, mientras que 2.4% y 8.8% sólo dieron positivas para una de las dos pruebas ya fuera Cry1Ab y el promotor 35s respectivamente.

En el CINVESTAV se realizaron las mismas pruebas, pero tomando plántulas de mazorcas que previamente habían resultado positivas para el promotor 35S mediante PCR. De las 100 plántulas utilizadas, 44 resultaron positivas para Cry1Ab. 20 plántulas de las 100 fueron analizadas para la presencia del promotor 35s mediante PCR, de éstas, 2 resultaron únicamente positivas para el 35s y 2 sólo para Cry1Ab, mientras que 9 (45%) resultaron positivas para ambos.

Los datos presentados en la tabla anterior fueron codificados como presencia (positivo) o ausencia (negativo) para realizar comparaciones entre las distintas pruebas (cada prueba fue tomada como un tratamiento distinto a un mismo problema). Se utilizaron diferentes pruebas estadísticas así como un análisis de ANOVA. El programa usado fue STATISTICA versión 98.

Para aquellos individuos donde hacían falta datos (ver tabla 1) éstos se tomaron como negativos, codificándose como 0, por lo que los resultados de este análisis son más conservadores que los datos reales

Tabla 2. ANOVA de Friedman y coeficiente de concordancia de Kendall

Friedman ANOVA and Kendall Coeff. Of Concordance
 ANOVA Chi Sqr. (N = 341, df = 4) = 227.8503 p <0.00000
 Coeff. of Concordance = .16705 Aver. rank r = .16460

	Rango promedio	Suma de los rangos	Media	Desv. Est.
Cry9	2.83870959	968	0.42228743	5.41870213
Cry1Ab	2.75806451	940.5	0.39002925	5.41814184
BASTA	3.64516139	1243	0.74486774	5.41371059
PCR 1	2.86803508	978	0.4340176	5.41885662
PCR 2	2.89002943	985.5	0.44281504	5.41895628

La ANOVA de Friedman, prueba para comparar los rangos de las medias entre grupos de datos que carecen de distribución normal, denota que no existen diferencias significativas entre las medias de las frecuencias de los distintos tratamientos ($p < 0.0000$), mientras que el coeficiente de concordancia de Kendall ($k = 0.16705$) comprueba que los distintos tratamientos arrojan resultados que no difieren significativamente entre sí.

Esto es de esperarse en el caso donde los individuos que resulten positivos para alguno de los tratamientos fuesen producto de un evento de introgresión entre un individuo transgénico y un criollo, sin embargo, existe la posibilidad de que se esté subestimando el número de individuos positivos para el tratamiento con el herbicida BASTA, ya que existen evidencias de que plantas modificadas para la resistencia a herbicidas pueden resultar susceptibles a estos si se encuentran estresadas fisiológicamente. (Dr. David Quist, comunicación personal). A su vez, diferentes investigadores han discutido la efectividad de las pruebas de ELISA, en donde existen evidencias de poder dar tanto falsos negativos como falsos positivos (AEIC meeting 2002.).

El PCR es visto como uno de los procedimientos más exactos para la detección de construcciones transgénicas. En la mayoría de los casos se enfoca el análisis en la amplificación del promotor 35s, que es el que se ha utilizado en la mayoría de las construcciones de los eventos aprobados y liberados comercialmente. Sin embargo, la amplificación de este segmento permite establecer si ha habido introgresión de un transgénico o no, pero no permite establecer un evento particular involucrado.

Por otro lado, el PCR es una técnica de amplificación indirecta *in vitro* a saturación que puede dar un positivo claro aún con templados muy escasos que pueden provenir de contaminaciones a lo largo del procesamiento de las muestras y no de fragmentos insertados en el genoma receptor del individuo bajo estudio. Por esta razón es fundamental validar esta técnica con métodos de hibridación tipo *Southern* que permitan establecer la presencia de transgenes dentro de los genomas receptores de manera inequívoca. Alternativamente, se deben complementar y validar los análisis por medio del PCR no cuantitativo usado aquí, con análisis de PCR cuantitativo que permite descartar fuentes de contaminación de templados con transgénicos reales. Debido a lo anterior, nuestros análisis se limitan a dar una primera estimación cualitativa de la introgresión en materiales de maíz criollo. Pero es importante reevaluar los datos presentados aquí con métodos adicionales que permitan descartar falsos

negativos y positivos y detectar eventos específicos (Lih-Ching, et. Al. 2001). Sin embargo, el hecho que distintos análisis hechos de manera independiente en los mismos individuos muestreados arrojen datos de frecuencias de positivos muy similares, sugiere que en la muestra de criollos considerada sí existió cierto grado de introgresión de transgénicos.

La siguiente tabla muestra las frecuencias de individuos que amplificaron para el promotor 35S, distribuidos en las diferentes localidades muestreadas. Los datos están divididos según el laboratorio en donde fueron obtenidos (CINVESTAV y UNAM). Se muestran por separado y se comparan y luego se juntan todos para dar un estimado promedio de ambos laboratorios.

En el caso del terminador de la nopalina sintetiza (NOS) su amplificación fue problemática, siendo poco replicable, por lo que los datos no se incluyen aquí. Varios investigadores han tenido problemas similares con este marcador (Lih-Ching, et. Al. 2001; Permingeat, *et al.*, 2002).

Tabla 4. Frecuencia de individuos por localidad que amplificaron para el promotor 35s mediante técnicas de PCR

Localidad	CINVESTAV				UNAM				Mezclados			
	<i>n</i>	frec.	Intervalos de valores 95%		<i>N</i>	frec.	Intervalos de valores 95%		<i>N</i>	frec.	Intervalos de valores 95%	
			Sup.	Inf.			Sup.	Inf.			Sup.	Inf.
1	30	0.0333	0.0008	0.1722	15	0.0667	0.0017	0.3195	45	0.0444	0.0054	0.1515
2	46	0.1087	0.0362	0.2357	30	0	0	0.1157	76	0.0658	0.0217	0.1469
3	49	0.0816	0.0227	0.196	51	0.1961	0.0982	0.332	100	0.1400	0.0787	0.2237
4	52	0.0192	0.0005	0.1026	57	0.1053	0.0396	0.2152	109	0.0642	0.0262	0.1279

Localidad	CINVESTAV				UNAM				Mezclados					
	valores		Intervalos		de Valores		Intervalos		de valores		Intervalos		de	
	<i>n</i>	frec.	Sup.	Inf.	<i>N</i>	frec.	Sup.	Inf.	<i>N</i>	frec.	Sup.	Inf.	95%	95%
5	44	0.0227	0.0006	0.1202	78	0.0897	0.0368	0.1762	122	0.0656	0.0287	0.1251		
6	46	0	0	0.0771	66	0.1061	0.0437	0.2064	112	0.0625	0.0255	0.1245		
7	68	0.0735	0.0243	0.1633	110	0.0909	0.0445	0.1608	178	0.0843	0.0479	0.1352		
8	60	0.0333	0.0041	0.1153	56	0.0714	0.0198	0.1729	116	0.0517	0.0192	0.1092		
9	39	0.0769	0.0162	0.2087	53	0.1132	0.0427	0.2303	92	0.0978	0.0457	0.1776		
10	20	0.0450	0.0208	0.0837	102	0.049	0.0161	0.1107	302	0.0464	0.0256	0.0766		
11	22	0.0909	0.0112	0.2916	29	0.1379	0.0389	0.3166	51	0.1176	0.0444	0.2387		
12	17	0	0	0.1951	15	0.1333	0.0166	0.4046	32	0.0625	0.0077	0.2081		
13	11	0	0	0.0308	40	0.075	0.0157	0.2039	158	0.0190	0.0039	0.0545		
14	35	0.0857	0.0180	0.2306	50	0.26	0.1463	0.4035	85	0.1882	0.1116	0.2876		
15	30	0	0	0.1157	47	0.1915	0.0915	0.3326	77	0.1169	0.0549	0.2103		
16	30	0.1333	0.0376	0.3072	47	0	0	0.0755	77	0.0519	0.0143	0.1277		
17	30	0.0667	0.0082	0.2207	66	0.0303	0.0037	0.1052	96	0.0417	0.0115	0.1033		
18	30	0.0667	0.0082	0.2207	40	0	0	0.0881	70	0.0286	0.0035	0.0994		
19	30	0.2	0.0771	0.3857	33	0.0303	0.0008	0.1576	63	0.1111	0.0459	0.2156		
20	30	0.1333	0.0376	0.3072	21	0.0476	0.0012	0.2382	51	0.098	0.0326	0.2141		
21	30	0.2667	0.1228	0.4589	86	0.1047	0.049	0.1894	116	0.1466	0.0878	0.2242		
Total	10	0.0598	0.0462	0.0761	1092	0.0916	0.0751	0.1103	2128	0.0761	0.0652	0.0882		

Localidad	CINVESTAV		UNAM				Mezclados					
	<i>n</i>	frec.	Intervalos de valores de 95%		de Valores		Intervalos de 95%		de valores		Intervalos de 95%	
			Sup.	Inf.	<i>N</i>	frec.	Sup.	Inf.	<i>N</i>	frec.	Sup.	Inf.
Centro de distribución									33	0.2424	0.1109	0.4226
Mercado									30	0	0	0.1157

Intervalos con 95% de confianza de las frecuencias documentadas fueron calculados numéricamente asumiendo una distribución binomial para cada localidad.

Clave: *n* = de individuos analizados, frec. =frecuencia, Sup.= intervalo superior, inf.= intervalo inferior.

La frecuencia promedio de muestras que amplificaron para el promotor 35S en la UNAM fue de 0.092 (S.E . \pm 0.0087, *n*=1092) y de 0.060 (S.E . \pm 0.0074, *n*=1036) en el CINVESTAV. Aunque las diferencias entre las frecuencias obtenidas en los distintos laboratorios no es significativa, éstas se pueden deber a que en el primer laboratorio se llevaron a cabo pruebas independientes para 35s y NOS mientras que en el CINVESTAV ambas amplificaciones fueron realizadas en el mismo tubo de reacción.

La identidad de los productos de PCR fue comprobada mediante la comparación con las bandas del control positivo y clonando y mandando a secuenciar ciertas muestras.

A partir de una segunda corroboración que usó un criterio más astringente para establecer como positivo a un resultado, se presenta una tabla nueva que además tiene datos para dos familias adicionales (22 y 23) que no habían sido reportadas antes. En esta tabla se tomaron como positivos solamente a aquellos casos para los cuales había al menos dos experimentos de PCR independientes o datos de más de una extracción de ADN y con bandas intensas y claramente definidas en los geles de agarosa (ver fotos de ejemplos). Sin embargo, las frecuencias finales no son muy distintas a las reportadas anteriormente.

Tabla 3. Se presentan los datos de frecuencia a partir de positivos obtenidos por PCR tanto en la primera etapa del proyecto como en etapas posteriores para el laboratorio de la UNAM. Se incluyen dos familias nuevas (22 y 23).

UNAM-primer a corroboraci3n					UNAM segunda corroboraci3n				
	Valores		Intervalos de 95%			valores		Intervalos de 95%	
Localidad	N	frec.	Sup.	Inf.	localidad	N		Inf.	Sup.
1	15	0.0667	0.0017	0.3195	1	15	0.066667	0.054739	0.11438
2	30	0	0	0.1157	2	30	0.1	0.080319	0.128115
3	51	0.1961	0.0982	0.332	3	45	0.177778	0.150231	0.205325
4	57	0.1053	0.0396	0.2152	4	45	0.044444	0.021488	0.0674
5	78	0.0897	0.0368	0.1762	5	45	0.155556	0.147724	0.163388
6	66	0.1061	0.0437	0.2064	6	51	0.117647	0.116519	0.118775
7	110	0.0909	0.0445	0.1608	7	81	0.123457	0.107868	0.139046
8	56	0.0714	0.0198	0.1729	8	75	0.022222	0.004441	0.040003
9	53	0.1132	0.0427	0.2303	9	45	0.133333	0.133333	0.133333
10	102	0.049	0.0161	0.1107	10	45	0.133333	0.114968	0.151698
11	29	0.1379	0.0389	0.3166	11	27	0.222222	0.16295	0.281494
12	15	0.1333	0.0166	0.4046	12	15	0	-0.03181	0.031809
13	40	0.075	0.0157	0.2039	13	45	0.088889	0.038386	0.139392
14	50	0.26	0.1463	0.4035	14	33	0.333333	0.252913	0.413753
15	47	0.1915	0.0915	0.3326	15	12	0	0	0
16	47	0	0	0.0755	16	15	0	-0.02386	0.023856
17	66	0.0303	0.0037	0.1052	17	30	0.066667	0.066667	0.066667
								0	0
18	40	0	0	0.0881	18	32	0.15625	0.12268	0.18982
19	33	0.0303	0.0008	0.1576	19	52	0.019231	0.015535	0.022927
20	21	0.0476	0.0012	0.2382	20	30	0	-0.01406	0.014058
21	86	0.1047	0.049	0.1894	21	36	0.055556	0.052989	0.058123
Total	1092	0.0916	0.0751	0.1103	22	15	0.066667	0.058573	0.074761
					23	56	0.089286	0.089286	0.089286
						875			

Intervalos con 95% de confianza de las frecuencias documentadas fueron calculados num6ricamente asumiendo una distribuci3n binomial para cada localidad.

Clave: n= · de individuos analizados, frec. =frecuencia, Sup.= intervalo superior, inf.= intervalo inferior.

Tanto en el caso de la UNAM como en el CINVESTAV, existen familias donde hay una mayor proporci3n de individuos positivos, (Fams. 6, 11, 21, 23; ver tabla 1), sugiriendo que en estas familias que se analizaron independientemente por ambos laboratorios se encuentran los

positivos más seguros. A pesar de esta evidencia, se siguen conduciendo análisis para corroborar los datos obtenidos, poniendo especial énfasis en la hibridación ADN-ADN que se hará en individuos positivos para el 35s de estas familias, en análisis de progenie obtenida en el invernadero para individuos positivos, y en pruebas de PCR cuantitativo que permitan validar las técnicas usadas aquí y establecer la frecuencia de falsos positivos y negativos. **Hasta tener datos de estas técnicas complementarias no es posible usar los datos aquí presentados como confirmatorios o finales de la presencia y de la frecuencia de introgresión de transgénicos en variedades de maíz criollo colectado en Oaxaca y Puebla.**

Imagen 1 familia 6.3, el individuo 6.3.3 aparece positivo para el promotor 35S.

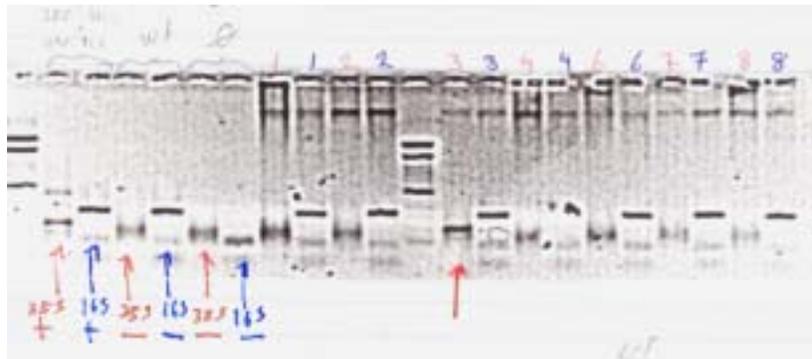
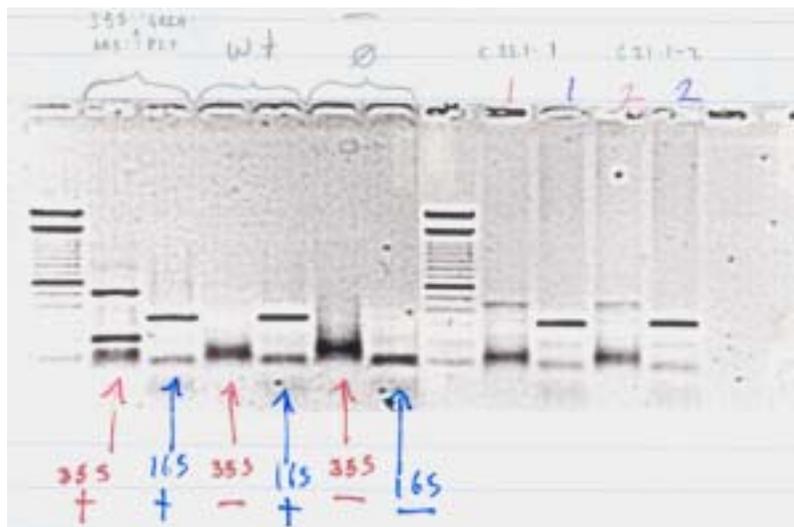


Imagen 2. individuos 21.1.1 y 21.1.2



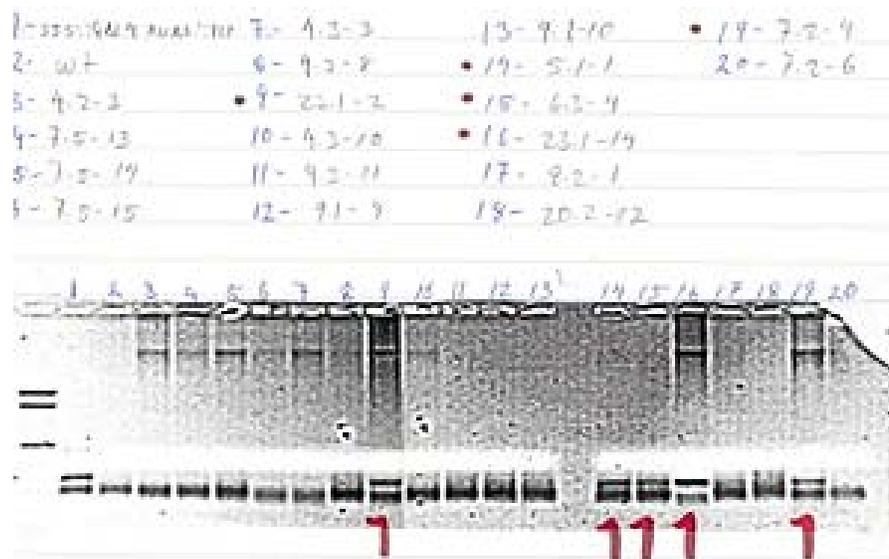


Imagen 3. PCR para diferentes individuos repetidamente positivos

DISCUSIÓN

Nuestros resultados sugieren fuertemente la presencia de transgenes en los maíces criollos colectados en Oaxaca y Puebla. Fenotípicamente las mazorcas colectadas eran parecidas a diferentes razas criollas como son bolita, zapalote chico, tabloncillo harinoso y olotón-tehua cónico, lo cual sugiere que las semillas que dieron origen a dichas mazorcas no eran del tipo transgénico comercial, lo cual refuerza la idea de que ha habido eventos de introgresión. Sin embargo no encontramos una coincidencia perfecta entre los distintos marcadores explorados. Por ello, hace falta profundizar en los análisis moleculares para algunos individuos. En estos deben realizarse pruebas exhaustivas para un par de los marcadores explorados hasta ahora: 35S y Cry1.

A su vez, deben favorecerse los estudios sobre el maíz a niveles más amplios, tanto en las dinámicas propias de las diferentes variedades criollas, como en los análisis de manejo de variedades transgénicas para evitar el desarrollo de resistencia a toxinas como el Bt por parte de las poblaciones de insectos blanco (Linacre, N.A. y Thompson C.J., 2004). Además, estudios que cuantifiquen la permanencia de la toxina en el suelo así como la posible perturbación de la microflora y los demás estratos que conforman a los distintos agroecosistemas. (Volkmar et. Al, 2003) Además, estudios sistemáticos sobre los costos y beneficios de los cultivares producto de

esta tecnología deben ser conducidos, (Sun et. Al., 2004) y por último, la posibilidad de detectar estos productos en la cadena alimentaria es de suma importancia, en particular con la siguiente generación de cultivares transgénicos en puerta: los “pharm plants” o plantas productoras de sustancias farmacéuticas e industriales, las cuales representan un riesgo latente para la población y el medio (Miraglia M. et. Al. 2004; Ma, J. K.C. et. Al. 2003).

PERSPECTIVAS

Con base en las revisiones recibidas en el artículo sometido a *Nature*, se hace patente la necesidad de realizar experimentos más detallados en algunos individuos para probar por pruebas independientes la presencia de los transgenes en sus genomas. Esto se está terminando para poder enviar nuevamente los resultados a consideración de una revista de circulación internacional. Por ello, hemos continuado haciendo pruebas de hibridación tipo Southern. Ahora estamos trabajando para sacar los datos de validación de los resultados de PCR y ELISA mediante análisis de hibridación tipo Southern blot para una submuestra de los individuos analizados anteriormente. En estos momentos contamos ya con la técnica bien montada y con los resultados para los controles y en los próximos meses se analizarán los individuos seleccionados. Para este trabajo estamos ya utilizando recursos de otros proyectos pues el apoyo de la CONABIO se ha consumido ya totalmente.

Los análisis cuantitativos de flujo génico usando los modelos de genética de poblaciones tendrán que esperar un nuevo muestreo pues el muestreo a partir del cual se realizaron los análisis reportados en este informe no es adecuado para estos fines. Esto se hará también con apoyos financieros de otros proyectos.

CONSIDERACIONES FINALES

Debido a lo discutido anteriormente, hasta tener datos de estas técnicas complementarias no es posible usar los datos aquí presentados como confirmatorios o finales de la presencia y de la frecuencia de introgresión de transgénicos en variedades de maíz criollo colectado en Oaxaca y Puebla.