

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Restricciones analíticas de las técnicas de biomonitoreo de Organismos Genéticamente Modificados de uso agrícola: estudio de caso de muestras de maíz procedentes de la Sierra Norte de Oaxaca”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
ALMA AMPARO PIÑEYRO NELSON

DIRECTORA DE TESIS: MARÍA ELENA ÁLVAREZ-BUYLLA ROCES

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se la dedico, por todo el amor que con mayor o menor facilidad me han dado, así como por lo que me enseñaron y enseñan, a:

José Luis, mi padre,

Catherine, mi madre,

Alma Rosa, mi tía

Gabriela, mi otra madre

Merrill y Margaret, mis abuelos

Jazmín, mi nueva hermana

Y en especial, a la persona con la que he compartido todo desde antes de nacer y hasta la fecha, que ha sido no sólo mi más cercana familia, sino una influencia fundamental para ser quien soy:

Carlos, mi hermano

Agradecimientos académicos

Agradezco:

El apoyo continuo durante la elaboración de este trabajo y la investigación subyacente por parte de la Dra. Elena Álvarez-Buylla.

La formación inicial y el apoyo del Dr. Daniel Piñero, que fueron determinantes para que yo pudiera comenzar este trabajo.

El interés prestado a este trabajo por parte de los sinodales: Dr. Daniel Piñero, Dr. Antonio Serratos, Dra. Adriana Garay y el M. en C. Rigoberto Pérez.

Al Dr. Jorge Nieto del Instituto de Biotecnología de la UNAM por permitirme realizar varias estancias cortas en su laboratorio. Dentro de éste, muy especialmente a la Q.F.B. Luz María Martínez por haberme enseñado varias de las técnicas utilizadas en este trabajo, así como por su paciencia e interés.

Al M. en C. Rigoberto Pérez, la Dra. Adriana Garay, la Dra. Berenice García y Arturo Pérez por la ayuda proporcionada en la parte experimental.

A aquellos que sin ser parte del proyecto de investigación, me ayudaron en diversas labores relacionadas con él, como son la Dra. Rocío Salceda y el Dr. Jorge Arreguín.

Por último, a los investigadores, estudiantes y técnicos involucrados en el proyecto "Impacto de la introducción..." Por el apoyo brindado y lo aprendido con cada uno de ellos: Dr. Antonio Serratos, Dr. Hugo Perales, Dr. Rafael Rivera, Dr. George Dyer, M. en C. Joost van Heerwaarden, Biol. Noé Salinas, Dra. Grethel Busot, Biol. Erika Díaz, Biol. Andrea Jiménez, Dra. Gurpreet Kaur, Biol. Eric Vides, Ángel Martínez y Fernando Pérez, así como a los habitantes de las comunidades de Santiago Xiacui y Santa María Jaltianguis.

El financiamiento para los trabajos de análisis molecular y colectas provino del proyecto sectorial CONACYT-SEMARNAT 0538/A1: "Impacto de la introducción de variedades transgénicas en la diversidad de maíces criollos y teocintles en México: estado actual, perspectivas y recomendaciones"

Agradecimientos generales:

Agradezco:

A mi hermano Carlos, quien con su gran inteligencia y nobleza, no deja de ser mi más férreo crítico, , una buena compañía y mi gruñón favorito.

A mi padre, por haberme criado para, a veces a pesar de él, ser libre y segura. También, por ser el primer ejemplo de amor, solidaridad, inteligencia y equidad.

A mi madre, por ser un ejemplo del tipo de mujer que quiero ser.

A Gaby, por todo lo que he aprendido de ti, así como por haber querido formar familia con nosotros y seguir siéndolo a pesar de ya conocernos bien...

A mi hermanita Jazmín, por el gusto de que ya estés aquí y con la curiosidad de verte crecer.

A las familias Piñeyro y Nelson, en especial mis abuelos, tíos maternos, tíos Alma, Víctor, Hilda, primos Ada y los Piñeyro Morcos; por el cariño que me han dado así como ser un referente frente al cual festejo mis grandes similitudes y grandes diferencias.

A Elena, no sólo por el apoyo académico recibido, sino también su apoyo personal y su amistad.

A Daniel, por los mismos motivos...

A los integrantes del laboratorio de Genética Molecular y Evolución en Plantas, por hacer más llevadera la talacha propia del laboratorio y en especial, de esta investigación: Anidia, Rigo, Eduardo, Marcelina, Aída, Mitzi, Adriana, Bere, Mariana, Carlos, Elena, Gabriel; a los integrantes del "grupo de maíz": Eric, Andrea, Grethel, Erika, Gurpreet.

A Fabrizio, por que has sido de los descubrimientos más interesantes de la carrera, por lo que he aprendido discutiendo contigo, con todo y diferencias racionales de por medio y, sobretodo, por tu cariño y gran amistad.

A Sergio, por siempre estar ahí cuando te necesito, sea para tomar un chocolate en el Jarocho o algo más. Por lo que compartimos y nos falta por compartir, ahora con Jazmín y Jessica...

A Hajime, ají, Jaime, y etc por estar cerca y compartirme sus múltiples metamorfosis...

A Ana, por lo que hemos crecido juntas, sea de fiesta, viéndote armar tangos, haciendo teatro, o escuchándome...

A Ileri, quien con su amistad hace la vida en el instituto más amena, quien me ha ayudado a acabar los trámites para presentar esta tesis y con quien compartiré el doctorado...

A aquellos que han estado conmigo en la carrera, en la casa y/o en la vida: Carlos, Carlitos, Marco, Gisel, Fernanda, Pablo, Sergio, Fabrizio, Hajime, Ana, Erika, Ileri, Leonora, José Antonio, "el patrón", Mariana, Libertad, Gil, Dago, León, Sara, Ingrid, Lev, Ana Wegier, Víctor, Dalia, Samuel, Juan Felipe, Dalia, más aquellos que mi mala memoria excluya en estos momentos....

A Mayra, Eria e Ingrid, por haberme recibido tan cálidamente en su casa de Cuernavaca cuando hice estancias en el IBT.

A Gustavo, por querer construir un camino juntos, por todo lo que me das y por todo lo que eres y tienes, aunque a veces no te des cuenta....

A los integrantes del JRA, con quienes aprendí que es posible y necesario exigir lo imposible, con quienes compartí muchas experiencias en la búsqueda de "un mundo donde quepan muchos mundos".

Al "grupo del Régimen de maíz", por trabajar juntos en la búsqueda de un México donde se legisle para la mayoría y no para los poderosos, así como por un país donde quepan dignamente los agricultores, donde podamos escoger lo que sembramos y lo que comemos, así como quiénes somos: Adelita, Antonio, Cati, Gustavo, Elena, Liza.

A todos aquellos que luchan por mantener la posibilidad de elegir lo que uno es, cultiva, come y cree... quienes piensan que podemos escribir nuestra propia historia en lugar de importar los sueños y anhelos de otros.

INDICE

I.	RESUMEN	6
1.	CARACTERÍSTICAS DE ZEA MAYS	7
1.1.	Biología Reproductiva y Fenología de Zea mays ssp. Mays	7
1.2.	Origen evolutivo del maíz	8
1.3.	Diversidad actual de razas de maíz y teocintles en México	11
1.4.	El maíz en México y el mundo	12
1.5.	Mejoramiento agronómico y selección artificial en maíz	15
2.	TRANSGÉNESIS EN PLANTAS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA	17
2.1.	Métodos de transformación en plantas	17
2.2.	Técnicas de detección de transgenes y sus productos	22
2.3.	Transgenes “universales”: el promotor 35S del CaMV y el tNOS	27
2.4.	Situación mundial de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) de uso agrícola	29
2.5.	Uso y comercialización de maíz genéticamente modificado en el mundo y repercusiones para México	31
2.6.	Presencia del promotor 35S y tNOS en eventos comerciales de maíz transgénico liberados al ambiente situación actual	32
3.	ESTUDIO DE CASO	35
3.1.	Antecedentes	35
3.2.	Sitio de colecta y clasificado de muestras	37
3.3.	Primera ronda de análisis moleculares	40
3.4.	Segunda ronda de análisis moleculares	42
4.	RESULTADOS	44
4.1.	Extracción de ADN	44
4.2.	PCR Cuantitativo	44
4.3.	PCR Cualitativo	45
4.4.	Hibridación ADN-ADN tipo Southern blot	51
4.5.	Compendio de resultados obtenidos mediante diferentes técnicas	54
5.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	57
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	64
6.1.	extracción de ADN y amplificación mediante PCR	65
6.2.	Hibridación ADN-ADN tipo Southern blot	66
7.	REFERENCIAS	68
7.1.	Artículos	68
7.2.	Libros y capítulos	70
	APENDICE 1	72

RESUMEN

El maíz es un cultivo fundamental para México, pues es la base de la dieta mexicana y tiene una gran importancia económica, social y cultural. A la vez, nuestro país es centro de origen y diversificación del maíz (Vavilov, 1940; Doebley e Iltis, 1984; Wang et al, 1999; Matsuoka et al. 2002;) ya que cuenta con 59 razas catalogadas (Taba, 1995; LAMP, 1992; Ortega-Paczka, 2003) que almacenan un importante reservorio de diversidad genética que es fundamental conservar. En esta tesis se hace una reflexión acerca de las repercusiones de la posible diseminación e introgresión de transgenes en este cultivo en México. Para ello, en la primera sección se hace un recuento de su origen evolutivo, la relación con sus parientes silvestres más cercanos, la diversidad de razas actuales de maíz en México y su distribución, la importancia de este cultivo en las culturas prehispánicas y actuales.

En la segunda sección resumimos las técnicas de transformación de plantas que se han utilizado para transformar genéticamente diversas especies vegetales, en particular aquellas de importancia agronómica como los cereales, grupo al que pertenece *Zea mays* ssp. *mays*. Después se presentan las diferentes técnicas para detectar la presencia de transgenes, tanto a nivel de secuencia de ADN, como de ARNm y proteína, mencionando cuáles son los más utilizados para llevar a cabo biomonitoreo de Organismos Genéticamente Modificados (OGM). Dentro de las secuencias más utilizadas para regular la expresión de transgenes en el maíz está el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV, por sus siglas en inglés), presente en mas del 90% de los eventos comerciales liberados al ambiente en Estados Unidos, y en menor frecuencia, el terminador de la Nopalina Sintetasa (tNOS). Como referencia para discutir las estrategias de biomonitoreo, se resumen los eventos comerciales liberados al ambiente a la fecha en una tabla con información de los transgenes introducidos, características que confieren y año de liberación. Por último, se hace un breve recuento de la situación del uso de OGMs a nivel mundial, con especial atención a las líneas de maíz transgénico y las repercusiones que el uso de estas líneas puede tener para México.

En la tercera sección se presenta un estudio de caso con el análisis molecular de una colecta de maíz realizada en 2001 en dos localidades del estado de Puebla y veintiún localidades de la Sierra Norte de Oaxaca para establecer si hay o no presencia de transgenes en razas criollas de maíz en estas localidades. Finalmente, en la cuarta y quinta sección se presentan los resultados de un subgrupo de muestras estudiadas a profundidad con el fin de analizar la confiabilidad, repetibilidad, congruencia y dificultades de las diferentes técnicas moleculares utilizadas para determinar la presencia de secuencias de líneas transgénicas en muestras de maíz criollo. Estos análisis se usan para discutir acerca de la problemática del biomonitoreo en México.

1. CARACTERÍSTICAS DE *Zea mays*

1.1 Biología reproductiva y fenología de *Zea mays ssp. mays*

El maíz es una planta monocotiledónea anual, monoica con un tallo que termina en una inflorescencia masculina llamada panícula o espiga cuyo eje principal y ramificaciones secundarias contienen espiguillas, comúnmente pareadas, donde una es sésil y la otra pedicelada. Cada espiguilla se encuentra encapsulada por dos glumas y por lo tanto, dos floretes, cada una con una lema, palea, tres estambres, dos lodículos y un pistilo rudimentario infértil. La espiga central es gruesa, mucho más pronunciada y con una mayor densidad de espiguillas que las ramas primarias y secundarias. (Dhillon *et al*, 2002).

La inflorescencia femenina, conocida como "mazorca" se forma a partir de meristemos laterales presentes en las axilas de las hojas. Uno o dos meristemos, generalmente a mitad de la longitud del tallo, se desarrollan en ramificaciones laterales que darán paso a las mazorcas, siendo la mazorca más cercana al ápice de la planta la mazorca principal y generalmente la más grande. La estructura reproductiva femenina está compuesta de un pedúnculo con entrenudos muy acortados que presentan hojas modificadas que cubren la mazorca. La mazorca o inflorescencia femenina se desarrolla a partir de un meristemo que da lugar a un raquis o eje central sobre el que emergen estructuras bilobuladas que se dividen en forma longitudinal en todo el eje central madurando de la base de éste hasta el ápice, quedando en hileras. En cada uno de estos lóbulos se forma una espiguilla y por lo tanto, éstas se encuentran dispuestas en pares. Cada espiguilla contiene dos flores; la flor más basal generalmente no se desarrolla mientras que la flor distal sí llega a la madurez sexual. El ovario de esta flor se desarrolla y se encuentra rodeado por un estilo largo y bifido. Los pistilos sobresalen de la cubierta de las hojas modificadas o brácteas que recubren la inflorescencia y se encuentran recubiertos de tricomas, que funcionan tanto como estilo como estigma en todo su largo. Debido a la naturaleza monoica y protándrica, la mayor parte de los óvulos se fertilizan por polen proveniente de otras plantas y se estima que hay menos de un 5% de autofecundación (Dhillon *et al*, 2002).

El maíz es protándrico ya que la inflorescencia masculina comienza la antesis antes de la emergencia de los pistilos; el intervalo entre la antesis masculina y la femenina puede variar de un día a varios días. En el caso de la panícula, la dehiscencia de las espiguillas comienza del centro hacia las ramas externas. Una sola antera puede liberar hasta 2500 granos de polen y una panícula puede liberar hasta 25 millones de granos de polen. (Kiesselbach, 1949 citado por Dhillon *et al*, 2002). La emergencia de los pistilos se da de 1 a 3 días después del inicio de la floración masculina, por lo que se presume que hay dominancia apical en donde la antesis masculina induce la antesis femenina. Los pistilos se vuelven receptivos inmediatamente después de la emergencia, y duran receptivos alrededor de 5 a 7 días, dependiendo de la temperatura y humedad. La

fertilización de los óvulos comienza en una tercera parte de la base de la inflorescencia. El grano de maíz es una cariopsis. Después de la fertilización, el cigoto y el de endosperma triploide se desarrollan en una semilla madura que consiste de un pericarpo, una aleurona, embrión y endospermo. La inflorescencia femenina o mazorca, se encuentra cubierta por varias capas de hojas y no es dehiscente. Por lo tanto las semillas de maíz solo se dispersan por el hombre

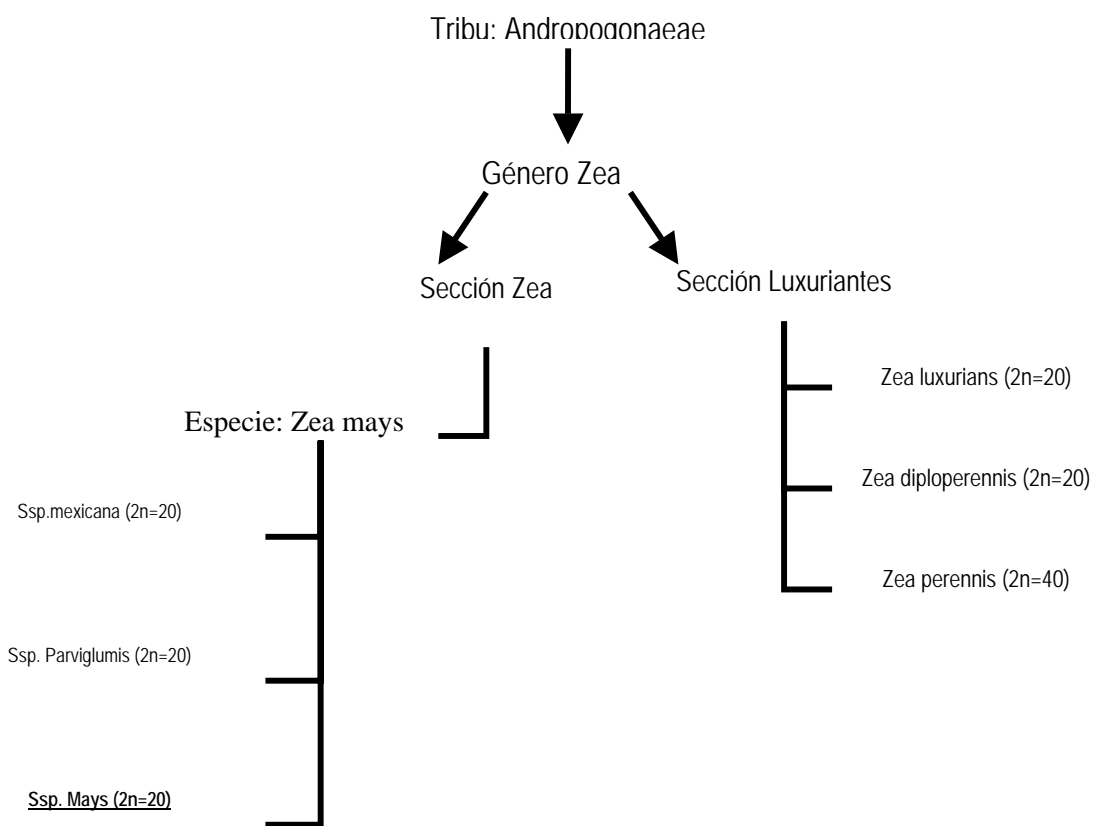
1.2. Origen evolutivo del maíz

El origen filogenético de este cereal ha generado controversia desde su inclusión por Carlos Linneo en su sistema de clasificación (1753). Para el S. XX, la polémica se centró en la explicación del origen de esta planta y las relaciones filogenéticas con sus grupos hermanos. En el primer tercio de este siglo se propusieron dos hipótesis acerca de sus ancestros y evolución. La hipótesis tripartita, enunciada por Paul Mangelsdorf (1938) plantea que el maíz es producto de un maíz ancestral ahora extinto, mientras que el teocintle es derivado de una cruce entre este maíz ancestral y una especie del género *Tripsacum*; éste último habría contribuido con fragmentos cromosómicos importantes, compartidos por el teocintle y el maíz ancestral, lo que explicaría las similitudes entre el teocintle y el maíz moderno a nivel citogenético y fenotípico.

La hipótesis alternativa, propuesta por George Beadle (1939), considera al teocintle como ancestro directo del maíz. En esta teoría se establecen las bases para postular que las diferencias entre uno y otro taxón se deben a cambios en pocos genes con un efecto grande en el fenotipo (Buckler y Stevens, 2006). Recientemente se ha considerado que tanto los teocintles como el maíz son grupos hermanos. Antes se pensaba que pertenecían a géneros separados y el maíz era el único representante del género *Zea* mientras que los teocintles, cuyas diferentes especies y subespecies no habían sido estudiadas a detalle, eran incluidas en el género *Euchlaena*. Mientras estas dos hipótesis evolutivas eran exploradas, se fue generando más información con respecto a la diversidad y distribución de las poblaciones de teocintles existentes. El primer autor en proponer una clasificación de estos taxones donde se proponía una relación filogenética entre ellos fue Charles Gilly en los años cuarenta del siglo pasado (Illis, 1993). En esta clasificación se reconocían varios complejos raciales aunque se pensaba que sólo había dos especies de teocintles (*Zea mays ssp. parviglumis* y *Zea mays ssp. mexicana*, según clasificaciones posteriores) las cuales eran alopátricas y fueron agrupadas por el autor como diferentes fases de una especie, distinguidas de acuerdo a su lugar de origen (fase Chalco, Guerrero, Jutiapa). Esta clasificación era muy preliminar y para la década de los sesentas, Wilkes (1967) propuso la primera monografía sobre la biología, taxonomía y distribución de los diferentes tipos de teocintle. Entonces ya se contemplaban diferentes especies y razas mientras que se incluía al maíz como especie hermana. Wilkes propuso la sección *Zea* que incluye al maíz (*Zea mays*) y otra sección llamada *Euchlaena mexicana* en la que se incluyen a *Zea perennis* y *Zea mexicana*, así como a seis razas de teocintle: raza

Nobogame, raza de la meseta central, raza de Chalco, raza del Balsas, raza de Huehuetenango y raza de Guatemala (Doebly, J., 1993). La determinación de las especies y subespecies que representaban estas razas no fue claramente postulada hasta la clasificación propuesta por John Doebly y Hugh Iltis en 1980, donde las razas son sustituidas por dos secciones: Zea y Luxuriantes. Esta clasificación pretendía dar cuenta de las relaciones filogenéticas de los taxones integrantes de este grupo. A continuación se presenta un esquema con la hipótesis filogenética actual del maíz y sus parientes silvestres (Doebly e Iltis, 1980; Iltis y Doebly, 1980).

Figura 1. Se muestra la clasificación de maíz y sus parientes silvestres (teocintles). Entre paréntesis se muestra el número de cromosomas en un genoma diploide (2n).



Resaltado en negro y subrayado está *Zea mays ssp. mays*; el maíz. (Figura modificada a partir de: Doebly e Iltis, 1980; Iltis y Doebly, 1980).

Con base en lo anterior, la clasificación taxonómica completa aceptada actualmente para *Zea mays ssp. mays* es la siguiente:

Reino: Plantae
 Subreino: Embryophyta
 División: Tracheophyta
 Subdivisión: Spermatophytina

Clase: Liliopsida
Orden: Poales
Familia: Poaceae
Clado PACCAD¹
Subfamilia: Panicoideae
Tribu: Andropogoneae
Género: *Zea*
Especie: *Zea mays* L.
Subespecie: *mays*

Estudios recientes, tanto en genética del desarrollo como evolución molecular y arqueología, están aportando evidencia empírica y experimental que apoya la hipótesis postulada por Beadle acerca del origen del maíz, sugiriendo que el maíz es el producto de la selección artificial del hombre sobre poblaciones de una especie de teocintle (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) presente en el valle del río Balsas hace 10, 000 años (Wang et al, 1999; Matsuoka et al, 2002; Buckler y Stevens, 2006).

Análisis moleculares realizados entre diferentes razas de maíz y ssp. *parviglumis* apuntan a que el tiempo de divergencia genética entre estos dos taxones es de 9188 años (intervalo de confianza al 95% de 5,689–13,093 años) (Matsuoka, Y. et al, 2002). A su vez, la diversidad nucleotídica presente en maíz y ssp. *parviglumis* en comparación con otras especies de teocintle, indica que hubo un único evento de domesticación (Matsuoka, Y. et al 2002). La edad propuesta coincide con la estimación de la edad de los fósiles más antiguos de mazorcas de maíz de los que se tiene registro, los cuales fueron descubiertos en las cuevas de Guilá Naguitz en el Valle de Tehuacán en el estado de Puebla (Benz, 2001) y fechados mediante el método de Carbono 14 en 6250 años A.P. (Piperno y Flannery, 2001).

A nivel de genética del desarrollo, esta hipótesis está sustentada en análisis moleculares de genes reguladores de la transcripción, que han sido considerados los principales responsables de la diferencia fenotípica entre el maíz y ssp. *parviglumis*. En una primera aproximación, las diferencias entre estas dos subespecies fueron analizadas mediante cruza controladas entre ellas para después llevar a cabo los análisis de Loci de Caracteres Cuantitativos (QTL por sus siglas en inglés). A partir de estos primeros estudios, se mapearon QTL particulares a regiones cromosómicas específicas, las cuales han comenzado a ser analizadas con el fin de estudiar las bases moleculares de las diferencias morfológicas entre maíz y teocintle. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que algunas diferencias se deben a variación en loci únicos, otras a diferencias aditivas en varios genes y finalmente otras se deben a variación en algunos loci con efecto preponderante y en otros con efecto menor. Por ejemplo, el gen *tga1* (teosinte glume architecture 1) que

¹ Hoy en día se utiliza comúnmente esta clasificación para agrupar a varios grupos de Poales que conforman un grupo monofilético determinado a partir de análisis cladistas, sin embargo es importante señalar que PACCAD es una hipótesis evolutiva aún por corroborarse a partir de estudios de evolución molecular y genética del desarrollo que abarquen especies de los diferentes géneros agrupados en este clado.

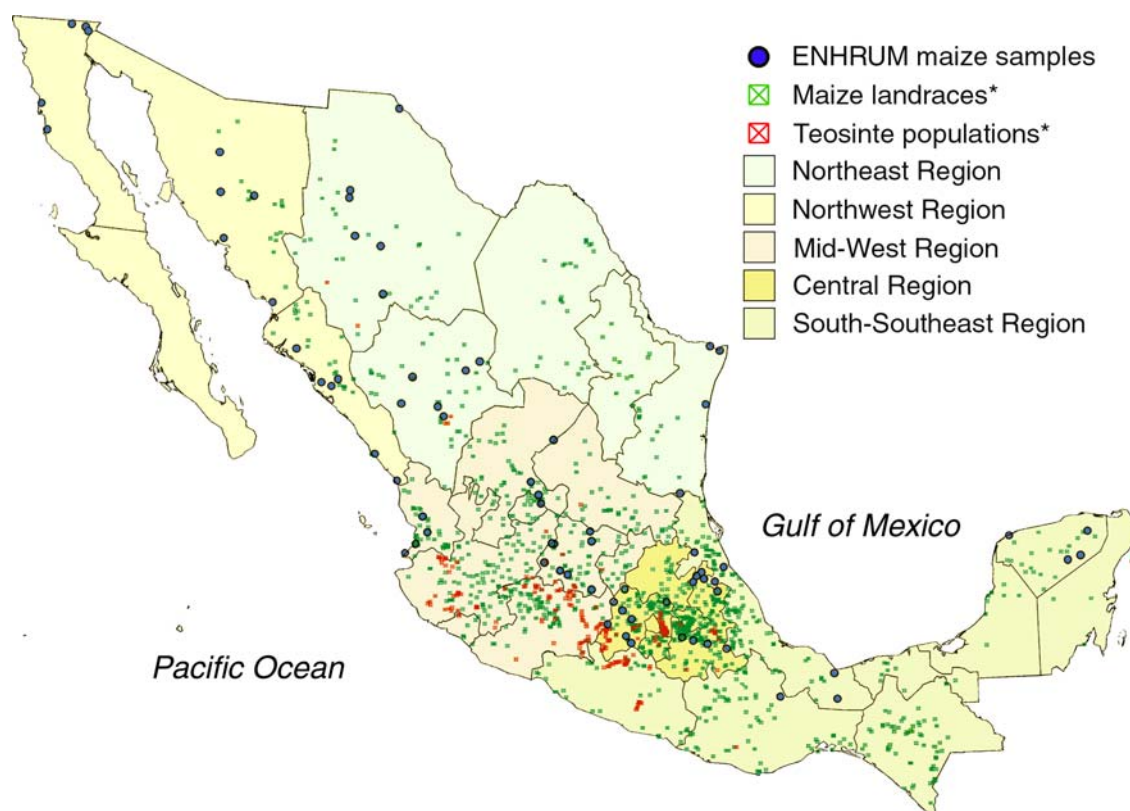
controla el desarrollo de la gluma, cubierta dura con cristales de sílice que cubre las semillas del teocintle (Dorweiler et al, 1993) ha sido estudiado a nivel fenotípico utilizando tanto poblaciones de teocintles a los que se les introgresó el alelo de maíz, como poblaciones de maíz a los que se les introgresó el alelo de teocintle. En ambos casos, la progenie presenta fenotipos intermedios entre teocintle y maíz. El análisis molecular de estas poblaciones apunta a que una mutación no sinónima en un codón presente en el primer intrón del alelo de maíz para este gen, genera el cambio de una lisina (K) por una Asparagina (N) en la posición seis de la secuencia de aminoácidos, que es suficiente para disminuir el tamaño y dureza de la gluma, contrayéndola al eje central (contribuyendo así a la formación del raquis central u "olote"), y disminuir la acumulación de sílice en la misma, generando los granos "desnudos" característicos del maíz (Wang *et al*, 2005). Otro gen importante para explicar las diferencias de la morfogénesis de estas dos subespecies es *tb1* (teosinte branched 1), cuyo alelo de teocintle favorece la ramificación. En el maíz el promotor de este gene se encuentra mutado y genera menos RNAm y proteína, lo que favorece un eje central sin ramas (Doebley *et al*, 1995). Los genes que hasta ahora se han caracterizado como responsables de las diferencias en el desarrollo de maíz y teocintle codifican para factores de transcripción. Sin embargo, la intensidad de su efecto en el fenotipo es contexto dependiente ya que la introducción aislada de un alelo u otro, no produce un fenotipo tan marcado como el observado en el maíz o teocintle, según el caso, o como el que resulta de la inserción de varios genes. Esto apunta a que si bien dichos genes son importantes, existen interacciones epistáticas con otros genes, que contribuyen también a la determinación de los fenotipos (Doebley, 2004). El trabajo al respecto, se ha centrado hasta ahora en los genes que subyacen tres rasgos fundamentales que distinguen al maíz de su antecesor: espigas masculinas sencillas vs pareadas; mazorca dehiscente vs mazorca sólida y paso de distiquia a la polistiquia (Buckler y Stevens, 2006).

1.3. Diversidad actual de razas de maíz y teocintles en México

El maíz se convirtió en un cultivo fundamental para los pueblos prehispánicos de Mesoamérica y su cultivo se fue expandiendo a otras regiones. El mejoramiento continuo por parte de los agricultores asentados en áreas con condiciones edáficas, climáticas, altitudinales y agroecológicas contrastantes ha generado una enorme variedad de razas y poblaciones nativas adaptadas a diversas condiciones y requerimientos agronómicos (Ortega Paczka 2003). El mejoramiento de estas poblaciones no es un proceso acabado y se sigue llevando a cabo en un proceso de "mejoramiento autóctono continuo", término acuñado por el Dr. Antonio Turrent para sintetizar el proceso realizado por los agricultores de comunidades rurales tradicionales (Turrent y Serratos, 2004). Ellos conservan semilla de un ciclo agrícola a otro, seleccionando en cada generación aquellas mazorcas con características deseadas, como precocidad, tamaño de la mazorca, tamaño del grano y olote, color, consistencia, etc. Este proceso ha dado como resultado al menos 41 razas distintas de maíz (Sánchez 2000, citado por Ortega, 2003) y se siguen descubriendo nuevas razas (Astier, y Barrera., 2006). Dichas razas,

definidas como “una población con un conjunto sustancial de características en común que la distinguen como grupo y la diferencian de otras poblaciones, con capacidad de transmitir con fidelidad dichas características a las generaciones posteriores y que ocupa una área ecológica definida” (Hernández Xolocotzi y Alanís, 1970, p.8; citados por Ortega, 2003), se encuentran distribuidas en todo el territorio de nuestro país, aunque algunas están presentes en mayor abundancia que otras y algunas, como la raza Tehua, están casi extintas. Para más información consultar el artículo de Ortega (2003). En la figura 2 se presenta un mapa con la distribución de este conjunto de razas de maíz y de sus parientes silvestres en México.

Figura 2. Distribución actual de diferentes razas de maíz y especies de teocintle en México



Utilizada con permiso del Dr. José Antonio Serratos Hernández. Los puntos verdes son registros de variedades criollas de maíz y los puntos rojos son sitios de colecta de diferentes especies de teocintles. Ver figura a color al final de este documento

1.4. El maíz en México y el mundo

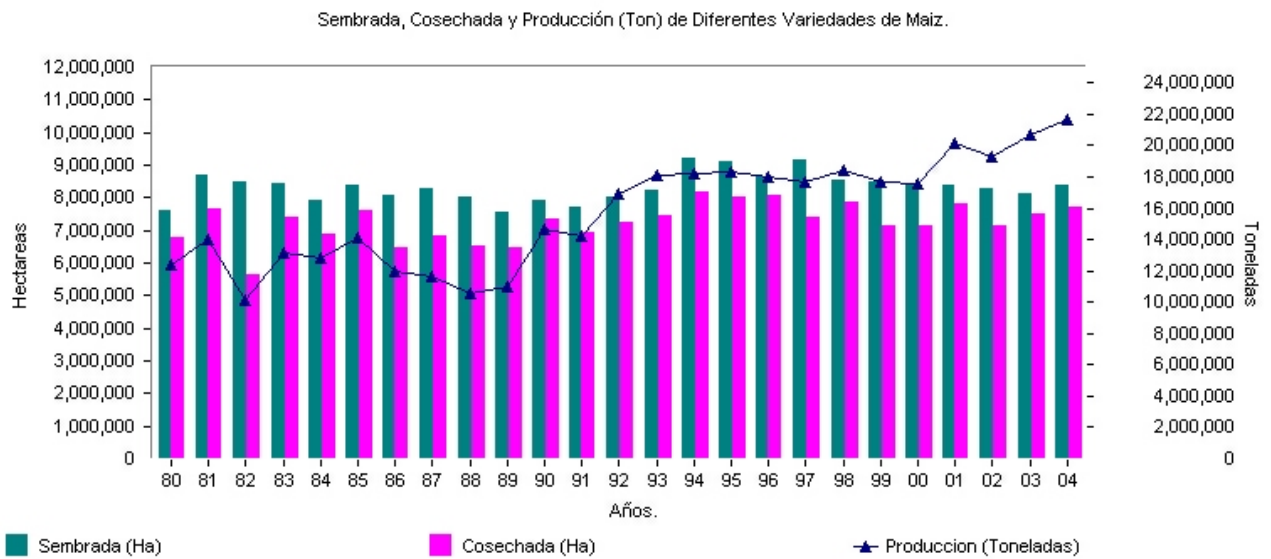
En lo que atañe a las poblaciones humanas presentes en el continente Americano, el cultivo de esta gramínea fue fundamental para el desarrollo de las diferentes civilizaciones mesoamericanas a partir de los Olmecas (1500 a 300 AC), quienes consideraban al maíz como piedra angular de su cultura, no solamente en el aspecto alimenticio, sino también cultural y religioso, siendo su principal deidad, el dios del maíz –más tarde representado como *Jun NaI Ye* por los mayas, o Quetzalcóatl por los mexicas- como la encarnación de la “fertilidad, el renacimiento, la abundancia, la riqueza y la vitalidad cósmicas” (Florescano, 2003). La tendencia a

equiparar las diferentes etapas del desarrollo de esta planta (siembra, germinación, crecimiento, reproducción y muerte) con las etapas por las que atravesó el dios del maíz para fundar el cosmos, los seres humanos y la civilización, fue una constante en las culturas mesoamericanas desde los Olmecas, pasando por los mayas, los teotihuacanos y los mexicas. También funcionó como medio legitimador de la organización política de las teocracias mesoamericanas, ya que los gobernantes eran, de manera directa, representantes del dios del maíz (Florescano, 2003). Para la llegada de Cristóbal Colón, la mayoría de las civilizaciones americanas –tanto al norte como al sur de mesoamérica- habían adoptado el maíz como un cultivo importante dentro de su dieta básica (Sauer, 1993).

A su regreso de lo que sería el continente Americano, Colón llevó maíz procedente de las Antillas a España, que fue sembrado en Europa por primera vez en 1493. El poseer un ciclo reproductivo relativamente corto y producir una gran cantidad de biomasa, así como frutos conspicuos, favoreció que para 1500 esta planta fuera sembrada de manera abundante y reiterada en otras partes de Europa, donde se convirtió en un grano básico para los pobres de la región, en particular en España, Italia y Francia. De igual manera, en los siglos XVI y XVII este cultivo fue introducido a África por marineros portugueses, quienes también lo introdujeron en India y las islas de la Polinesia. Desde el siglo XVI, el maíz era ya un cultivo importante en China y las Filipinas. Para el siglo XVIII esta planta se había convertido en un cultivo cosmopolita, siendo importante como alimento básico y forraje en diferentes partes del mundo (Sauer, 1993), estatus que mantiene hasta la fecha.

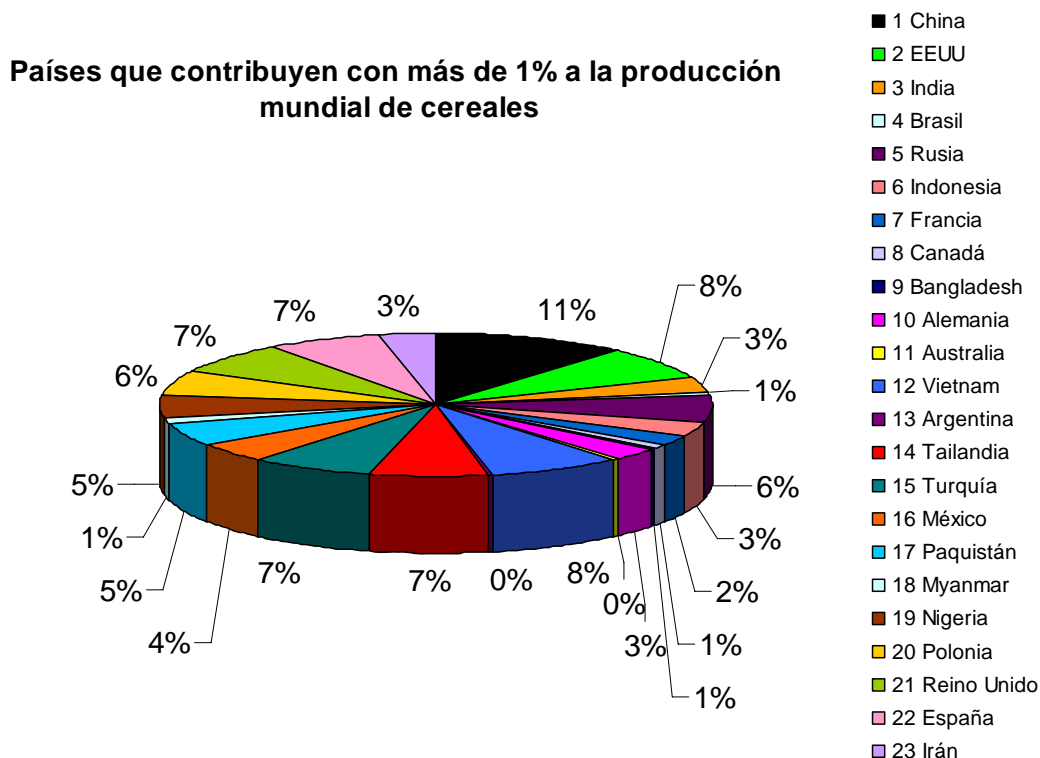
En la actualidad, ocupa el segundo lugar en extensión sembrada en el mundo después del arroz y es la base de la alimentación para muchos países en desarrollo, tanto de América Latina como de África y Asia. También, es un insumo del que se extraen aceite, fructosa y otros derivados importantes para la industria. En México, el cultivo de esta planta ocupa dos terceras partes de la superficie dedicada a la agricultura, con un volumen de producción que se ha visto ligeramente incrementado en los últimos años. A continuación se presenta una figura con el volumen de maíz producido en nuestro país en los últimos veinte años.

Figura 3. Volumen de producción de diferentes variedades de maíz en México entre 1984 y 2004.



Fuente: Figura sacada de la página web de SIAP, SAGARPA: www.sagarpa.gob.mx

Figura 4. Países que contribuyeron con más de 1% a la producción mundial de cereales en 2003



En este figura se grafica el porcentaje de contribución relativa a la producción de cereales de aquellos países que produjeron más del 1% del volumen mundial de estos granos en el 2003. El porcentaje señalado en esta figura es relativo a estos 23 países. La información para elaborar este gráfico fue obtenida de la página web de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) : <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Ver figura a color al final de este documento

En el ámbito internacional, 23 países produjeron en 2003 el 82.17% de todo el maíz cultivado a nivel mundial (ver figura 4). México se encuentra en el lugar 16 con una contribución del 1.47% a nivel mundial que equivale a 30,565,504 toneladas de cereales (trigo, arroz, maíz, cebada, centeno, avena, mijo y sorgo, principalmente) según lo estimado por la FAO. Este nivel de producción lo ubica entre Turquía y Pakistán. Si tomamos en cuenta los datos de producción de maíz para ese mismo año según lo publicado por la FAO, éste grano contribuye con más de dos terceras partes en la producción de cereales en México, con 20,701,400.00 toneladas para ese mismo año y 20,500,000 toneladas para el 2005. Esto pone en evidencia la importancia de este cultivo para nuestro país.

1.5. Mejoramiento agronómico y selección artificial en maíz

Tomando en cuenta las cifras anteriores sobre producción maicera en el mundo, es importante señalar que uno de los factores que propició el auge del maíz como cultivo fundamental para la alimentación e industria fue la gran adaptabilidad de esta especie a diferentes condiciones ambientales y la posibilidad de seleccionar líneas específicas con características agronómicas útiles para diferentes fines. Si bien el mejoramiento genético de esta planta ha sido un proceso continuo desde su aparición, llevándose a cabo por parte de todos aquellos agricultores que seleccionan semilla de una cosecha para plantarla en la siguiente temporada, la agricultura de tipo industrial se fortaleció a partir del redescubrimiento a principios del siglo pasado de las leyes de la herencia postuladas por Mendel. Esto permitió llevar a cabo un mejoramiento genético más sistemático, integral –en cuanto a seleccionar no únicamente características de la mazorca sino también características vegetativas de la planta- y rápido, impulsando la selección de características agronómicas relevantes –tamaño de la planta, tamaño de la mazorca, etc.-. Además, la investigación y desarrollo de fertilizantes químicos y pesticidas, contribuyeron al establecimiento de paquetes tecnológicos que favorecieron un incremento sustancial en el rendimiento de este cultivo dentro del esquema de agricultura industrial. Dicho fenómeno sería conocido como la “Revolución Verde” el cual inició en los años sesenta del siglo pasado (Khush, 2001).

Mientras esto sucedía en los incipientes campos de la agronomía y genética cuantitativa, la profundización en el estudio de las bases moleculares de la herencia continuó y a partir de 1953, cuando James Watson y Francis Crick describieron la estructura del ADN, la posibilidad de manipular las moléculas de la herencia - ADN y ARN- se volvió una realidad que más tarde se materializaría mediante las síntesis y uso de ADN quimérico recombinante usando enzimas de restricción y técnicas de clonación. Los primeros estudios y aplicaciones de esta tecnología se llevaron a cabo en bacterias y para 1987 se creó la primera planta transformada con ADN recombinante: una planta de tabaco que expresaba una luciferasa y por lo tanto, fluorecía en la oscuridad (Ow, *et al*, 1985).

A partir de este momento, la investigación sobre los métodos para introducir ADN recombinante en plantas se intensificó y una serie de métodos fueron elaborados. En la siguiente sección de esta tesis se abundará sobre los métodos de transformación, sus implicaciones a nivel de remodelación de cromatina que afecta la expresión de los genes introducidos, así como los métodos utilizados para la detección de transgenes.

2. TRANSGÉNESIS EN PLANTAS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA

2.1. Métodos de transformación en plantas

Existen diferentes métodos de transformación en plantas que utilizan métodos físicos, químicos o biológicos (vectores) para introducir una secuencia de ADN exógeno o transgen al genoma de una planta que al incorporarlo se vuelve transgénica. Las secuencias producto de la tecnología de ADN recombinante son quiméricas al incorporar secuencias de distintos organismos que se cortan mediante enzimas de restricción de extractos de ADN o cADN; este último, producto de la extracción de ARN y retrotranscripción para obtener cadenas de ADN sin intrones. Estas secuencias quiméricas o cassettes de transformación están constituidos, como mínimo, por un promotor que dirige la expresión espacio-temporal del gen de interés, el gen de interés y una secuencia de término o terminador de la transcripción. Además, las líneas que han sido transformadas mediante cultivos bacterianos contienen secuencias flanqueadoras que permiten la inserción de un fragmento exógeno en un genoma blanco de transformación. Finalmente, todas las líneas comerciales disponibles por ahora tienen también secuencias que confieren resistencia a antibióticos que se usan para seleccionar las líneas transgénicas. La secuencia recombinante se inserta en el núcleo de una célula totipotencial en el caso de la transformación de callos y el uso de cultivo de tejidos o de meristemos aéreos en el caso del método de transformación mediante cultivos de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, en donde el cassette es incorporado al genoma de la célula mediante procesos de recombinación ilegítima o no homóloga mediados por la maquinaria subcelular de reparación del ADN. Los cassettes de transformación generalmente se encuentran dentro de un plásmido de transferencia, llamado vector primario. En algunos métodos de transformación directa, el cassette se introduce sin el plásmido (por ejemplo, electroporación).

Hay dos estrategias generales para transformar plantas, la primera es la introducción de ADN en el gametofito o diferentes tejidos que lo conforman (transformación *in planta*), mientras que en la segunda se utilizan cultivos celulares de tejidos poco diferenciados que pueden ser de origen esporofítico o gametofítico que después de haberseles introducido la construcción de interés, son regenerados en plantas completas.

Transformación *in planta*:

En este método se introduce el ADN de interés al gametofito o gametos (pueden ser cigotos o tejido pregamético) antes de la fertilización, mediante la generación de heridas en el tejido que se quiere transformar (normalmente los botones florales), para después inducir la infección por *Agrobacterium tumefaciens* al embeber a la planta en una solución que contenga a esta bacteria que a su vez contiene un plásmido Ti con el transgen de interés. Este método ha sido poco reproducible con la excepción de algunos sistemas

experimentales como *Arabidopsis thaliana*, tabaco, petunia y otras plantas en donde es rutinariamente utilizado. Este método permite transformar genéticamente a la línea germinal y se obtienen transformantes estables. A continuación se describen los métodos de transformación más usados en la transformación de otras especies de plantas.

Métodos biológicos

Transformación vía infección por *Agrobacterium tumefaciens*.

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria *gram* negativa que crece comúnmente en el suelo y que tiene la habilidad de infectar plantas causándoles crecimientos de tipo neoplásico conocidos como agallas, mediante la introducción de un plásmido llamado Ti, el cual tiene como característica el poseer genes *vir* que codifican para proteínas de unión a ADN que favorecen el rompimiento del ADN de doble cadena del hospedero y permiten la inserción de ADN de la bacteria que se encuentra en cadena simple. Este ADN, llamado de transferencia o ADN-T, es incorporado al genoma de la célula vegetal, desplazando a las proteínas *vir* y regenerando la doble cadena. Este ADN-T codifica para fitohormonas (auxinas y citoquininas) así como enzimas que catalizan la producción de opinas. Las fitohormonas son responsables de la proliferación celular descontrolada, mientras que las opinas son usadas como alimento de *A. tumefaciens*. (Twyman et al, 2002).

Para transformar plantas, se han creado cepas "desarmadas" de *A. tumefaciens* en donde al plásmido Ti se le elimina el ADN-T endógeno y se sustituye por el cassette de transformación con el transgén o transgenes de interés flanqueado por fragmentos de este ADN-T, para después infectar a las células o plantas con esta bacteria y que se lleve a cabo la transferencia de la secuencia quimérica construida por las técnicas de ADN recombinante al genoma de la planta infectada.

Transformación *in vitro*:

En este caso, no se utilizan plantas completas si no ciertos tejidos que han sido, mediante tratamientos hormonales y nutricionales, inducidos a "revertirse" de linaje celular diferenciado a un estado totipotencial.

Métodos físicos.

En este caso, todos los métodos parten del uso de ADN de cadena doble, organizado en un cassette de transformación el cual a su vez está incluido en un vector, generalmente un plásmido de origen bacteriano el cual sirve tanto para su reproducción en bacterias (clonación) como para su introducción en plantas. Ya que se ha purificado el vector con el cassette de transformación, las células vegetales en cultivo sólido o líquido son sometidas a diferentes tratamientos para, primero, eliminar la pared celular (quedando como protoplastos) y

después aumentar la porosidad de su membrana, favoreciendo la entrada del ADN recombinante al citoplasma y más tarde al núcleo, donde es incorporado por recombinación ilegítima. Se han desarrollado diferentes métodos tales como; la microinyección; la electroporación; introducción mediada por láser; introducción mediada por PEG (polietilenglicol); el Vórtex con hebras de carbamida de silicón y la biobalística. De todos los métodos de transferencia directa mencionados, cuatro han sido los más exitosos para transformar cereales como el maíz, arroz, trigo y cebada, éstos son: la transformación de protoplastos, la electroporación de tejido, la introducción de ADN mediante vórtex con hebras de carbamida y la biobalística. Varios de estos métodos fueron ampliamente utilizados durante la década de los noventa del siglo pasado ya que, en contraste con diferentes especies de dicotiledóneas, la transformación de monocotiledóneas por métodos biológicos era poco exitosa hasta 1994, cuando se lograron aislar cepas de *A. tumefaciens* cuyos plásmidos Ti tenían un mayor número de copias de genes que codificaban proteínas *vir*. Otro factor que ha contribuido al éxito de la transformación de este tipo de plantas ha sido el cultivo de callos embriogénicos. A continuación se presenta una tabla con las ventajas y limitaciones de cada método (ver Tabla 1).

En el caso de los métodos no biológicos, después de introducir el ADN de interés, es necesario regenerar el tejido indiferenciado para obtener una planta completa. Existen dos estrategias generales:

1) Embriogénesis somática: después de introducir el ADN de interés, las células somáticas transformadas, normalmente cultivos celulares o callos, son inducidas a diferenciarse en estructuras pseudo-embrionarias que producen raíces y vástago aéreo, dando paso a una planta completa. El proceso de regeneración es estimulado con la aplicación de fitohormonas y nutrientes en combinaciones adecuadas.

2) Organogénesis: este método aprovecha la capacidad de algunos tejidos vegetales (hipocotilos, cotiledones, hojas, etc.) de reorganizarse a nivel celular para producir meristemos aéreos, los cuales posteriormente son inducidos a producir raíz para dar paso a una planta completa. Alternativamente, estos meristemos aéreos pueden ser injertados a raíces para regenerar una planta completa.

Elementos moleculares mínimos presentes en un cassette de transformación

- Gen exógeno o transgen
- Promotores
- Terminadores
- Marcadores de selección
- Secuencias flanqueadoras de ADN-T

Una vez que se ha introducido un cassette, se lleva a cabo un tamizado que permite distinguir las plantas en donde la inserción del transgen ha sido exitosa mediante el uso de marcadores genéticos presentes en el

plásmido y/o en el cassette utilizados para transformar la célula o en otro plásmido que es introducido a la par del vector que lleva el transgen de interés. Estos marcadores de selección suelen ser genes de origen bacteriano que codifican proteínas que confieren propiedades como la resistencia a un antibiótico particular, o a un herbicida; que codifican para una proteína visible bajo cierta iluminación o permiten a la planta transformada usar sustratos que normalmente no podría metabolizar (estos últimos son llamados marcadores de "selección positiva") (Barceló, et al, 2001).

Las células o callos transformados que hayan incorporado exitosamente el cassette de transformación y/o el gen marcador en su genoma podrán crecer en un sustrato al que se le ha añadido una cantidad del compuesto restrictivo, ya sea un antibiótico, herbicida o carbohidrato, mientras que las células o callos que no hayan incorporado el cassette íntegro no podrán crecer. En el caso de los marcadores visibles, las plantas transformadas generarán una proteína o pigmento particulares que permitirá diferenciarlas de las plantas no transformadas. A partir de este primer paso de selección, las células o callos transformados son cultivadas en medios ricos en nutrientes y fitohormonas (auxinas y/o citoquininas) con el fin de regenerar una planta completa a partir de un callo o cultivo celular. Es importante resaltar que cada planta o callo incorpora la secuencia quimérica en un sitio distinto e impredecible del genoma y la expresión y efecto fenotípico de las proteínas codificadas por el transgén depende en cierta medida de la localización genómica. Este aspecto es importante de considerar en las discusiones de suficiencia tecnológica, riesgos y biomonitorio de los transgenes una vez que se liberan al ambiente y pueden introgresarse en otros genomas.

Utilizando las técnicas anteriores, en particular la biobalística, se han desarrollado un sin fin de líneas transgénicas de diferentes monocotiledóneas, siendo el arroz y maíz especies a las que se les ha invertido una buena cantidad de recursos y esfuerzo por parte de grupos de investigación públicos y privados. En el caso de *Zea mays ssp mays*, a la fecha existen más de 21 eventos comerciales liberados al ambiente en Estados Unidos (www.agbios.com). En la siguiente sección se abordará la situación actual de los cultivos genéticamente modificados que más se han utilizado –dentro de los que se incluyen diferentes líneas de maíz transgénico- .

Tabla 1. Métodos más utilizados para la transformación de gramíneas.

MÉTODO	TEJIDO UTILIZADO	USO DE MS	USO FT	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Transformación de protoplastos	Células indiferenciadas en suspensión	Necesario	Sí	Alto porcentaje de plantas transformadas con expresión estable; útil para probar vectores de transformación y seleccionar en etapa de cultivo de tejidos	Necesario uso de Suspensiones de células embrionarias que: - pierden su capacidad embriogénica con el tiempo - acumulan anomalías - Tendencia a que se inserten muchas copias del transgen
Vórtex con fibras de carbamida de silicón	Células embriogénicas en suspensión	Necesario	Sí	Método simple Uso de poco equipo especializado	Restringido a tejidos particulares Las fibras son dañinas para la salud
Electroporación	Células indiferenciadas en suspensión, callos, explantes: embriones inmaduros, inflorescencias	Necesario	Sí	Diversidad de tejidos útiles Tendencia a presentar bajo número de copias del transgen	Técnicamente más complicado Manejo de tejidos post transformación es complicado
Biobalística	Meristemos apicales, embriones, callos	Necesario	Sí	Es independiente del tipo tejido y especie/genotipo Requiere poca preparación del tejido a transformar Método más exitoso para transformar cereales	El tejido u órgano debe ser separado de la planta
Infección con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Botones florales, callos, Tejido vegetativo	Necesario	No	Alta eficiencia de transformación estable Tendencia a presentar bajo número de copias del transgen Posibilidad de transferir transgen y marcador de selección en vectores separados para segregarlos después No necesita fitohormonas en transfecciones in planta	Transferencia de fragmentos indeseados del plásmido Ti Necesario pasar de vector primario a secundario Cereales solían ser recalcitrantes a infección

En las últimas décadas se han probado diferentes métodos físicos y químicos para introducir ADN exógeno a plantas. En todos los métodos la finalidad es poder penetrar la pared celular del tejido o célula a transformar para introducir el casete de transformación deseado. A la fecha se ha utilizado ultrasonido, láser, microinyección y embebimiento de ADN *in planta*, sin embargo todos estos métodos han sido poco exitosos para la expresión estable del constructo en gramíneas, salvo el caso del uso de láser para la introducción de ADN en arroz (Barceló, et al 2001) donde sí se ha obtenido expresión estable del constructo. A continuación se presenta una tabla que resume los métodos de transformación más exitosos en gramíneas, haciendo especial énfasis en la transformación con *A. tumefaciens* y biobalística, que son las técnicas más utilizadas a la fecha. Claves: MS, marcadores de selección; FT, fitohormonas.

2.2. Técnicas de detección de transgenes y sus productos

Después de transformar un cultivo celular o planta es necesario averiguar si la transformación fue exitosa. Una de las formas de determinarlo es analizar la expresión del marcador de selección, al someter las plantas transformadas a un medio selectivo que contenga la sustancia a la cual son resistentes si la transformación fue exitosa. Esta aproximación es ya un paso rutinario cuando se analizan plantas transformantes, sin embargo, esta aproximación permite saber si el transgen que codifica para el marcador de selección ha sido incorporado adecuadamente y no garantiza la correcta expresión de otro transgen con el que se haya cotransformado a una planta. En algunos casos, el gen de resistencia pudo haberse insertado pero no se expresa por represión o silenciamiento epigenético (por ejemplo, metilación). Para ello, la técnica más utilizada es la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés), con la que se detecta el gen de interés, ya que si éste se encuentra presente, habrá una amplificación exitosa al llevar a cabo una reacción de PCR utilizando oligonucleótidos específicos para la secuencia que se busca. Con variantes de esta misma técnica se pueden determinar, además, las secuencias flanqueantes al transgen, ya sea por PCR inverso o TAIL-PCR. Además, se puede establecer el número de copias de un transgen específico. Estas dos técnicas se basan en diseñar oligonucleótidos o cebadores que se anclan dentro de una secuencia conocida (por ejemplo, el promotor, el transgen o el terminador) pero en lugar de que uno de los oligonucleótidos se dirija en dirección 3' a 5' y el otro en dirección 5' a 3', ambos se dirigen en dirección 5' a 3', es decir, hacia fuera de la secuencia conocida, con lo cual empezaran a amplificar una parte de la secuencia desconocida que se quiere determinar. Cada técnica tiene sus variaciones, sin embargo, en ambos casos, se pueden aislar y clonar los fragmentos de PCR amplificados y secuenciar con el fin de determinar las secuencias flanqueantes.

Otra técnica ampliamente utilizada en el análisis pos-transformación es la hibridación DNA-DNA tipo Southern blot, con la cual se puede determinar el número de copias del transgen o secuencias reguladoras no codificantes (promotores y terminadores) que han sido incorporadas al genoma de la planta, mientras que por otra técnica similar llamada Northern blot que implica una hibridación ADN-ARN, se puede determinar la cantidad de RNAm producido de un transcrito particular, así como estimar cualitativamente el grado de expresión de un transgen. Esta última técnica sirve únicamente para observar los productos de secuencias codificantes; no es útil para determinar la presencia de secuencias reguladoras. En contraste, el PCR sí permite amplificar ADN genómico para buscar si están insertadas secuencias regulatorias producto de la biotecnología.

Para determinar el nivel de expresión de las proteínas recombinantes se usan métodos de inmunoensayo mediante hibridación proteína-proteína (anticuerpos específicos), llamada Western blot, que sirve para determinar si se expresa una proteína recombinante particular y en que nivel. Otra técnica usada para el mismo fin se en una

reacción inmunológica donde la proteína de origen recombinante es detectada por una reacción antígeno-anticuerpo particular. Esta técnica, conocida como ELISA (Enzyme Linked Inmunosorbent Assay) por sus siglas en inglés, se puede montar para cualquier proteína y actualmente existen varios kits comerciales que hacen a esta técnica muy práctica. Estos kits se han desarrollado para la detección de las proteínas transgénicas más comunes en cultivos transgénicos comerciales, como son las diferentes versiones de proteínas Cry, EPSPS y PAT (www.agbios.com).

Estas mismas técnicas, más otras que se mencionan en la tabla 2, han sido utilizadas para llevar a cabo labores de biomonitorio de OGMs, es decir, detectar la presencia de transgenes en plantas, semillas o sus derivados (alimentos procesados, aceites, etc.) tomadas de distintas partes de la cadena productiva (campo, contenedores industriales, harinas, alimentos procesados). El biomonitorio también se puede hacer mediante métodos de observación indirecta, al caracterizar la respuesta fisiológica de, por ejemplo, la aplicación de herbicidas u otros marcadores de selección. Pero en ocasiones es más seguro determinar si están presentes las proteínas o genes recombinantes mediante las técnicas moleculares enlistadas arriba, pues la gran mayoría de los organismos transgénicos no se distinguen visualmente de los no transgénicos. Este hecho hace que el biomonitorio sea técnicamente complicado y costoso.

Existen distintos niveles de análisis posibles durante el biomonitorio: (i) determinar la presencia o ausencia de secuencias recombinantes provenientes de OGMs en una muestra particular, (ii) estimar los niveles de expresión de las proteínas recombinantes y las frecuencias particulares de las secuencias recombinantes en una muestra de individuos, y finalmente (iii) determinar el evento específico del cual se derivaron las secuencias recombinantes. Cuando se trabaja con grandes volúmenes de muestra (por ejemplo semillas u harina de un contenedor industrial) es necesario establecer un criterio de muestreo que garantice la representatividad estadística de la submuestra, así como la sensibilidad de los análisis para establecer el rango de error de los mismos. En conclusión, es importante considerar de manera clara y explícita el diseño estadístico de muestreo y la sensibilidad de los métodos moleculares usados para establecer los niveles de confianza asociados a los estimados de frecuencia de transgenes. Desgraciadamente, no se ha invertido suficiente esfuerzo o recursos para establecer estos criterios a pesar de que ya han sido liberados al ambiente bastantes líneas transgénicas. Para el caso de los cultivos para los que México es Centro de Origen y Diversidad esto cobra relevancia particular pues las líneas transgénicas serán capaces de entrecruzarse con las no transgénicas y podrán dispersarse en el ambiente y también evolucionar. Este aspecto es también fundamental para tener capacidad de biomonitorio ambientes y poblaciones en donde se sospeche que pudiera haber habido un escape no intencional de líneas transgénicas.

Como se observa en la tabla 2, la variedad de pruebas moleculares que pueden ser utilizadas para estimar la concentración de un OGM en una matriz particular, son mucho menores que las pruebas que se pueden usar para

únicamente detectar su presencia. Además, varias de las pruebas mencionadas en la tabla 2 son útiles únicamente si se trabaja con muestras poco procesadas, pues detectan la presencia de la proteína o sus precursores (ARNm) de origen recombinante que se degradan durante el procesamiento. En caso de usar pruebas de proteínas en estas muestras se pueden obtener falsos negativos. En esta categoría se encuentran las pruebas de ELISA, las tiras de flujo lateral, el Western blot, el Northern blot, y la prueba de resistencia fisiológica. Esta última si bien es una prueba relativamente económica y fácil de implementar, requiere forzosamente que las plantas bajo análisis estén vivas. Este método puede ser útil para determinar presencia de OGMs en cultivos en pie cuando se cree que la frecuencia es relativamente alta, por lo que no es necesario asperjar todo el campo de cultivo o todas las plantas, sino solo una muestra.

El grado de consistencia de las pruebas enumeradas en la tabla 5, no depende únicamente de la frecuencia de OGMs en una muestra (si es una muestra agregada) sino también, de varios factores bioquímicos que pueden afectar tanto la especificidad como la sensibilidad de las técnicas moleculares utilizadas. Por un lado, la presencia de sustancias contaminantes ajenas a la molécula que se quiere detectar –ya sea ADN, ARNm, proteína, ácidos grasos y otras macromoléculas como azúcares, fenoles, aceites, etc. pueden disminuir la eficiencia, especificidad y sensibilidad de diferentes técnicas como son las variantes de la prueba de PCR, en donde la presencia de las sustancias mencionadas puede ocasionar falsos negativos. En el caso de pruebas tipo ELISA, si la proteína blanco está en una muy baja concentración, se incuba por un tiempo muy breve la muestra o si se usan agentes de bloqueo en una concentración excesiva –como leche descremada- se pueden obtener falsos negativos. La utilización de controles positivos y negativos es fundamental para detectar este tipo de artefactos, así como aquellos que pueden generar falsos positivos.

En la tabla 2 se mencionan las restricciones analíticas conocidas para cada uno de los métodos de detección de transgenes o sus productos, así como su costo relativo, especificidad, sensibilidad en muestras individuales y agregadas así como el grado de capacitación técnica necesaria para desarrollar correctamente cada una de estas técnicas.

Tabla 2. Métodos de detección de OGMs utilizados para biomonitoreo.

MOLÉCULA QUE DETECTA	MÉTODO	COSTO	CAPACITACIÓN TÉCNICA	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD		RESTRICCIONES ANALÍTICAS
					M. Individual	M. Agregada	
ADN	PCR cualitativo	**	media	Alta	alta	media	Buena calidad del ADN necesaria para resultados reproducibles. Muy sensible a pequeñas cantidades contaminantes de templado
	PCR cuantitativo de punto final	**	media	Alta	alta	media	Buena calidad del ADN necesaria para resultados reproducibles. Muy sensible a pequeñas cantidades contaminantes de templado
	PCR cuantitativo de tiempo real	***	alta	Alta	alta	alta	Buena calidad del ADN necesaria para resultados reproducibles. Sensible a pequeñas cantidades contaminantes de templado; gen reportero puede ser problemático (más de 1 copia en diferentes razas de la misma especie).
	Southern blot	***	Alta	Alta	baja	baja	Buena calidad y cantidad de ADN necesaria para resultados reproducibles, digestión y transferencia a membrana delicados. Sonda debe tener actividad específica precisa.
	Genosensores*		Baja	Alta	alta	baja	Secuencia- específico. Sensible a pequeñas cantidades contaminantes de templado
Proteína	ELISA	**	Media	Media	media	media	No útil para alimentos procesados donde la proteína se haya degradado. Puede presentar resultados artefactuales
	Western blot	***	Alta	Alta	baja	baja	Buena calidad de ARN necesaria para resultados reproducibles; cantidad de ARNm necesario es alta, transferencia a membrana delicados. Sonda debe tener actividad específica precisa
	Tira de flujo lateral	**	Baja	Media	media	media	Poca especificidad en proteínas relacionadas. No cuantitativa
	Prueba fisiológica	*	Baja	Alta	alta	-	Necesario llevarse a cabo in planta; concentraciones demasiado altas de herbicida pueden generar falsos negativos. No cuantitativa

MOLÉCULA QUE DETECTA	MÉTODO	COSTO	CAPACITACIÓN TÉCNICA	SPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD		RESTRICCIONES ANALÍTICAS
					M. Individual	M. Agregada	
Estructura celular	Espectroscopía Cercana al Infrarrojo	***	Alta	Alta	alta	baja	Baja capacidad de resolución en matrices con cantidades pequeñas de OGM; necesita calibrarse para cada OGM analizado; no distingue entre cambios puntuales en proteínas. No cuantitativa.
Ácidos grasos, triglicéridos	Cromatografía	**	Media	Alta	alta	baja	Útil sólo cuando hay cambios significativos en la composición grasa de un OGM. No cuantitativa

Un mayor número de asteriscos implica mayor costo de la técnica, tanto por los reactivos involucrados, como por la infraestructura implicada. La información para esta tabla está basada en los artículos de Anklam *et al*, 2002; Shehata, M., 2005 y Tripathi, L., 2005.

2.3. Secuencias “universales” en líneas transgénicas: el promotor 35S del CaMV y el tNOS

Cuando se utilizan técnicas de detección de transgenes basadas en ADN, en particular las diferentes variantes de la prueba de PCR, se puede recurrir a la amplificación de secuencias que han sido comúnmente utilizadas en la transformación de la especie que se está analizando. En el caso del maíz genéticamente modificado, varias secuencias han sido profusamente utilizadas para transformar las diferentes líneas de maíz transgénico presentes en el mercado a la fecha: la de mayor uso ha sido el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV, por sus siglas en inglés) y en menor medida, el terminador de la transcripción de la enzima Nopalina Sintetasa (tNOS) aislada de *Escherichia coli*, así como ciertos genes que codifican para la resistencia a antibióticos o herbicidas aislados de diversos organismos. Por ejemplo, el gen PAT, aislado de *Streptomyces viridochromogenes*. Si se realiza la prueba de PCR para amplificar el promotor 35S y el tNOS, se abarca el 100% de los eventos comerciales de maíz transgénico liberados al medio ambiente en Estados Unidos (ver tabla 4) que es el principal productor de OGMs del mundo.

Si se amplifica el promotor 35S y/o el tNOS de una planta, es seguro que esta ha sido transformada mediante técnicas de ADN recombinante o que estas secuencias se han insertado en su genoma por introgresión. La siguiente incógnita es qué secuencia específica está siendo regulada por estos genes. Para responder esto se realizan pruebas de PCR utilizando varios juegos de oligonucleótidos específicos para transgenes particulares, como Cry1Ab, CP4 EPSPS o combinaciones de oligonucleótidos que amplifiquen parte de la secuencia reguladora y del transgen que puede estar en el extremo 5' o 3' (Anklam *et al*, 2002). Esta última aproximación servirá para determinar eventos específicos y puede ser utilizada siempre y cuando se tenga suficiente información sobre las secuencias génicas que puedan estar río abajo o río arriba del promotor 35S o el tNOS, respectivamente. Esto puede ser problemático ya que las construcciones recombinantes están patentadas y generalmente la información para determinar dichas secuencias no está disponible y esto limita mucho la eficiencia y precisión del biomonitoreo. Por lo anterior, sería fundamental reglamentar la obligatoriedad de hacer disponible de manera clara y expedita el mapa de la construcción utilizada en un evento particular, la secuencia específica de todos los genes involucrados (promotor, transgen(es), terminador, marcador de selección, etc.). Sin embargo actualmente es muy difícil o imposible acceder a esta información completa y esto aumenta enormemente el esfuerzo que se requiere invertir en la detección de OGMs .

Si no se tiene conocimiento de las secuencias específicas a los extremos del amplicón obtenido, se puede recurrir a pruebas que son variantes de la PCR convencional en donde se utilizan pares de oligonucleótidos donde uno se ancla al interior de la secuencia conocida y amplifica hacia fuera de ésta, mientras que el otro oligonucleótido es inespecífico o degenerado (es decir, contiene secuencia cortas con alta probabilidad de anclarse

en algún sitio de la secuencia de Interés) amplifique en la dirección contraria al cebador que se ancla en la secuencia conocida. Así se logra amplificar un fragmento que contenga parte de la secuencia conocida y parte de una secuencia desconocida que puede ser analizada por secuenciación y comparación con genes conocidos. Esta técnica es conocida como PCR Inverso. La otra aproximación es similar: se digiere el ADN genómico con una enzima de restricción particular donde la secuencia de ADN que corta es conocida y utiliza un cebador que se ancle en un sitio contiguo al lugar de corte de la endonucleasa mientras que el otro oligonucleótido se ancla en la secuencia conocida. Lo anterior permite amplificar los extremos del corte de la endonucleasa utilizada, por un lado y la secuencia conocida, por el otro. El fragmento obtenido se secuencia y se compara con secuencias conocidas. Esta técnica es conocida como TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced PCR) y ha sido utilizada exitosamente para determinar construcciones completas en maíz (Matsuoka, T. *et al*, 2002). Después de la amplificación de una secuencia de ADN específica para un transgen en particular, muchos autores recomiendan realizar una prueba de Southern blot hibridando con una sonda específica con el fin de minimizar resultados artefactuales en el PCR. En Anklam *et al*, (2002) se resumen los ensayos de biomonitorio realizados en los principales cultivos para los cuales se han liberado transgénicos al ambiente.

Para minimizar la obtención de falsos negativos o positivos durante el biomonitorio es imprescindible contar con controles positivos y negativos para cada secuencia (promotor 35S, tNOS, PAT, Cry1Ab, etc), así como para cada evento que se pretende analizar (MON810, Nk603, 176, etc.). Estos controles permiten, por ejemplo, garantizar que la ausencia de amplificación no es producto de contaminación del templado con sustancias que impiden la amplificación de la secuencia deseada a pesar de que está presente, ni se descarta la posibilidad de que la presencia del fragmento esperado se deba a contaminación con ADN externo y no a la presencia del transgén en el genoma analizado.

Ahora bien, si no se tiene acceso a la información completa de los diferentes eventos de transformación liberados al ambiente para una especie dada la amplificación de secuencias "universales" como el promotor 35S y el tNOS es la aproximación más indicada. Es importante señalar que si bien el promotor 35S ha sido ampliamente utilizado y que los pares de oligonucleótidos utilizados para amplificar un fragmento de esta secuencia se consideran universales, existen por lo menos ocho variantes registradas de esta secuencia (Hemmer, 1997, citado en Anklam *et al*, 2002). Esto abre la posibilidad de que no sea posible amplificar esta secuencia a pesar de que se encuentre en el genoma analizado y con ello se produzcan resultados con falsos negativos.

En la tabla 2 se presenta un resumen de todos los eventos de maíz transgénico liberado al ambiente en Estados Unidos, con los detalles de las principales secuencias introducidas. Esta información es útil para

determinar cuáles son los probables eventos presentes al amplificar una secuencia general (35S, tNOS, PAT, etc.) en el caso de involucrar a un evento comercial.

Como se puede observar en la tabla mencionada, la utilización de diferentes cebadores que amplifiquen diferentes secuencias descartan ciertos eventos y otros no, por lo que para correlacionar una muestra analizada con un evento específico, se deben amplificar varios marcadores moleculares usando cebadores cada vez más específicos para el evento que podría haber sido el parental. También es posible amplificar secuencias que incluyan el borde entre algunos de los diferentes elementos genéticos involucrados.

2.4. Situación mundial de organismos genéticamente modificados (OGMs) de uso agrícola

A partir de 1996 se comenzaron a sembrar distintos cultivos genéticamente modificados a escala comercial. En el periodo comprendido entre 1996 y 2005 se han sembrado casi 1000 millones de hectáreas con OGMs; a la fecha, la mayor superficie cultivada con estos organismos se concentra en unos pocos países. En 2005, los cinco países con mayor producción de OGMs eran EU, Argentina, Brasil, Canadá y China, en donde se sembraron el 94.2% del área global de estos cultivos (ver tabla 3). En contraste, los países que integran la Unión Europea y Japón han mostrado una fuerte resistencia a la siembra de transgénicos dados los riesgos e incertidumbres implicados tanto en su uso como en su producción.

Los principales cultivares transgénicos sembrados a la fecha han sido, en orden de extensión: soya, maíz, algodón y colza. Las características modificadas en estos cultivares han sido, principalmente, la tolerancia a herbicidas y la resistencia a insectos, seguidas por cultivos con genes apilados para ambas. Así, en 2005, la tolerancia a herbicidas, introducida en el maíz, la canola y el algodón, ocupó 71%, o sea 63.7 millones de hectáreas de las 90.0 millones de hectáreas de transgénicos a nivel mundial, mientras que 16.2 millones de hectáreas (18%) se sembraron con cultivos Bt resistentes a insectos, y 10.1 millones de hectáreas (11%) con cultivos que contienen ambos genes apilados. Estas últimas líneas fueron las que tuvieron una representación proporcional mayor en 2004 y 2005, con 49% de aumento con respecto a años anteriores en comparación con un 9% de aumento para las líneas tolerantes a herbicidas y 4% para aquellas resistentes a insectos" (p. 4-5 James, 2005).

Tabla 3. Área Global plantada con OGMs desglosada por país (en millones de hectáreas).

País	Lugar	Área (millón de Ha)	Porcentaje del total	Cultivos GM
EU	1*	49.8	54.9	Soya, Maíz, Algodón, Colza, Calabacita, Papaya
Argentina	2*	17.1	18.9	Soya, Maíz, Algodón
Brasil	3*	9.4	10.4	Soya
Canadá	4*	5.8	6.4	Soya, Colza, Maíz
China	5*	3.3	3.6	Algodón
Paraguay	6*	1.8	2.0	Soya
India	7*	1.3	1.4	Algodón
Sudáfrica	8*	0.5	0.6	Soya, Maíz, Algodón
Uruguay	9*	0.3	0.3	Soya, Maíz
Australia	10*	0.3	0.3	Algodón
Mexico	11*	0.1	0.1	Algodón, Soya
Romania	12*	0.1	0.1	Soya
Filipinas	13*	0.1	0.1	Maíz
España	14*	0.1	0.1	Maíz
Colombia	15	0.1	0.1	Algodón
Irán	16	0.1	0.1	Arroz
Honduras	17	0.1	0.1	Maíz
Portugal	18	0.1	0.1	Maíz
Alemania	19	0.1	0.1	Maíz
Francia	20	0.1	0.1	Maíz
Rep. Checa	21	0.1	0.1	Maíz
TOTAL	21	90.7	100	

* 14 países mega-productores cultivaron 50.000 hectáreas o más de transgénicos. Nota: todas las cifras sobre la superficie en hectáreas están redondeadas a las 100.000 hectáreas más cercanas, lo que en algunos casos conduce a discrepancias inapreciables. Para descripciones más detalladas sobre la situación de cultivos transgénicos en cada país consulte la versión completa del *Brief* 34. Tabla modificada de: Clive James, 2005 Resumen ejecutivo Número 34 del Servicio Internacional para las Adquisiciones de Aplicaciones Agrobiotecnológicas (ISAAA, por sus siglas en inglés): <http://www.isaaa.org>

A decir de los proponentes del uso a gran escala de organismos genéticamente modificados en la agricultura, la intención es que en los siguientes diez años los cultivos transgénicos pasen de estar concentrados en países desarrollados (Estados Unidos concentra casi el 55% del área mundial sembrada con OGMs, ver tabla anterior) a estar preponderantemente en países en vías de desarrollo, en particular, países de África, América Latina y del

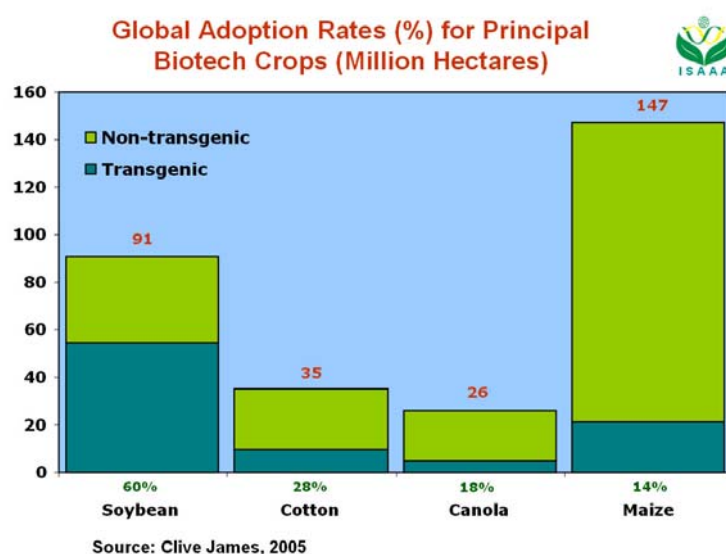


Figura 5. Porcentajes de adopción global para los cuatro cultivos transgénicos con mayor número de hectáreas sembradas (soya, algodón, colza y maíz).

continente Asiático, en particular China e India (para más información ver James, 2005).

Para ello, las corporaciones productoras y comercializadoras de OGMs están llevando a cabo una campaña intensa de propaganda y cabildeo con los gobiernos de los diferentes países blanco. Esto también implicaría el desarrollar transgénicos de otras especies según las necesidades de estos países (ver figura 3). El maíz es uno de los objetivos principales en este sentido, ya que este cultivo es fundamental en muchos países del tercer mundo y actualmente solo representa menos del 14% del área mundial plantada con este cultivo.

En este panorama, México es, sin duda, uno de los países más importantes para promover la siembra de maíz transgénico, ya que nuestro país se encuentra en los primeros lugares de producción de este grano a nivel mundial (ver figura 3) y el maíz representa las dos terceras partes de los cereales cultivados en México.

2.5. Uso y comercialización de maíz genéticamente modificado en el mundo y repercusiones para México.

A la fecha existen más de 21 eventos comerciales liberados al ambiente de *Zea mays* ssp. *mays* en Estados Unidos (www.agbios.com). El maíz fue uno de los primeros cultivos que se transformó genéticamente. Inicialmente esta planta fue transformada con el fin de responder preguntas de investigación básica relacionadas con la expresión de genes heterólogos en plantas y no fue hasta más adelante que se reconoció el potencial comercial de transformar esta planta para que expresara proteínas útiles en la agricultura. Diversos centros de investigación y empresas privadas invirtieron en este objetivo y para 1995 se libero al ambiente la primera línea de maíz genéticamente modificado –que expresaba una proteína Cry1Ab aislada de *Bacillus turingensis*. Esta proteína es es un endotoxina letal para ciertos tipos de lepidópteros. Esta línea fue liberada al ambiente a escala comercial en Estados Unidos bajo el nombre de NaturGard® (evento 176) comercializado por Syngenta Seeds Inc. (<http://www.agbios.com/dbase.php?action=ShowProd&data=176&format=LONG>). A partir de esta primera liberación varios eventos más siguieron y para el año 2000 ya se contaba con 16 eventos diferentes liberados en Estados Unidos (www.agbios.org). Para 2005, el área mundial sembrada con maíz transgénico fue de 21,2 millones de hectáreas, que representa el 24% del área global sembrada con OGMs (James, 2005).

2.6. Presencia del promotor 35S y tNOS en eventos comerciales de maíz transgénico liberados al ambiente: situación actual

Tabla 4. Eventos comerciales de maíz genéticamente modificado que han sido liberados al ambiente en Estados Unidos.

En esta tabla se omitieron aquellos eventos producto de cruza convencionales de diferentes eventos y eventos producto de mutagénesis. Dichos eventos no son considerados como modificación genética *per se* en Estados Unidos ni en México, aunque en Canadá sí se les concede este estatus. * Liberación en EU se refiere a liberación al ambiente, independientemente si ha sido aprobado para consumo humano. En la columna del nombre se agregó en azul el nombre comercial del evento cuando éste es conocido. FUENTES: AGBIOS (Agriculture and Biotechnology Strategies Inc.); GM crop Database; Genetic ID NA: a Field Guide to GMOs; FDA (U.S. Food and Drug Administration): List of completed Consultations on Bioengineered Foods. Lista de eventos registrados hasta octubre de 2005.

	NOMBRE DEL EVENTO	COMPAÑÍA	ORIGEN Y TIPO DE GENES INSERTADOS	PRESENCIA PROMOTOR 35S DEL CAMV	PRESENCIA DEL TERMINADOR NOS-T	CARACTERÍSTICA DESEADA	AÑO DE LIBERACIÓN EU*
1	176 Maximizer/ Knockout	Syngenta Seeds, Inc.	Cry1Ab: aislado de <i>B. turingiensis</i> subsp. <i>Kurstaki</i> Bar: aislado de <i>Streptomyces higroscopicus</i> . Pat: aislado de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> . Bla: beta-lactamasa: gen de selección	Sí 2 copias: una para expresar Cry1Ab y bar	No Terminador proveniente del CaMV (poli A)	Resistencia al barrenador europeo; tolerancia al glufosinato de amonio (bar y pat)	1995
2	676, 678, 680	Pioneer Hi-Bred International Inc.	Pat: aislado de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> . Dam: ADN adenin-metilasa aislada de <i>Escherichia coli</i>	Sí	No. Terminador derivado del inhibidor de proteasa II de <i>Solanum tuberosum</i>	tolerancia al glufosinato de amonio y esterilidad masculina	1998
3	B16 (DLL25) GR	Dekalb Genetics Corporation	Pat: aislado de <i>Streptomyces higroscopicus</i> .	Sí +promotor bacteriano	No. Señal de terminación: T-DNA número 7 (TR7)	Tolerancia al glufosinato de amonio	1995
4	BT11 (X4334CBR, X4734CBR) Yieldgard	Syngenta Seeds, Inc.	Cry1Ab: aislado de <i>B. Turingiensis</i> subsp. <i>Kurstaki</i> Pat: aislado de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> .	Sí 2 copias: 1 para cada transgen	Sí 2 copias: 1 para cada transgen	Resistencia a insectos; tolerancia al glufosinato de amonio (pat)	1996
5	CBH-351 StarLink	Aventis CropScience	Cry9c: aislado de <i>B. Thuringensis</i> subsp. <i>Tolworthi</i> Pat: aislado de <i>Streptomyces higroscopicus</i> .	Sí 2 copias: 1 para cada transgen	Sí NOS-t para bar Terminador proveniente del CaMV (poli A) para Cry9C	Resistencia a insectos; tolerancia al glufosinato de amonio (pat)	1998
6	DAS-06275-8 (TC-6275)	DOW AgroSciences LLC	Cry1F: aislado de <i>B. Thuringensis</i> subsp. <i>aizawai</i> Pat: aislado de <i>Streptomyces</i>	¿?	¿?	Resistencia a lepidópteros y tolerante a glufosinato de amonio (pat)	2004

		<i>higroscopicus</i> .				
--	--	------------------------	--	--	--	--

NOMBRE DEL EVENTO	COMPAÑÍA	ORIGEN Y TIPO DE GENES INSERTADOS	PRESENCIA PROMOTOR 35S DEL CAMV	PRESENCIA DEL TERMINADOR NOS-T	CARACTERÍSTICA DESEADA	AÑO DE LIBERACIÓN EU*	
7	DAS-59122-7	DOW AgroSciences LLC	Cry34Ab1 y Cry35Ab1: aislados de <i>B. Thuringiensis</i> cepa PS149B1 Pat: aislado de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> (usado como marcador selectivo)	¿?	¿?	Resistencia al <i>Diabrotica</i> sp..	2004
8	DBT418 Bt Xtra	Dekalb Genetics Corporation	CRY1AC: aislado de <i>B. Thuringiensis subsp. Kurstaki</i> . Pat: aislado de <i>Streptomyces higroscopicus</i>	Sí 2 copias; 1 para cada transgen	No Terminadores: Tr7 y pin II (papa)	Resistencia a insectos y tolerante a glufosinato de amonio (pat)	1997
9	GA21 Roundup Ready	Monsanto Company	EPSPS: introducido por biobalística	No Promotor RUBISCO del arroz	Sí	Tolerancia a herbicidas con glifosato	1997
10	MON80100 Roundup ready Insect Resistant	Monsanto Company	Cry1Ab: aislado de <i>B. Turingiensis subsp. Kurstaki</i> EPSPS	Sí 2 copias, 1 para cada transgen	Sí Para cada transgen	Resistencia al barrenador europeo	1995
11	MON802 Yieldgard	Monsanto Company	Cry1Ab: aislado de <i>B. Thuringiensis</i> EPSPS: aislada de <i>A. Tumefaciens</i> cepa CP4	Sí Doble promotor: 1 para cada transgen	Sí 1 copia	Resistencia al barrenador europeo Y tolerancia a herbicidas con glifosato	1996
12	MON809 Roundup ready Insect Resistant	Pioneer Hi-Bred International Inc.	Cry1Ab: aislado de <i>B. Thuringiensis</i> EPSPS: aislada de <i>A. Tumefaciens</i>	Sí Doble promotor: 1 para cada transgen	Sí 1 copia	Resistencia al barrenador europeo Y tolerancia a herbicidas con glifosato	1996
13	MON810 Yieldgard	Monsanto Company	Cry1Ab: versión truncada aislada de <i>B. Turingiensis subsp. Kurstaki</i> HD-1	Sí Doble promotor	No PERDIDO DURANTE INTEGRACIÓN	Resistencia al barrenador europeo	1995
14	MON832 Roundup ready Insect Resistant	Monsanto Company	GOX: glifosato-oxidasa, aislado de <i>Ochrobactrum anthropi</i> EPSPS	Sí 1 copia sencilla y otra doble	Sí 1 copia	Tolerancia a herbicidas con glifosato	Canadá 1997, aprobada como

							alimento
--	--	--	--	--	--	--	----------

	NOMBRE DEL EVENTO	COMPAÑÍA	ORIGEN Y TIPO DE GENES INSERTADOS	PRESENCIA PROMOTOR 35S DEL CAMV	PRESENCIA DEL TERMINADOR NOS-T	CARACTERÍSTICA DESEADA	AÑO DE LIBERACIÓN EU*
15	MON863 Insect Resistant	Monsanto Company	Cry3Bb1: aislado de <i>B. Thuringiensis subsp. Kumamotoensis</i>	Sí Modificación: promotor sencillo más 4 repeticiones. de secuencia activadora en 5'	Sí 1 copia	Resistencia a <i>Diabrotica</i> sp..	2001
16	MON88017	Monsanto Company	Cry3Bb1: aislado de <i>B. Thuringiensis subsp. Kumamotoensis</i> cepa EG4691 EPSPS	¿?	¿?	Resistencia a <i>Diabrotica</i> sp.. y tolerancia a herbicidas con glifosato	2005
17	MS3 Seed Link/Invigor	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	Bar: barnasa ribonucleasa, aislado de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Pat	Sí 1 copia	Sí 1 copia	Esterilidad masculina y tolerancia a glufosinato de amonio	1996
18	MS6 Invigor	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	Bar: barnasa ribonucleasa, aislado de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Pat	Sí 1 copia	Sí 1 copia	Esterilidad masculina y tolerancia a glufosinato de amonio	1999
19	NK603 Roundup Ready	Monsanto Company	EPSPS (2 copias introducidas independientemente)	Sí Doble promotor	Sí 1 copia	tolerancia a herbicidas con glifosato	2000
20	T14, T25 Liberty Link	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	Pat: aislado de <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Sí 1 copia	No Terminador proveniente del CaMV (poli A)	tolerancia a glufosinato de amonio	1995
21	TC1507 Herculex	Mycogen (DOW AgroSciences) y Pioneer (Dupont)	Cry1Fa2: aislado de <i>B. Thuringiensis subsp. aizawai</i> Pat: aislado de <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Sí 1 copia	No Terminador proveniente del CaMV (poli A)	Resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas con glufosinato.	2001

3. ESTUDIO DE CASO

3.1. Antecedentes

En México no se ha sembrado maíz genéticamente modificado a nivel comercial, sin embargo, en el periodo comprendido entre 1994 y 1998, particularmente a partir de 1995 con la implementación de la NOM 056-FITO-1995 se llevaron a cabo varias siembras experimentales a campo abierto de líneas transgénicas de este cultivar. Estas siembras fueron realizadas por centros de investigación nacionales e internacionales, así como por compañías privadas, bajo la reglamentación de la Norma que aplicaba a las siembras experimentales de organismos genéticamente modificados. A pesar de estas pruebas de campo, la introducción a escala comercial de líneas transgénicas de este cultivo no fue permitida después de realizar algunas pruebas de campo y para 1998, bajo un criterio precautorio en que se buscaba minimizar la posibilidad de introgresión entre híbridos genéticamente modificados y variedades criollas de maíz, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca, y Alimentación (SAGARPA) impuso una moratoria *de facto* a la siembra en campo abierto –ya fuese bajo la modalidad de siembra experimental, piloto o comercial- de maíz transgénico en nuestro país. Esta moratoria, a pesar de ser levantada en 2003, en los hechos se ha mantenido pues hasta ahora no se han aprobado siembras experimentales en campo abierto de líneas transgénicas de este cultivo. La razón principal de esto es que el marco legal para la introducción y biomonitoreo de OGMs no se ha finalizado, pues si bien ya existe una Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM)², los reglamentos que emanan de la Ley no han sido expedidos. Además la LBOGM establece que se debe proponer un régimen especial de protección del maíz, mismo que tampoco se ha establecido. Otro motivo que ha contribuido a complicar la introducción de maíz transgénico en México es la oposición de diferentes sectores de la sociedad, como organizaciones campesinas y ambientalistas, empresarios, científicos y miembros de la sociedad civil en general. Estos miembros de la sociedad mexicana están preocupados por las posibles repercusiones sociales, ambientales, económicas y culturales de la introducción de líneas de maíz transgénico en México. El debate en torno a este tema, si bien se remonta a las primeras siembras experimentales de líneas de maíz transgénico y es antecedente a la instauración de la moratoria *de facto* de 1998 ((Serratos et al., 1997; Serratos, com. pers.), se incrementó notablemente a partir de la publicación en 2001 de un reporte en la revista científica *Nature* (Quist y Chapela, 2001) donde se presentaba evidencia de la presencia de

² Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 1 de marzo de 2005.

secuencias transgénicas (el promotor 35S y el tNOS) en maíces criollos colectados en un par de comunidades rurales de la Sierra Norte de Oaxaca.

Este reporte causó gran controversia a nivel nacional e internacional, generando posicionamientos al respecto tanto de los grupos que apoyan la introducción de OGMs al ambiente, como de aquellos que desean evitarlo. A su vez, el artículo de Quist y Chapela fue intensamente criticado a nivel metodológico en torno a los resultados de ciertas técnicas de biología molecular utilizadas, principalmente el PCR inverso, ya que, a decir de sus detractores, se presentaban resultados artefactuales. Además se le criticó que llegaba a conclusiones que no se sostenían con la evidencia presentada al, por ejemplo, aseverar que había ocurrido introgresión de transgenes en las poblaciones locales de maíz criollo (Kaplinsky, et al, 2002; Metz y Fütterer, 2002; Christou, 2002). La controversia sobre los métodos utilizados y la solidez de los resultados publicados, llevó a la revista *Nature* a publicar una nota precautoria para los lectores en torno a esta publicación (Vol. 416, 2002). Este hecho, no tiene precedentes en la literatura científica para casos en los que no se ha demostrado fraude. Sin embargo, y a pesar de lo anterior, el resultado central que lleva a concluir que sí había secuencias transgénicas en maíces criollos, se sostenía y era ampliamente aceptado aún por sus críticos.

Mientras esto sucedía, funcionarios del Instituto Nacional de Ecología (INE) y la Comisión Nacional para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad (CONABIO) realizaron en septiembre de 2001 una colecta de mazorcas de maíz en diferentes comunidades aledañas al lugar donde Quist y Chapela habían colectado las mazorcas analizadas en el artículo publicado en *Nature*, así como en dos comunidades del estado de Puebla con el fin de verificar los resultados de estos investigadores. Esta muestra fue analizada preliminarmente por dos laboratorios: el del Dr. Rafael Rivera Bustamante del CINEVESTAV-IRAPUATO y el nuestro del Instituto de Ecología. Los análisis iniciales hechos con base en datos derivados de pruebas con PCR para el 35S y el terminador NOS arrojaron datos positivos sugiriendo frecuencias de secuencias transgénicas muy altas en las muestras colectadas por INE-CONABIO. Dado que estos análisis eran muy preliminares y podían aún estar sujetos a artefactos, decidimos no publicarlos hasta corroborarlos. Sin embargo, los funcionarios que encargaron estos estudios los hicieron públicos con base en sus propias lecturas e interpretaciones de los geles producidos en nuestros laboratorios (Ezcurra, *et al*, 2002). En estos reportes concluyen que hay una alta frecuencia (0.09) de transgenes en las colectas de maíz criollo de Oaxaca y Puebla en las cercanías al sitio original de muestreo de Quist y Chapela (2001).

Sin embargo, nosotros decidimos seguir trabajando con estas muestras a profundidad para establecer la sensibilidad de distintos ensayos moleculares y corroborar los resultados publicados por el INE-CONABIO. En esta tesis presentamos análisis exhaustivos para una submuestra de la colecta de INE-CONABIO para comparar distintos métodos moleculares para la detección de transgenes en razas de maíz criollo mexicano. En los siguientes apartados de esta sección se presentarán el sitio de colecta, el manejo de las muestras, los primeros resultados obtenidos y el esquema para la segunda ronda de análisis en un subgrupo de muestras escogidas.

3.2. Sitio de colecta y clasificado de las muestras

La colecta de semillas de maíz analizada en este trabajo fue realizada en septiembre de 2001 por funcionarios del Instituto Nacional de Ecología (INE) y la Comisión Nacional para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad (CONABIO). En este esfuerzo se colectaron mazorcas y/o semillas en 2 localidades del estado de Puebla y 21 localidades del estado de Oaxaca. En el caso del estado de Oaxaca, 20 localidades pertenecen al Distrito de Ixtlán de Juárez en la Sierra Norte y una localidad se ubica en la Sierra Mixteca al sur del estado (ver figura 6). Las demarcaciones políticas y coordenadas geográficas de las colectas se presentan en la tabla 3. En cada localidad se tomaron de 1 a 6 mazorcas por agricultor y se colectó a un agricultor por comunidad, excepto en las localidades 15 y 16 que corresponden a un almacén de DICONSA y al mercado de Ixtlán de Juárez, respectivamente, donde se adquirió semilla suelta (ver tabla 5).

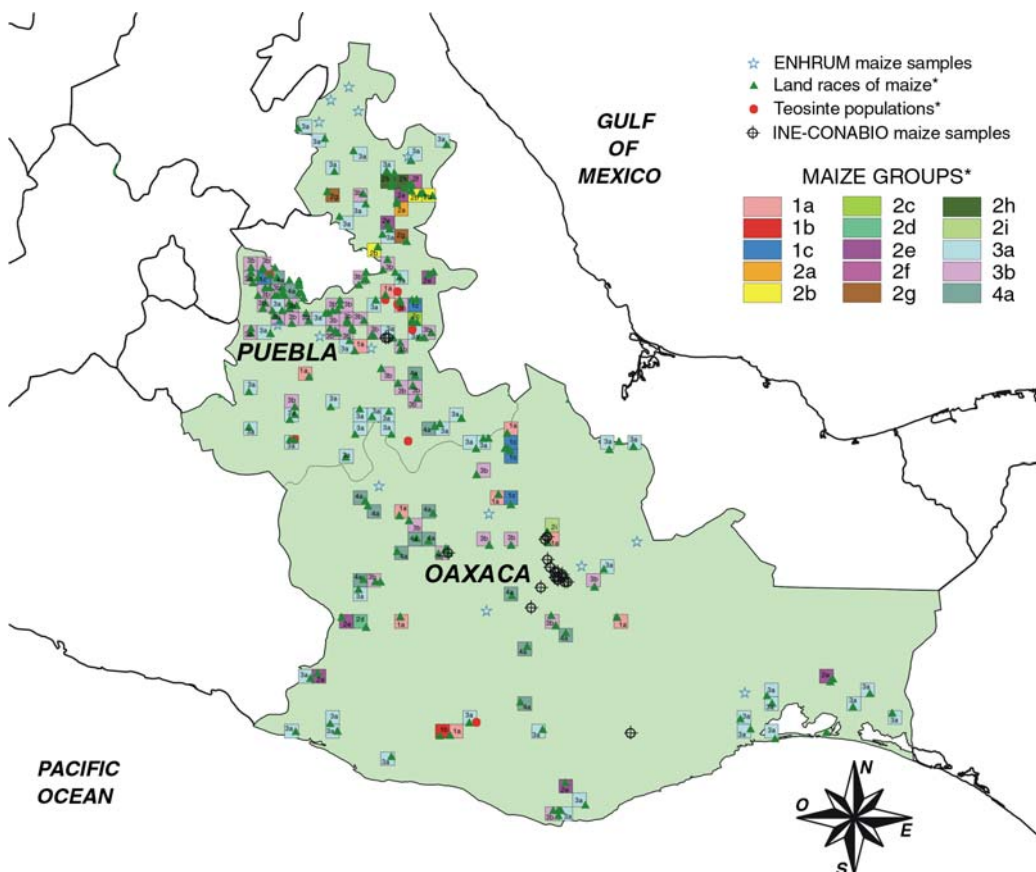
La colecta fue llevada al INE para su resguardo. Las mazorcas colectadas a cada agricultor fueron numeradas y desgranadas para elaborar tres grupos iguales de semillas; uno se analizó en el Centro de Estudios Avanzados unidad Irapuato (CINVESTAV-I), otro en el Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y el resto de la muestra fue resguardada en las instalaciones del INE. En todos los casos, al desgranarse las mazorcas, las semillas se mezclaban, por lo que se garantizó que a cada laboratorio llegara una muestra aleatoria de cada una de las mazorcas analizadas representativa de las mazorcas completas.

Con el fin de tener un sistema de jerarquización y rotulado que conservara la identidad de la localidad de la que provenía cada muestra, así como la identidad materna (la mazorca de origen), a todas las mazorcas de una localidad se les asignó como primer número el código de la localidad, después de un punto se escribió el número de mazorca y después de otro punto se

asignó el número de la semilla individual. De tal manera, que la semilla 2 de la mazorca número 3 de la comunidad 10 quedaría rotulada como 10.3.2

Las muestras entregadas a CINEVESTAV-I y a la UNAM, respectivamente, fueron rotuladas, germinadas y analizadas de manera independiente con el fin de contrastar los estimados de frecuencia obtenidos en cada uno de los laboratorios y descartar contaminación o resultados artefactuales durante los análisis moleculares y fisiológicos que serían realizados para determinar la presencia o ausencia de marcadores para secuencias de origen transgénico. En el caso del laboratorio del Instituto de Ecología de la UNAM, se procedió a sembrar 15 semillas de cada una de las mazorcas presentes en la colecta.

Figura 6. Estados donde se llevó a cabo la colecta INE-CONABIO 2001.



En verde claro están los estados donde se llevó a cabo la colecta (Puebla y Oaxaca). Las cruces negras indican las localidades colectadas. Los cuadros y triángulos de color denotan presencia de diferentes grupos raciales de maíz, según lo establecido por Wellhausen *et al.* (1952). Figura tomada de Piñeyro-Nelson *et al.*, en preparación. Ver figura a color al final de este documento.

Tabla 5. Demarcación política, coordenadas geográficas, número de agricultores colectados y número de mazorcas adquiridas en cada localidad para su análisis molecular.

Código	Localidad	Estado	Municipio	Altitud	Latitud	Longitud	# de agricultores	# de mazorcas
1	Carr. Palmarito-Tehuacán	Puebla	Palmar de Bravo	1419	18°52'	97°38'	1	2
2	Jesús Nazareno	Puebla	Palmar de Bravo	2183	18°52'	97°37'	1	3
3	Santa María Yahuiche	Oaxaca (Sa. Norte)	Ixtlán de Juárez	1806	17°17'	96°28'	1	3
4	Santiago Comaltepec	Oaxaca (Sa. Norte)	Santiago Comaltepec	2028	17°33'	96°32'	1	3
5	San Pablo Macuiltianquis	Oaxaca (Sa. Norte)	San Pablo Macuiltianquis	2153	17°32'	96°33'	1	3
6	San Juan Analco	Oaxaca (Sa. Norte)	San Juan Analco	2138	17°24'	96°32'	1	5
7	Santa María Jaltianquis	Oaxaca (Sa. Norte)	Santa María Jaltianquis	2074	17°21'	96°31'	1	6
8	Rancho Tejas	Oaxaca (Sa. Norte)	Ixtlán de Juárez	2075	17°19'	96°28'	1	3
9	Ixtlán de Juárez	Oaxaca (Sa. Norte)	Ixtlán de Juárez	2076	17°19'	96°29'	1	5
10	Calpulalpan	Oaxaca (Sa. Norte)	Calpulalpan	2242	17°18'	96°26'	1	5
11	Santiago Xiacui	Oaxaca (Sa. Norte)	Santiago Xiacui	2041	17°17'	96°26'	1	3
12	Santiago Xiacui	Oaxaca (Sa. Norte)	Santiago Xiacui	2041	17°17'	96°26'	1	3
13	La Trinidad	Oaxaca (Sa. Norte)	Santiago Xiacui	2035	17°15'	96°25'	1	3
14	San Andrés Yatuni	Oaxaca (Sa. Norte)	Santiago Xiacui	2285	17°15'	96°24'	1	2
15	Ixtlán de Juárez	Oaxaca (Sa. Norte)	Ixtlán de Juárez	Almacén DICONSA			*	*
16	Ixtlán de Juárez	Oaxaca (Sa. Norte)	Ixtlán de Juárez	Mercado local			*	*
17	San Juan Chicomezuchit	Oaxaca (Sa. Norte)	Ixtlán de Juárez	1806	17°17'	96°29'	1	2
18	San Miguel Amatlán	Oaxaca (Sa. Norte)	Ixtlán de Juárez	2028	17°16'	96°28'	1	2
19	Lachatao	Oaxaca (Sa. Norte)	Pueblos Mancomunados	2113	17°16'	96°28'	1	4
20	El Punto	Oaxaca (Sa. Norte)	Ixtepeji	2422	17°13'	96°35'	1	2
21	Las Presas	Oaxaca (Sa. Norte)	Tlalistac	1653	17°05'	96°39'	1	3
22	Nochixtlán	Oaxaca (Mixteca)	Nochixtlán	1660	17°27'	97°13'	1	1
23	Santo Tomás Teipan	Oaxaca (S. Juárez)	Santa María Ecatepec	2380	16°15'	95°59'	1	5

En todos los sitios de muestreo se recolectaron mazorcas de un solo agricultor por comunidad, salvo en las localidades 15 y 16 donde se adquirió semilla desgranada. En donde aparece la marca *, se refiere a que el volumen de semilla adquirida y el número de mazorcas que contribuyeron a cada una de estas muestras es desconocido.

3.3. Primera ronda de análisis moleculares

Para llevar a cabo las pruebas moleculares se germinaron en promedio 15 semillas de cada mazorca. Las semillas fueron esterilizadas superficialmente con el antimicótico CAPTAN® y después fueron puestas a germinar a 37°C en oscuridad dentro de refractarios con algodón estéril humedecido con agua destilada. Las plántulas fueron cosechadas después de la emergencia de la segunda hoja, manteniendo la etiqueta de la semilla de que provenían.

A partir de este primer grupo de plántulas se realizaron diferentes pruebas fisiológicas y moleculares con el fin de detectar presencia de secuencias transgénicas o sus productos. Las pruebas fisiológicas realizadas consistieron en ensayos para evaluar la resistencia al herbicida BASTA® (glufosinato) mediante la aplicación con brocha de una solución al 10% de este herbicida en hojas para después de una semana observar tolerancia o diferentes niveles de necrosis. También se realizaron ensayos inmunológicos tipo ELISA para detectar la presencia de proteínas de origen exógeno que se expresan en algunos de los eventos de líneas transgénicas de maíz como la proteína Cry1Ab y Cry9C. Para las pruebas moleculares se llevó a cabo la extracción de ADN para determinar la presencia o ausencia de dos marcadores para transgénicos: el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV, por sus siglas en inglés) y el terminador de la Nopalina sintetasa (tNOS), aislado de *Agrobacterium tumefaciens*, para lo cual se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos específicos para amplificar, mediante PCR (Polymerase Chain Reaction, siglas en inglés o Reacción en Cadena de la Polimerasa) fragmentos específicos de estas dos secuencias. Como control de calidad del ADN extraído se utilizó un juego de oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de la subunidad 16s ribosomal (ver sección de Materiales y Métodos y Apéndice 1 para más información sobre los protocolos de cada una de las técnicas moleculares utilizadas). La primera estimación de frecuencia del promotor 35S del laboratorio de la UNAM con base en lecturas de las fotos de los geles de PCR donde se amplificaba el fragmento esperado, fue obtenida por funcionarios del INE-CONABIO en 0.092 (S.E. \pm 0.0087, $n=1092$).

Ya que este estimado de frecuencia (casi 10%) del promotor 35S era muy alto, se procedió a una corroboración mediante una nueva inspección visual de las fotos de los geles de PCR, en donde se eliminaron como positivas aquellas muestras que presentaban problemas con los controles positivos y/o negativos, así como a aquellas muestras en donde se presentara únicamente la amplificación de un fragmento de ca. 390pb para el promotor 35S. Este fragmento

puede obedecer a la amplificación por parte de los cebadores de un fragmento que corresponde a la presencia de un promotor 35S doble, lo que ha sido reportado para tomate transgénico transformado con esta secuencia (Anklam et al., 2002). Sin embargo, al clonar y mandar a secuenciar dichos amplicones, notamos que en el caso de las muestras de maíz con las que se trabajó, este fragmento no correspondía a la secuencia esperada. A partir de estas consideraciones, la frecuencia corregida para el promotor 35S fue de 0.036 (S.E. \pm 0.00229, n=831). Ver tabla 4.

Los resultados de las pruebas fisiológicas de resistencia al herbicida BASTA® arrojaron algunos positivos, pero no pudieron ser realizadas en la mayoría de las plántulas germinadas, por lo que no se analizarán en este trabajo.

Tabla 6. Desglose del número de semillas analizadas por localidad colectada en el laboratorio de la UNAM. Se presenta una estimación de frecuencia para el promotor 35S del CaMV para cada localidad.

Localidad	No. mazorcas	No. Semillas	No. Positivos	frecuencia	Intervalos de confianza al 95	
					Inf.	Sup.
1	2	17	0	0	0	0.16
2	3	30	3	0.09	0.05	0.24
3	3	45	0	0	0	0.06
4	3	45	1	0.02	0.01	0.1
5	3	45	4	0.09	0.05	0.19
6	5	51	1	0.02	0.01	0.09
7	6	79	7	0.09	0.05	0.16
8	3	45	0	0	0	0.06
9	5	48	0	0	0	0.06
10	5	75	4	0.05	0.03	0.12
11	3	29	3	0.1	0.05	0.25
12	3	15	0	0	0	0.18
13	3	45	1	0.02	0.01	0.1
14	2	30	2	0.06	0.03	0.2
15	*	15	0	0	0	0.18
16	*	15	0	0	0	0.18
17	2	30	1	0.03	0.01	0.15
18	2	32	0	0	0	0.09
19	4	50	0	0	0	0.06
20	2	30	0	0	0	0.1
21	3	36	1	0.03	0.01	0.12
22	1	15	0	0	0	0.18
23	5	56	2	0.04	0.01	0.11
TOTAL	68	831	30	0.036	0.03	0.05

Las frecuencias de positivos obtenidos para el promotor 35S mediante la técnica de PCR fueron ajustados a una distribución binomial. Este análisis también fue realizado para los datos obtenidos de manera independiente en

el laboratorio de la UNAM y del CINVESTAV I: no se encontraron diferencias significativas entre la distribución de positivos entre laboratorios. (Ver tabla 1 del apéndice 1).

Los inmunoensayos tipo ELISA realizados para estas plántulas no coincidieron con los datos de PCR, en particular para el caso de la proteína Cry9C y más tarde se corroboraron resultados artefactuales por problemas con los kits usados (Dr. *R. Rivera, com. pers.*). Por lo tanto, se decidió no utilizar los resultados de las ELISA como criterio para definir los individuos y familias que se analizarían más a fondo en la siguiente ronda de análisis. Dado lo anterior, la selección se basó únicamente en los resultados de las pruebas moleculares realizadas a partir de ADN y de aquí en adelante únicamente se analizará la consistencia de técnicas analíticas moleculares basadas en esta molécula.

La frecuencia elevada de positivos se puede deber a artefactos en las técnicas analíticas, pero también a problemas de contaminación en el proceso de extracción o análisis de las pruebas. Esto último es poco probable porque al analizar las frecuencias de positivas obtenidas mediante PCR para ambos laboratorios asumiendo una distribución binomial para el número de positivos por mazorca y localidad, no encontramos diferencia significativa en ningún caso. Esto quiere decir que las diferencias en las frecuencias entre mazorcas y localidades se deben a diferencias reales más que a efectos de contaminación que no tendrían porqué haber afectado en la misma dirección a las muestras de los dos laboratorios que se condujeron de manera independiente (datos no mostrados). Este resultado enfatiza la importancia de poner a prueba las distintas técnicas moleculares para la detección de transgenes y corroborar cual es más eficiente y sensible.

3.4. Segunda ronda de análisis moleculares

A partir de esta primera ronda de análisis moleculares, se seleccionaron mazorcas para las cuales se habían encontrado las frecuencias más altas de positivos en ambos laboratorios y se analizaron algunas semillas con diversas técnicas moleculares independientes concentrándonos en el 35S. En esta segunda fase de siembra, las plántulas que germinaron fueron pasadas a tierra y dejadas crecer hasta el estadio de la sexta hoja con el fin de obtener tejido suficiente para realizar análisis moleculares exhaustivos. Dicho tejido fue almacenado a -70°C.

Se realizó una nueva ronda de PCR a partir del ADN extraído para detectar la presencia del promotor 35S y el control interno (16s) de calidad del ADN. A partir de los resultados obtenidos,

se escogieron aquellos individuos tanto del laboratorio del CINVESTAV-I como de la UNAM que eran positivos recurrentes (utilizando como criterio dos o más PCR independientes positivos para el promotor 35S) para el 35S con el fin de realizar una nueva ronda de análisis moleculares que comprendieron pruebas de PCR a saturación para el promotor 35S y tNOS, PCR cuantitativo para estos mismos marcadores (realizado en el laboratorio del CINVESTAV-I), PCR realizado por un laboratorio de servicio externo (Genetic ID NA, Fairfield, Iowa, EU); secuenciación de los amplicones e hibridación ADN-ADN tipo Southern blot usando como sonda el doble promotor 35S (ver sección de Materiales y Métodos y Apéndice 1 para más información sobre los protocolos de cada una de las técnicas analíticas utilizadas en este trabajo).

4. RESULTADOS

4.1. Extracción de ADN

La calidad del ADN purificado es importante para obtener resultados consistentes en las diferentes técnicas que utilizan a esta molécula como templado (PCR, Southern blot, etc). Diferentes métodos de extracción dan como resultado diferentes calidades y cantidades de ADN de buena calidad, por lo que es fundamental evaluar cuál de los diferentes métodos de extracción es el más adecuado para el tipo de tejido del que se va a purificar ADN. En este trabajo se utilizó tejido de hoja en dos modalidades diferentes: fresco y liofilizado. En nuestro estudio se determinó de manera empírica que el método más eficiente para obtener ADN de buena calidad a partir de tejido liofilizado es el publicado en el manual de protocolos de biología molecular de CIMMYT, el cual está basado en una solución de extracción con CTAB y usa como solventes una solución de cloroformo/octanol. Para extraer ADN de tejido fresco, una versión corta del mismo protocolo que fue proporcionada a la autora por parte del personal de CIMMYT, es adecuada para ello (ver Apéndice 1).

4.2. PCR Cuantitativo

Los ensayos de PCR cuantitativo fueron realizados en el laboratorio del Dr. Rafael Rivera Bustamante (CINVESTAV-I) por parte de personal a su cargo, utilizando el TaqMan® GMO maize 35S Detection Kit de *Applied Biosystems* en un equipo de PCR de tiempo real de BioRad. Muestras de diferentes localidades fueron analizadas utilizando el kit según las instrucciones del fabricante. A pesar de esto, no se obtuvieron resultados interpretables debido a que el gen reportero utilizado en este kit para calibrar el porcentaje de amplificación del gen de interés (en este caso, el promotor 35S) no presentaba el patrón esperado de amplificación de un gen de copia única, lo que parece indicar, después de haber realizado pruebas exhaustivas y comunicarse con el fabricante del kit para discernir las posibles causas de este resultado, que el gen reportero –una zeína- probablemente presentan más de una copia de éste gen, en el genoma de los individuos colectados en la Sierra Norte de Oaxaca, los cuales corresponden a diferentes razas locales (Dr. R. Rivera, com. pers.). Por este motivo, la calibración no pudo ser realizada a pesar de que la amplificación del promotor 35S fue exitosa. Dado lo anterior, no se reportarán los resultados obtenidos mediante estas pruebas dentro de este trabajo.

4.3. PCR Cualitativo

Las muestras seleccionadas para esta segunda ronda de análisis (ver tabla 7 para claves de muestras seleccionadas) fueron sometidas a prueba de PCR a saturación con el fin de determinar la presencia o ausencia del promotor 35S y el tNOS.

En todos las pruebas de PCR se utilizaron controles positivos de ADN de uno o más de los siguientes eventos: MON810, NK603, y ADN del plásmido pMON969 (estos tres controles fueron facilitados por el Dr. R. Rivera). Este último contiene un cassette de transformación con un doble promotor 35S. Como controles negativos se utilizó ADN genómico extraído a partir de plántulas de un tipo de maíz proveniente de Perú (denominado "Peru"; ver tabla 7) y/o ADN de plántulas de una línea híbrida producto de la cruce de CML-244 x CML 239 realizada en CIMMYT y denominada en este estudio como BA (semilla provista por el Dr. A. Serratos). Además, se corría en la PCR y se cargaba en el gel por lo menos una muestra por reacción con agua como control negativo sin ADN para verificar que los reactivos no estuvieran contaminados o produciendo artefactos.

La calidad del ADN purificado fue un parámetro crítico para el éxito en la amplificación de las secuencias de interés, en particular las exógenas. La calidad del ADN afecta de manera significativa la sensibilidad del PCR, ya que al utilizar como templado ADN parcialmente degradado, la amplificación de fragmentos de secuencias problemáticas como el promotor 35S, se ve disminuida considerablemente, al punto de que aún los controles positivos procedentes de ADN genómico de líneas transgénicas de maíz utilizadas en esta investigación, como MON810 y NK603, que contienen tanto el promotor 35S como el tNOS, ocasionalmente no amplificaban, aún en las condiciones óptimas de temperatura y concentración de reactivos de PCR. Otro factor que fue fundamental en el éxito de la amplificación de estas dos secuencias, es la cantidad de templado utilizado. Menos de 10ng de ADN genómico comúnmente genera falsos negativos, aún en los controles positivos para las secuencias mencionadas. Esto es importante notarlo, ya que al utilizar como control positivo un plásmido que contenía el doble promotor 35S (pMON969), difícilmente se obtenían falsos negativos. Este tipo de dificultades no se presentaron en la amplificación de los controles internos (16s y HSP101), a pesar de que la chaperona de maíz utilizada está en copia única (Nieto-Sotelo *et al*, 1999) por lo que el éxito en su amplificación debería, en principio, ser equivalente a la amplificación del promotor 35S, ya que esta secuencia

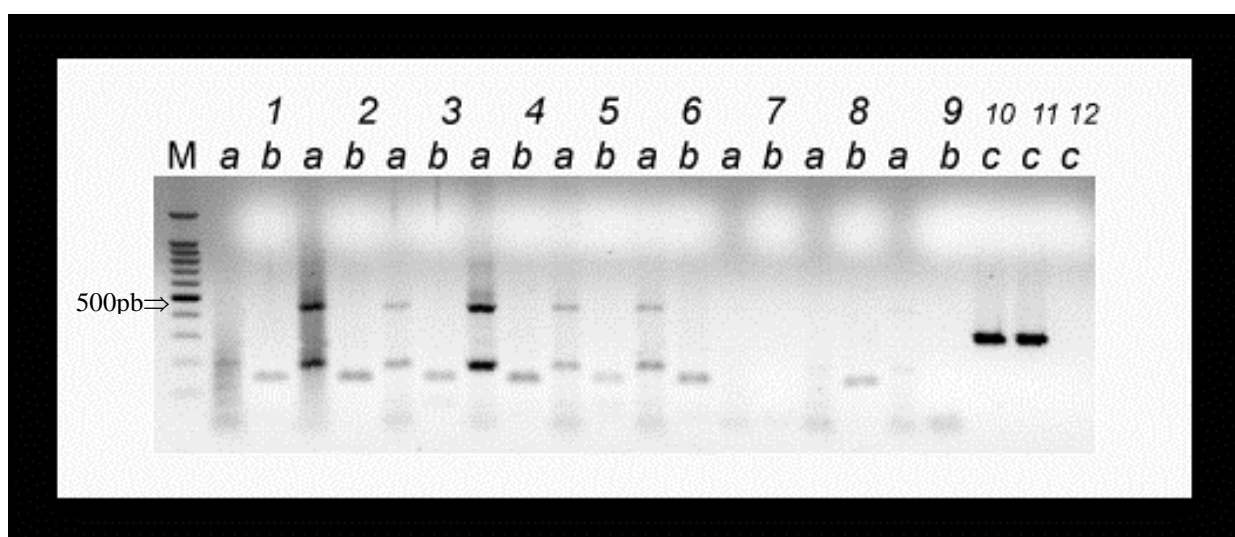
se presenta en por lo menos una copia en los diferentes eventos comerciales que lo contienen (ver tabla 3 de la sección anterior).

Además de la calidad del ADN utilizado como templado que mejoró en la segunda ronda de análisis, también se cambió la enzima usada. Originalmente se utilizó Taq Polimerasa de origen recombinante, sin embargo, con esta enzima se detectaron falsos positivos en el blanco en amplificaciones del promotor 35S. Por lo tanto, después de realizar pruebas con cada uno de los reactivos, se determinó que la Taq estaba produciendo artefactos, probablemente por una purificación deficiente de los plásmidos donde se había generado esta enzima, ya que estos plásmidos podrían haber tenido la secuencia del 35S originalmente. Este tipo de resultado se ha observado también para la amplificación de la β -glucoronidasa (GUS). . Por lo anterior, este tipo de enzima únicamente se utilizó para amplificar los controles de calidad de ADN (16s y HSP101) en donde se verificó la ausencia de artefactos, mientras que para la amplificación del tNOS y el promotor 35S se utilizó Taq Polimerasa Nativa de Invitrogen®. El uso de la versión nativa de esta enzima eliminó este problema y con ello los estimados de frecuencia del 35S disminuyeron a 0.56 (Ver figura 8).

Al amplificar el promotor 35S comúnmente se observó un patrón en donde estaba presente la banda esperada de 195pb más otra banda mayor de 390pb correspondiente a dos fragmentos del promotor 35S juntos. Esta banda se clonó y mandó a secuenciar con el fin de corroborar la presencia de un fragmento del doble promotor 35S, pero se encontró que esta banda era artefactual ya que no correspondía a ninguna de las secuencias del promotor 35S disponibles en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), lo que se corroboró usando la Herramienta de Alineamiento Local Básico (BLAST, por sus siglas en inglés: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Esta banda es amplificada persistentemente, a pesar de que se modifiquen los parámetros de la reacción de PCR para hacerla más específica. En la figura 7 se presenta una imagen de un gel de agarosa donde se observa el patrón de amplificación descrito para el 35S así como para la HSP y el 16s ribosomal. Nótese la heterogeneidad en la intensidad de las bandas (ergo, la eficiencia de amplificación) para los pozos correspondientes al promotor 35S, en contraposición a las bandas de la HSP101, las cuales presentan una amplificación homogénea entre diferentes muestras. En todos los casos, la concentración de ADN fue ajustada para utilizar 20ng de templado para cada muestra.

Para todas las muestras presentadas en las figuras 7 y 8, se realizaron en promedio 7 PCRs independientes para amplificar el promotor 35S con el fin de corroborar y analizar la repetibilidad de los ensayos. En este sentido, hubo una frecuencia de 0.8 de repeticiones exitosas por muestra, aunque el número de veces que una muestra particular amplificaba en cada PCR subsiguiente fue muy variable. La figura 8 está compuesta por aquellas muestras que presentaron el mayor porcentaje de repetibilidad. Esto indica que es más factible obtener falsos negativos que falsos positivos si se cuenta con controles adecuados para monitorear problemas de contaminación.

Figura 7. Fotografía de un gel de agarosa mostrando un ensayo de PCR con los amplificadores para el promotor 35S, la HSP101 y el 16s ribosomal para diferentes muestras más los controles positivos y negativos.

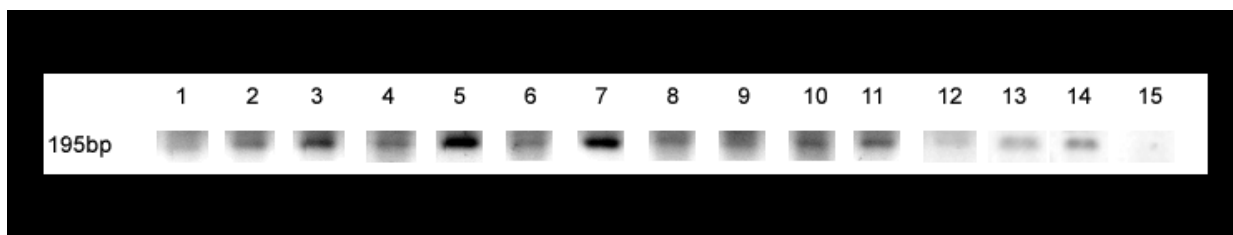


el 35S (a), HSP (b) y 16s (c) para muestras selectas, controles positivos y negativos de la colecta del 2001. Nótese las diferentes intensidades de amplificación en diferentes muestras, a pesar de que en todos los casos se partió de una concentración de 20ng de ADN como templado y en cada pozo se cargaron 10µl de una reacción de PCR de 25µl. Claves: M: marcador de 100pb, banda más intensa es de 500pb, 1)7.5.5, 2)7.2.4, 3)14.2.8, 4)7.3.4, 5)23.3.15, 6) MON810 (control +), 7) *A. thaliana* Wt (control -), 8) *Z. mays* híbrido BA (control -), 9) blanco, 10) *A. thaliana* Wt (control -), 11) *Z. mays* híbrido BA (control -), 12) blanco. (PCR realizado por Grethel Busot)

Las intensidades de banda que se observan en la figura 8 fueron constantes a través de repeticiones subsiguientes de PCR. Estas fueron realizadas además con extracciones de ADN independientes para una misma muestra. Esto pone de manifiesto el hecho de que la eficiencia en la amplificación fue constante para una muestra dada, lo que puede indicar que para muestras particulares podemos estar obteniendo una baja eficiencia de amplificación debido a fenómenos de modificación bioquímica (como es metilación de ADN a nivel de residuos de citosina). Esta hipótesis tendrá que ser probada específicamente y de comprobarse será un

resultado muy importante para futuros programas de monitoreo pues sentará el precedente de que la inserción del 35S puede promover la metilación y la inhibición de la reacción de PCR. Esto implica que será aún más difícil corroborar la presencia de este tipo de secuencias provenientes de líneas transgénicas.

Figura 8. Amplificaciones de un fragmento de 195pb del promotor 35S.



Claves: 1)5.1.11, 2)5.1.13, 3)5.1.14, 4)7.2.3, 5)7.2.4, 6)7.2.5, 7)7.3.4, 8)7.3.5, 9)11.1.15, 10)23.1.2, 11)23.2.4, 12)23.3.15, 14)control+ (Bt MON810), 15) control- (Peru)

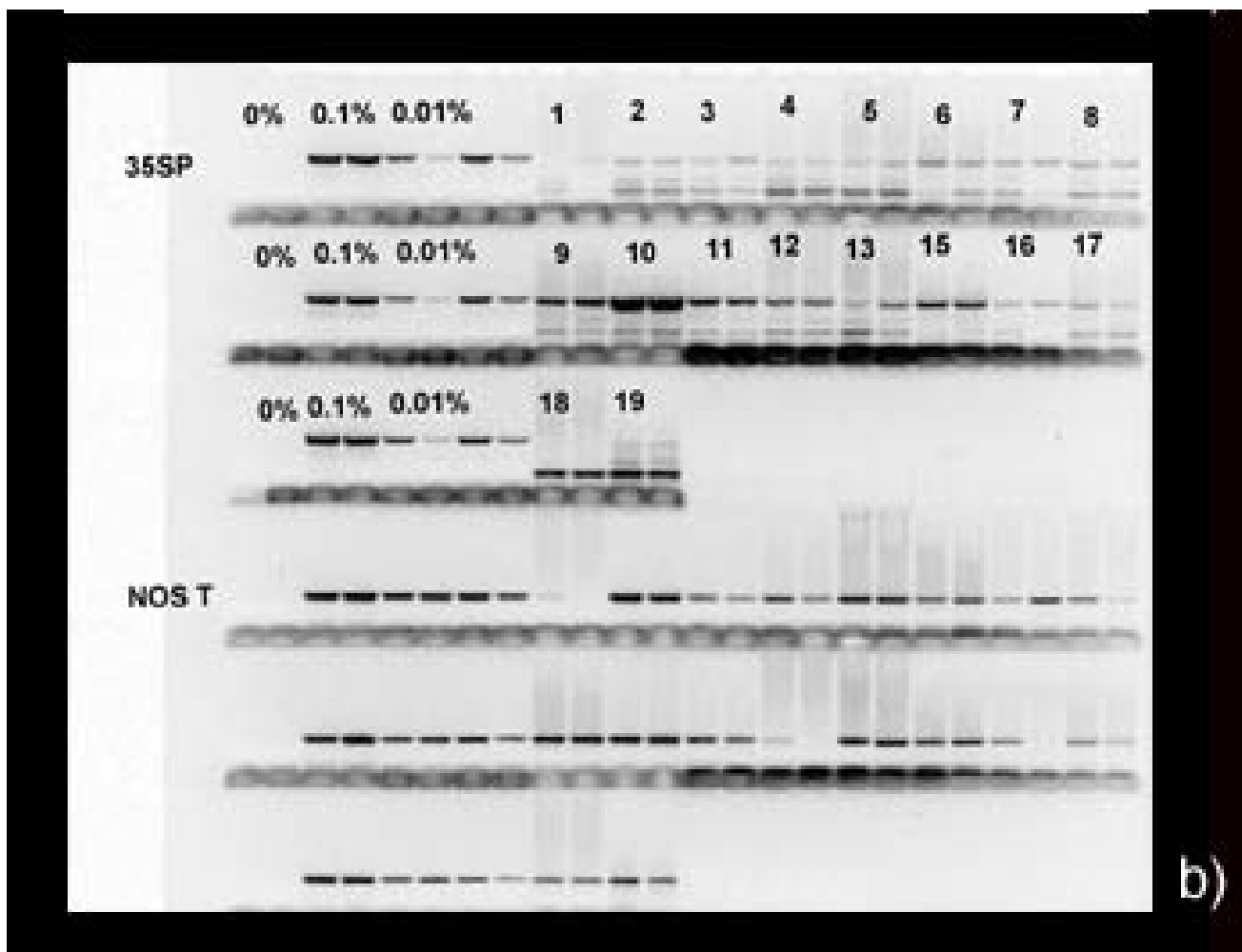
Con el fin de corroborar los resultados obtenidos en el laboratorio, a la par que se realizaban estos ensayos de PCR se envió tejido de hoja liofilizado de cada una de las muestras que aparecen en la tabla 7 a Genetic ID NA que es un laboratorio externo que está certificado internacionalmente para la detección de secuencias de ADN transgénicas. En este laboratorio se realizaron pruebas de PCR cualitativo a saturación (a partir de extracciones de ADN realizadas en dicho laboratorio) y en algunos casos cuantitativos (ver tabla 7) donde se amplificó el promotor 35S del CaMV y el tNOS. En la figura 9 se observa el patrón de amplificación que se obtuvo en los ensayos realizados por este laboratorio, en donde la prueba fue hecha por duplicado en cada una de las muestras. Del lado izquierdo de cada gel se tiene un control negativo (ausencia de ADN) y dos calibradores o controles positivos con diferente concentración de ADN transgénico como templado. Genetic ID incluye este tipo de controles positivos con el fin de realizar una estimación cualitativa de la concentración de ADN transgénico en una muestra particular, generalmente agregada (es decir, compuesta por n semillas, en donde hay un número N de semillas transgénicas, que son $N \leq n$). En la figura de la foto del gel provisto por GID se observa, al igual que en nuestros ensayos, heterogeneidad en la intensidad de bandas obtenidas y en varias muestras la intensidad de banda se equipara o incluso es más intensa que algunas de las bandas de los controles positivos que representan una concentración de ADN de 1 en 10000 (marcado en la imagen por encima de la fila como 0.01%, estando por triplicado).

Los criterios de asignación de positivos de Genetic ID, basados no en la presencia o

ausencia de la banda esperada en la electroforesis del producto de PCR, sino en la intensidad relativa de esta banda, que supone una concentración relativa de un transgen con respecto al total de la muestra (este laboratorio normalmente procesa muestras agregadas en las que se parte de 100, 1000, o hasta 10,000 semillas de algún cultivo particular: soya, algodón, maíz, etc. que son molidas, homogeneizadas y una alícuota es utilizada para extraer ADN y llevar a cabo la prueba de PCR). Esto se debe a que lo relevante para esta empresa y sus clientes habituales (agricultores, grupos ambientalistas, dependencias gubernamentales) es saber si se pasa de un cierto umbral de concentración (por ejemplo, 0.1%) de un transgénico con respecto a la muestra enviada, además de que los umbrales de detección se han establecido con criterios comerciales para minimizar el riesgo de falsos positivos. Debido a esto, las muestras que aparecen en la figura 9 son reportadas por este laboratorio como negativas (para un umbral de 0.01%), salvo la muestra número 10 que presenta, según los estándares de este laboratorio, una intensidad de banda de una amplificación equivalente a lo que debería ser una muestra 100% positiva.

Mientras que el nivel de amplificación de nuestras muestras resultó problemático en cuanto a la interpretación de resultados por parte de este laboratorio, también hubo problemas de repetibilidad. Por ejemplo, la muestra 10 que se observa en la figura 9, la cual es asignada como 100% positiva tanto mediante PCR cualitativo como por otro PCR cuantitativo realizado por Genetic ID, fue enviada nuevamente en otra ocasión con el fin de que se le realizaran pruebas de identidad para discernir de qué evento transgénico se trataba. Al ser sometida a una nueva prueba de PCR cuantitativo presentó un 18% de amplificación. Este resultado tampoco pudo ser interpretado por parte de los técnicos de esta empresa.

Figura 9. Foto de gel de agarosa donde se muestra la amplificación de un fragmento del promotor 35S y el terminador NOS a partir de un PCR realizado por la empresa Genetic ID.



En cada nivel del gel de agarosa (ver pozos) se corrieron el control negativo por duplicado y dos controles positivos por triplicado; los controles positivos son la dilución de ADN transgénico en agua con el fin de obtener un porcentaje relativo peso/volumen equivalente a 0.1% ó 0.01% respectivamente. Esto se llevó a cabo tanto para el promotor 35 como para el tNOS. Las claves las muestras son: 1: 5.1.1; 2: 5.1.11; 3: 5.1.13; 4: 7.2.2; 5: 2.1.18; 6: 7.2.4; 7: 7.2.3; 8: 6.3.4; 9: 7.5.2; 10: 7.5.5; 11: 7.3.4; 12: 11.1.16; 13: 23.1.2; 14: 18.1.9; 15: 23.3.15; 16: 23.2.4; 17: 23.5.3; 18: 23.3.2; 19: 21.1.1

Con el fin de determinar si los problemas de detección, interpretación y repetibilidad eran particulares a las muestras colectadas en la Sierra Norte de Oaxaca, además de probar la incidencia de falsos negativos por parte de la empresa Genetic ID, se mandaron a esta empresa muestras agregadas de semillas no transgénicas híbridas con una semilla transgénica ya fuera homociga o hemiciga del evento MON810 (1 semilla hemiciga en 50, 1 homociga en 100 y 1 hemiciga en 1000) así como fragmentos de hoja de este evento y de NK603. Los resultados obtenidos son ilustrativos: de las muestras agregadas se detectaron aquellas con 1 semilla homociga transgénica en 100 no transgénicas y 1 semilla hemiciga transgénica en 1000 no

transgénicas, pero no se detectó la muestra compuesta por 1 semilla hemiciaga transgénica en 50 no transgénicas; en el caso de los fragmentos de hoja, MON810 fue detectado como transgénico (al amplificar tanto el promotor 35S como el tNOS) y el evento fue identificado mediante prueba de identidad, mientras que por PCR cuantitativo fue detectado como 120% positivo. El evento de Roundup Ready fue identificado como transgénico únicamente a partir de la amplificación del tNOS, ya que el nivel de amplificación para el 35S fue tomado como negativo a pesar de que este evento presenta el promotor 35S, lo amplifica bien e hibrida bien en Southern blot en nuestro laboratorio (ver figura 11). Además de estos dos eventos comerciales, se envió una muestra de tejido de una variedad transgénica no comercial de maíz Bt que expresa la proteína Cry1Ab. Dicha línea fue desarrollada en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) a finales de la década de los noventa (Bohorova et al, 1999, 2001). Este evento presenta el promotor 35S, pero este tampoco fue detectado por Genetic ID.

Los resultados anteriores muestran que Genetic ID no es capaz de detectar exitosa y regularmente los transgenes, tanto en variedades de maíz criollo introgresadas con secuencias transgénicas, como para eventos transgénicos no comerciales (maíz Bt (Cry1Ab) de CIMMYT). Las pruebas hechas por Genetic ID presentaron dos tipos de problemas: uno de repetibilidad y otro de criterio. El problema de repetibilidad tiene que ver con el hecho de que para una misma muestra, analizada en diferentes momentos por un mismo laboratorio, los resultados no son repetibles y/o comparables (100% amplificación en un momento y 18% en otro; positivo en una prueba, negativo en otra repetición); el problema de criterio está relacionado con el hecho de que para determinar si una muestra es positiva o negativa para un transgen, no se utiliza el estándar de presencia o ausencia de la banda esperada, sino la intensidad de la banda que es correlacionada con una concentración particular de la secuencia de interés, lo que puede ocasionar el reportar como negativas muestras que presentan claramente la banda esperada (ver figura 9).

4.4. Hibridación ADN-ADN tipo Southern blot

La siguiente técnica utilizada para determinar la presencia del promotor 35S fue la hibridación ADN-ADN tipo "Southern blot". Esta técnica permite observar por autoradiografía la presencia de un gen particular en el genoma de un individuo a partir de una reacción de hibridación por complementariedad de bases entre la sonda (marcada enzimática o

radioactivamente) y el ADN que se encuentra fijado en una membrana plástica (en este caso se utilizó una membrana de nylon cargada positivamente marca Amersham).

Esta técnica se estandarizó en el laboratorio del Dr. Jorge Nieto Sotelo (en el Instituto de Biotecnología de la UNAM) bajo la supervisión de su técnico académico, la QFB Luz María Martínez. Se utilizó como sonda para detectar el promotor 35S un fragmento de 639pb correspondiente a un doble promotor 35S aislado del plásmido pMON969 mediante una doble digestión con las enzimas de restricción BglII y HindIII.

El ADN genómico de las muestras de maíz sometidas a esta técnica también fue digerido con estas dos enzimas para garantizar una hibridación más precisa entre la sonda y el templado. Como control de calidad del ADN utilizado la misma membrana fue lavada para remover la sonda y rehibridarla con un fragmento de la chaperona de maíz HSP101 (Nieto-Sotelo et al, 2001) como control de la calidad del ADN y del procedimiento de hibridación. Esta sonda fue amablemente provista por el Dr. Nieto Sotelo.

En la figura 11 se observa el patrón de hibridación esperado en muestras con el doble promotor 35S. Las muestras presentadas pertenecen a los individuos analizados en la segunda ronda de análisis de la colecta de 2001. Abajo se indican los controles positivos.

Esta técnica es menos sensible que la técnica de PCR, ya que se necesitan muchas más moléculas del templado para obtener una hibridación. Este comportamiento está predicho por la teoría detrás de esta técnica, ya que se necesitan cuando menos 20 picogramos de ADN del gen que se quiere detectar dentro del ADN genómico fijado en la membrana, pues de lo contrario, aún estando presente, la sonda no podrá hibridarse y no se detectará señal en la autoradiografía. La cantidad de ADN total que se necesita para que un gen particular hibride es proporcional a la representatividad que éste ocupa (es decir el porcentaje relativo que representa el número de pares de bases del gen de interés con respecto al número de pares de bases del genoma en el que está inserto) en el genoma al que pertenece, por lo que el tamaño del genoma

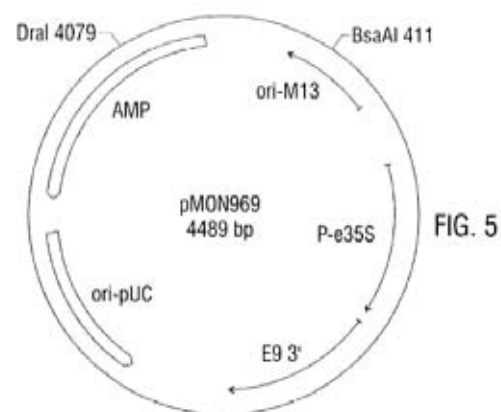
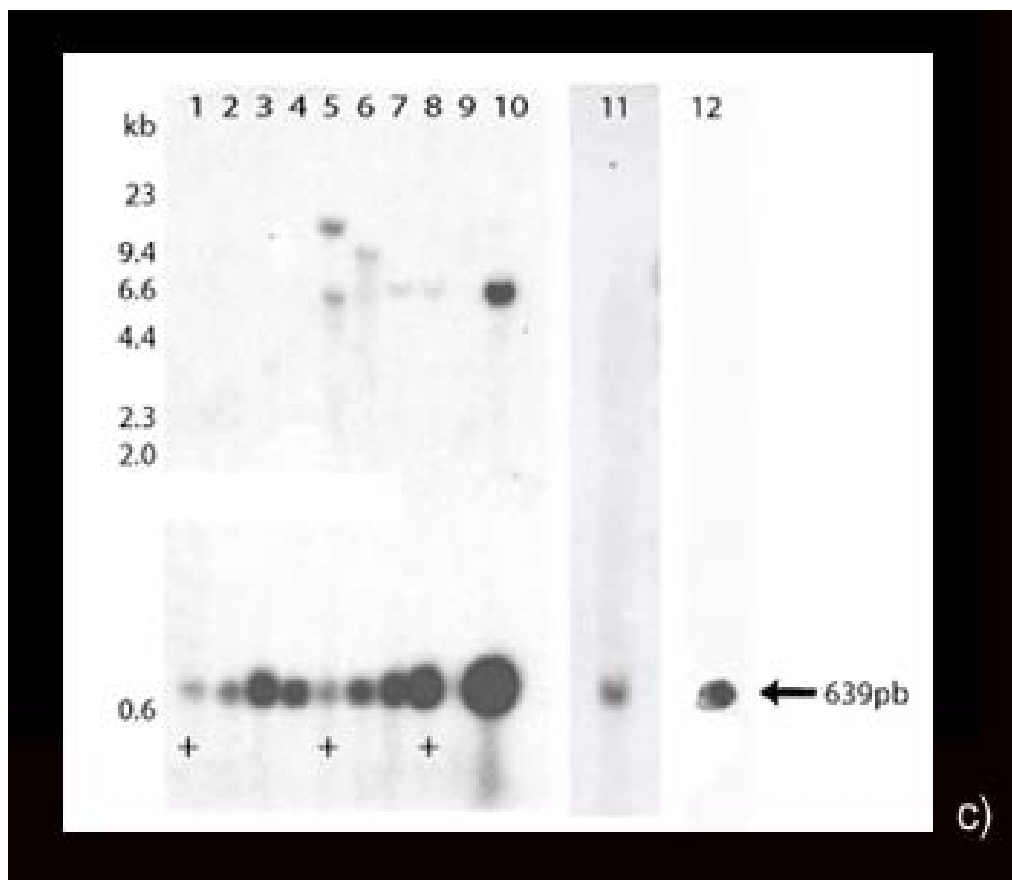


Figura 10. Mapa sintético del plásmido pMON969. Se observa el doble promotor 35S (P-e35). Esta imagen fue sacada del registro de la patente de pMON969: <http://www.freepatentsonline.com/6448473.pdf>

influye en la cantidad de ADN total que se necesita fijar a la membrana con el fin de representar en cantidad suficiente (20 picogramos) el gen que se quiere hibridar.

En el caso del genoma del maíz, se sabe que éste es de aproximadamente 3 millones de pares de bases. Por lo anterior, la cantidad mínima de ADN genómico total que hay que fijar a una membrana para que un fragmento de 639pb hibride es de 20µg. Para verificar lo anterior, se llevaron a cabo varios ensayos de Southern blot cambiando la cantidad de ADN genómico utilizado y se observó que el mínimo requerido para una hibridación exitosa son 20µg. Al utilizar cantidades menores, no se obtiene hibridación, aún con los controles positivos (MON810 y NK603) o con muestras que han salido positivas en varias hibridaciones independientes (muestras 7.2.4 y 7.3.4). Esto indica que esta técnica está sujeta a falsos negativos mucho más que a falsos positivos.

Figura 11. Southern blot de muestras positivas para el doble promotor 35S (ca. 639pb)



Claves: 1)marcador lambda HindIII, 2)MON810(+), 3)23.2.4, 4)7.2.4, 5) NK603(+), 6)7.3.4, 7)7.2.5, 8)NK603(+), 9)7.3.3, 10)23.5.3, 11)23.1.2, 12) 11.1.16. A la izquierda se presenta una escala de tamaños con respecto a lambda HindIII.

El éxito en la hibridación tipo Southern blot es dependiente de la cantidad de ADN fijado del gen de interés, así como la temperatura a la que se realiza la hibridación y cantidad de sales presentes en las soluciones de lavado de la membrana (ver materiales y métodos para información detallada sobre el protocolo utilizado en este trabajo). A mayor temperatura se tiene, por ejemplo, una hibridación más específica y a menor concentración de sales de las soluciones de lavado se eliminan uniones débiles inespecíficas (sobre todo uniones electrostáticas). Esta técnica es mucho menos sensible que la de PCR, en donde una molécula del templado es suficiente para amplificar el gen de interés. Esto implica que en una prueba de PCR hay posibilidades de que con una mínima cantidad de ADN contaminante se pueden obtener falsos positivos, mientras que la técnica de Southern blot necesita un mínimo de ADN mucho mayor, que además debe estar adecuadamente digerido y fijado en la membrana, por lo que es susceptible a generar falsos negativos, pero no falsos positivos. Por lo anterior, para fines de este trabajo, únicamente aquellas que hibridaron con la sonda del doble promotor 35S en geles con controles positivos claros. Ahora bien, la técnica de Southern blot es mucho más complicada que el PCR y solo puede ser realizada por personal autorizado para manejar sustancias radioactivas.

4.5. Compendio de resultados obtenidos mediante diferentes técnicas

En la tabla 7 se presenta un compendio de los resultados obtenidos por estas técnicas y sus variantes (PCR cuantitativo) para las muestras que fueron incluidas en esta segunda ronda de análisis.

Si comparamos entre sí las diferentes técnicas o variantes de una técnica, podemos observar que, al utilizar Taq Polimerasa de origen nativo (a partir de aquí "taq nativa") frente a la Taq Polimerasa de origen recombinante ("taq recombinante") el porcentaje de positivos disminuye significativamente, pasando de 25 (100% de los escogidos) a 14 (56%). Al comparar el resultado de la hibridación de estas muestras con su amplificación del promotor 35S mediante PCR se observó, que hay un 80% (8 de 10) de congruencia entre los resultados de ambas pruebas. Los casos en los que no coincidieron son un individuo que es positivo por PCR y no por Southern blot (7.3.3) y un individuo que es negativo por PCR y positivo por Southern blot (23.1.2).

Tabla 7. Submuestras analizadas para determinar presencia del promotor 35S y terminador NOS por PCR y Southern blot.

Código	UNAM-CINVESTAV		Genetic ID			UNAM
	35S R	35S N	35S	NOS ^t	Q PCR-35S	Southern blot (639pb)
2.1.18	1	0	1	1		0
5.1.13	1	-	1	1		-
5.1.14	1	1	1	1	0.50%	-
6.3.4	1	0	1	1		-
7.2.1	1	1	-	-		-
7.2.2	1	1	1	1		-
7.2.3	1	1	1	1		-
7.2.4	1	1	1	1	0.60%	1
7.2.5	1	1	0	0		1
7.3.3	1	1	-	-		0
7.3.4	1	1	1	0		1
7.5.2	1	0	1	1		-
7.5.5	1	1	1	1	100%	-
11.1.16	1	1	1	1		1
11.1.17	1	0	0	1		-
18.1.9	1	0	0	0		-
21.1.1	1	0	1	0		-
21.1.8	1	0	0	1		-
23.1.2	1	0	1	1		1
23.2.4	1	1	1	0		1
23.2.5	1	1	0	0		1
23.3.2	1	0	0	1		-
23.3.15	1	1	-	-		-
23.5.3	1	1	1	1		1
34 CIC 5	1	0	0	0		-
TOTAL	25	14	15	15	1	8
Controles						
MON810 (+)	1	1	1	1	120%	1
NK603-2 (+)	1	1	0	1	-	1
NK603-3 (+)	1	1			-	1
pMON969 (+)	1	1	-	-	-	1
Peru/BA (-)	0	0	0	0	-	0

El número 1 representa amplificación, el 0 no amplificación; - Muestra que no ha sido sometida a esa prueba. Los porcentajes reportados para el PCR cuantitativo fueron estimados por Genetic ID. En NK603-2 y NK603-3 representan dos plantas individuales (2 y 3) del mismo evento.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, en particular, aquellas muestras que hibridaron con el promotor 35S, se realizó una nueva colecta en dos de las localidades muestreadas originalmente (localidades 7 y 11). El diseño muestral de dicha colecta fue realizado con el fin de garantizar, con un 95 por ciento de confianza, la detección de un transgen a una frecuencia igual o mayor de 1%. En ambas comunidades se colectaron 30 parcelas, distribuidas aleatoriamente en el territorio de estos pueblos y en cada parcela se colectaron 300 hojas de plantas independientes. Los resultados preliminares indican la persistencia de transgenes en ambos lugares hasta por lo menos 2004.(ver discusión y conclusiones).

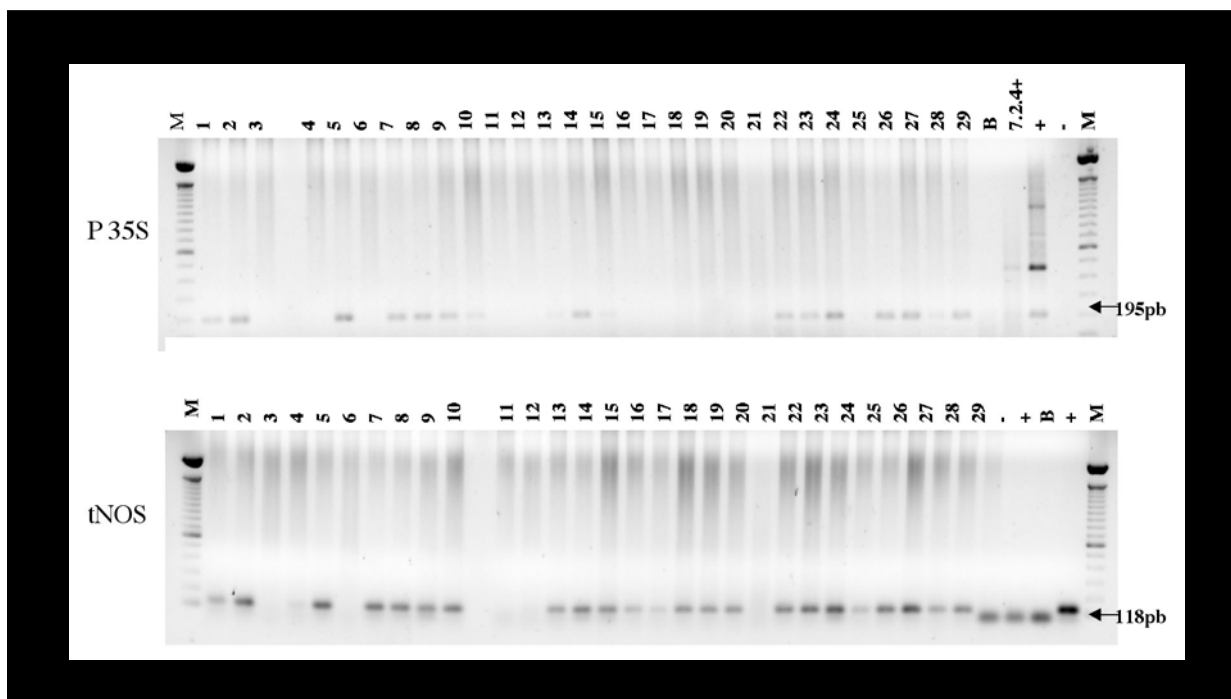
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados descritos en este trabajo ponen de manifiesto que existen problemas importantes para detectar confiablemente la presencia de transgenes en maíces criollos y en menor grado en los híbridos comerciales. Es importante resaltar, además, que la compañía Genetic Id presenta en algunos casos falsos negativos, en gran parte debidos al criterio de umbral asignado y no es totalmente consistente en los resultados que proporciona. Sin embargo, a pesar de los problemas de detección, nuestros resultados nos llevan a concluir que existen secuencias provenientes de transgénicos en las muestras de semillas de maíz colectadas en 2001 en el estado de Oaxaca. Basándose en los resultados de hibridación ADN-ADN, tres localidades que corresponden a tres agricultores presentaron el 35S proveniente de líneas transgénicas en su lote de semillas (i.e., una variedad local de maíz que el agricultor reconoce como particular y que es conservada a través de varias generaciones; para más información ver Dyer *et al*, en preparación). Dichas localidades son: Santa María Jaltianguis (localidad 7), Santiago Xiacui (localidad 11) y Santo Tomás Teipan (localidad 23). Las primeras dos localidades se encuentran en la Sierra Norte de Oaxaca, dentro del Distrito de Ixtlán de Juárez, mientras la tercera se localiza en la Sierra Mixteca.

Para las dos localidades ubicadas en la Sierra Norte de Oaxaca se regresó en el año 2004 y se realizó nueva colecta de hojas de maíz. Esta segunda colecta fue diseñada de tal forma que si un transgen estuviera presente a una frecuencia de 1% o más en una parcela particular habría un 95% de confianza de ser detectado. Así, en cada localidad se colectaron 30 parcelas, (equivalentes a 30 agricultores) y en cada parcela se colectaron 300 hojas. Además de la colecta de hoja se recabó información proporcionada por los agricultores participantes sobre la demografía y manejo de lotes de semilla de maíz con el fin de discernir los patrones de intercambio de semilla y las posibles vías de entrada de semillas transgénicas. Los resultados de esta colecta serán presentados en trabajos posteriores (Piñeyro-Nelson *et al*, en preparación y Heerwaarden *et al*, en preparación). El análisis molecular de esta colecta está en proceso, sin embargo es importante señalar que en ambas localidades los análisis preliminares arrojan resultados positivos apuntando a que las secuencias de origen transgénico (promotor 35S y tNOS) han persistido en las localidades muestreadas originalmente. A manera de ejemplo de los resultados obtenidos, en la figura 9 se presenta una foto de un gel de agarosa en el que se corrió el producto de PCR de la amplificación del promotor 35 y tNOS para extracciones de ADN de hojas individuales de una parcela de la localidad de Santa María Jaltianguis.

A reserva de finalizar los análisis moleculares y estadísticos de la colecta realizada en 2004, se pueden señalar varios puntos importantes a partir de los análisis hechos con la colecta del 2001, así como de la nueva colecta del 2004. La colecta hecha en 2001 no es representativa de las comunidades en donde se tomó ya que se colectó a un agricultor por comunidad y el máximo de mazorcas colectadas fue de 5, lo que tampoco es representativo de los lotes de semilla de un agricultor particular, además de que para detectar transgenes en frecuencias bajas (menores de 5%) este tamaño de muestra resulta inadecuado (para una discusión más amplia ver Cleveland *et al*, 2006). Además, es importante considerar que las poblaciones de maíz de una comunidad dada presentan una estructura poblacional clara y por tanto no son panmícticas, y para obtener estimados confiables de frecuencia de transgenes es importante tomar en cuenta dicha estructura genética particular (Cleveland *et al*, 2006 y Heerwaarden *et al*, en preparación). Para hacer más eficiente la colecta en campo, lo idóneo es conocer la estructura de las poblaciones de maíz de una comunidad o comunidades dadas; considerando que el maíz es una planta que requiere de la participación humana para su dispersión.

Figura 12. Foto de dos geles de agarosa de PCRs para amplificar el promotor 35S y el tNOS en ADN de hojas individuales



PCRs para amplificar el promotor 35S y el tNOS en ADN de hojas individuales de la parcela 17 de la localidad de Santa María Jaltianguis. M; Marcador de 100pb, B; blanco, +; control positivo, -; control negativo.

Por ejemplo, los parámetros de genética de poblaciones importantes para determinar la estructura genética de una población tales como la migración, están tanto o más relacionados

con las redes campesinas de intercambio de semilla al interior de una comunidad, como con la dispersión del gameto móvil del maíz (el polen). Dado lo anterior, el conocer cómo se lleva a cabo este intercambio es fundamental para diseñar una adecuada estrategia de muestreo (para un análisis a nivel nacional de los principales patrones de intercambio de semilla ver Dyer *et al*, en preparación). De lo contrario, el esfuerzo de muestreo se puede incrementar considerablemente (Cleveland *et al*, 2006). La colecta realizada en 2004 considera estos parámetros, y fue diseñada para ser representativa de las comunidades en las que se llevó a cabo.

El siguiente punto que se desprende de este trabajo es referente a las técnicas analíticas utilizadas para detectar secuencias y/o proteínas de origen exógeno y las secuencias más utilizadas para dicho fin. Si bien el promotor 35S y el tNOS son las secuencias de primera elección para llevar a cabo análisis moleculares con el fin de detectar eventos de maíz transgénico, existen por lo menos ocho variantes del promotor 35S utilizados para transformar plantas (Anklam, *et al*, 2002), cuestión que vuelve problemático el determinar si un resultado negativo para la amplificación de este marcador implica la inexistencia de éste, o si se trata de una variante en donde no se anclan los cebadores utilizados. Este problema se ejemplifica con los resultados obtenidos para el evento de maíz transgénico desarrollado por CIMMYT, el cual expresa una proteína Cry1Ab y contiene una variante del promotor 35S, que dirige la expresión del gen que confiere la resistencia a antibiótico. Esta característica y la expresión de la proteína Cry fueron introducidas en dos plásmidos independientes pero la evidencia molecular disponible apunta a que ambas construcciones se integraron como un solo locus que co-segrega en cada generación³. Dicho evento no fue detectado por un laboratorio especializado en la detección de transgenes como es Genetic ID, mientras que las pruebas de ELISA para la proteína Cry1Ab realizadas en nuestro laboratorio indican que la proteína se está expresando. Esto sugiere que el promotor 35S pudo no haberse detectado por encontrarse metilado lo que baja considerablemente la eficiencia en el anclaje de los cebadores, o que estemos frente a una de las variantes del promotor 35S en que los cebadores “universales” para esta secuencia no tienen sitio de reconocimiento o no se anclan eficientemente.

^{3 3} Esta información se desprende de los reportes de las siembras experimentales de maíz genéticamente modificado llevado a cabo en México antes de 2001, presentes en los archivos de la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera, ahora **Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)**. Estos documentos fueron pedidos al Instituto Federal de Acceso a la Información (IFAI).

Otra tendencia que puede complicar las labores de biomonitorio es el utilizar otros promotores constitutivos que provengan no de virus, sino de plantas, como el promotor de la ubiquitina del maíz. El discernir entre el promotor endógeno y el introducido será problemático a menos de que el promotor exógeno sea modificado con secuencias flanqueantes específicas que sirvan para distinguirlo del promotor endógeno.

La argumentación anterior, nos lleva a concluir que los resultados obtenidos pueden indicar que para el promotor 35S es más probable obtener falsos negativos que falsos positivos. Esta conclusión se apoya, además, por el hecho de que esta secuencia promotora tiene un sitio de recombinación al interior de su secuencia (Kohli *et al*, 1999) y en el se han observado fenómenos de modificación bioquímica como metilación de los residuos de citosina. Esto podría causar modificaciones nucleotídicas en su secuencia y con ello afectar el éxito de su amplificación vía PCR.

Por lo anterior, es fundamental tener acceso a la información completa y detallada de las secuencias que componen los diferentes eventos transgénicos liberados al medio, tanto los comercializados, como aquellos que se mantienen en modalidad experimental o piloto. En caso contrario, el llevar a cabo pruebas moleculares para determinar presencia y/o frecuencia de secuencias transgénicas en una muestra dada se torna problemático y se generan resultados inciertos. A su vez, el acceso a la información de las construcciones transgénicas completas, es necesario para poder diversificar el número de cebadores diseñados y por lo tanto las secuencias que se pueden detectar. Esto es fundamental si se considera que existen varios estudios en donde el promotor 35S es silenciado a nivel transcripcional lo que tiene como consecuencia inmediata que las pruebas basadas en la expresión transitoria de genes reporteros (como GUS), en la detección de ARNm, proteínas o resistencia fisiológica a herbicidas o antibióticos, pueden generar falsos negativos. Esto resulta grave pues las técnicas de biomonitorio que son más utilizadas en campo, que son menos costosas y que requieren menos entrenamiento del personal que las aplica, son aquellas basadas en pruebas fisiológicas y de determinación de proteínas recombinantes (ver tabla 2, sección 2.3. para un desglose de las técnicas disponibles). El silenciamiento puede ser potenciado por el cambio en la ploidía (por ejemplo, del polen al embrión) el cual puede alterar la expresión de un transgen (Mittelsten Scheid *et al.*, 1996; Vaucheret *et al.*, 1997, ambos citados en Qin *et al*, 2003) haciendo más compleja su detección. Para un desglose detallado sobre los tipos de silenciamiento en

monocotiledóneas, tanto a nivel de promotores como en genes codificantes, ver Lakshminarayan *et al*, 2000.

De estas consideraciones se hace patente que las técnicas moleculares que utilizan ADN para la detección de transgenes son las más utilizadas y confiables, ya que fenómenos de silenciamiento transcripcional y postranscripcional no parecen afectar la purificación de ADN ni el uso de éste para llevar a cabo hibridaciones tipo Southern blot. A su vez, la eficiencia de pruebas de amplificación de genes vía PCR parece verse poco afectada por esta razón, aunque ha habido poco trabajo para esclarecer esto. En animales se han detectado fenómenos de modificación bioquímica que involucran metilación de residuos de citosina y dichas modificaciones sí afectan la eficiencia en la amplificación de secuencias blanco; este caso ha sido reportado para ciertos genes involucrados en el síndrome del cromosoma X frágil en hombres, en donde mediante un tratamiento de bisulfito de sodio e hidroquinona, que induce la desmetilación *in Vitro* del ADN, se ha logrado amplificar y secuenciar el gen de interés. Este tipo de procesos de metilación diferencial han sido implicados en fenómenos de regulación génica durante procesos de desarrollo tanto en animales como en plantas, aunque no hay suficiente información sobre si se disminuye o no la eficiencia en la amplificación vía PCR de dichas secuencias en plantas. Otra potencial complicación adicional para amplificar al promotor 35S es la presencia de un sitio de recombinación en su interior (Kohli *et al*, 1999), el cual puede favorecer cambios en esta secuencia que la hagan irreconocible para los cebadores normalmente utilizados para amplificarla. Es fundamental investigar estas incógnitas con el fin de establecer si este tipo de procesos pueden ser un problema para la detección veraz de genes provenientes de transgénicos vía PCR.

A partir de los resultados presentados en la sección 4.5. es evidente que la utilización de una sola técnica de biología molecular como es el PCR y sus variantes (PCR a saturación, cuantitativo, etc.) es insuficiente para determinar con certeza la presencia de secuencias de origen transgénico. Esto es particularmente cierto si se desea detectarlas en trasfondos genéticos distintos a los que fueron originalmente utilizados en la transformación, como es el caso de diferentes razas de maíz, en donde, por ejemplo, la estandarización del PCR cuantitativo comercial ha sido problemático debido a la aparente presencia de varias copias del gen reportero (ver sección 4.2.). Además de esto, la amplificación reiterada mediante PCRs a saturación independientes, también es problemática (ver sección 4.3), tanto en nuestro

laboratorio, como en laboratorios que se dedican a determinar secuencias transgénicas, pues en el mejor de los casos, se obtiene un porcentaje de repetibilidad para una muestra dada de 80%.

Según lo observado en nuestro datos, la combinación del uso de PCR cualitativo y/o cuantitativo utilizando taq nativa más la hibridación tipo Southern blot han sido la mejor manera de evitar resultados incongruentes y particularmente, falsos positivos. En el caso de la hibridación ADN-ADN, es importante señalar que ésta se puede ver afectada por la cantidad de ADN fijado en la membrana (ver sección 4.4.) y también por el tamaño relativo del genoma y la sonda a usar. En el caso de los maíces nativos mexicanos, existe evidencia de que el genoma de varias de estas razas es por lo menos 25% más grande que las principales líneas híbridas que han sido transformadas (R. Rivera, com. pers.).

Los resultados presentados en esta tesis dejan claro que la introducción a campo abierto de variedades de maíz transgénico en México implicará la contaminación de los acervos naturales de las razas criollas de nuestro país como ya se ha planteado en diferentes escenarios teóricos (Serratos et al., 2004). Además, el esfuerzo de biomonitorio continuo que se requeriría para seguir la contaminación sería prácticamente imposible de realizar. Dicho esfuerzo, a partir de lo establecido en la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, atañe al gobierno mexicano, siendo las dependencias de Agricultura y Medio Ambiente las principales responsables. Esto implica gastos extraordinarios para el Gobierno de México, además de que por ahora no se cuenta con la infraestructura y personal técnicos necesarios. A la fecha, existe un laboratorio certificado para la detección de organismos genéticamente modificados y sus derivados que está a cargo del Instituto Nacional de Ecología (INE): el Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental (CENICA) en donde entre otras actividades, se lleva a cabo detección de transgénicos, pero aún no ha producido resultados concretos. Si bien el contar con este centro es un avance, un laboratorio resulta insuficiente para determinar la presencia de transgenes en las muestras que se necesitaría analizar si se pretende inspeccionar todo el territorio mexicano. Esto es particularmente cierto para el maíz que se cultiva en todo el país (ver mapa de diversidad de maíces y teocintles en México, sección 1) y representa más de las dos terceras partes del volumen total de cereales cultivados en nuestro país. Los resultados presentados aquí indican que será prácticamente imposible segregarse líneas transgénicas de maíz de sus contrapartes no modificadas genéticamente en México. A pesar de la moratoria a la siembra a campo abierto de maíz transgénico encontramos evidencia de presencia de transgenes en las colectas de 2001) en razas criollas de la Sierra Norte de Oaxaca. Además, las

técnicas moleculares utilizadas para realizar biomonitorio no presentan resultados consistentes, por lo que la determinación de presencia de secuencias transgénicas es lenta, cara y no es 100% confiable.

Tomando en cuenta los resultados de este trabajo, más el hecho de que México es el centro de origen y diversificación de *Zea mays ssp. mays*, del que existen al menos 41 razas distintas más todos sus parientes silvestres, es necesario reevaluar la introducción de maíz transgénico en México. Dada la importancia económica, social y cultural de este cultivo y el hecho incontestable de que los acervos de variabilidad genética de las especies cultivadas deben mantenerse libres de transgenes, no es aceptable aprobar la liberación a campo abierto de líneas transgénicas para este cultivo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Extracción de ADN y amplificación mediante PCR

Para llevar a cabo las pruebas moleculares se colectó tejido de hoja de plántulas individuales, el cual fue envuelto en aluminio, rotulado y congelado con nitrógeno líquido para después ser guardado a -70°C para su almacenamiento a largo plazo. La extracción de ADN fue realizada a partir de tejido molido manualmente en mortero previamente esterilizado. El protocolo de extracción utilizado es una versión modificada de aquel utilizado en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Ver apéndice 1. y pagina web: <http://www.cimmyt.org/english/wps/pubs/Catalogdb/catalog.cfm?monitor=1&data=protocol>

A partir del ADN extraído se realizaron pruebas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para detectar diferentes secuencias de origen transgénico (promotor 35S del CaMV y tNOS) más dos controles de calidad del ADN: un par de cebadores amplifica un fragmento de la subunidad 16s ribosomal y el otro par amplifica un fragmento de la chaperona de maíz HSP101 (Nieto-Sotelo et al, 2001). Este último juego de cebadores se diseñó con el fin de ser específico para ADN de maíz, con el fin de eliminar la posibilidad de estar amplificando ADN de otros eucariontes contaminantes (levaduras). Las secuencias de los cebadores utilizados son:

Tabla 8. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Gen amplificado	Tamaño producto	Orientación	Secuencia	Referencia
CaMV 35S	195pb	Sentido	GTCCCTACAAATGCCATCA	Brchers, <i>et al</i> , 1999
CaMV 35S	195pb	antisentido	GATAGTGGGATTGTGCGTCA	Brchers <i>et al</i> , 1999
tNOS	118pb	Sentido	GCATGACGTTATTTATGAGATGGG	Brchers <i>et al</i> , 1999
tNOS	118pb	antisentido	GACACCGCGCGGATAATTTATCC	Brchers <i>et al</i> , 1999
16s ribosomal	300pb	Sentido	TGAGAATGGATAAGAGGCTC	
16s ribosomal	300pb	antisentido	TGTTGTTCCCCTCCCAAGGG	
HSP101	152pb	sentido	CGGCCCTGAACAAATTGCAG	Piñeyro-Nelson <i>et al</i> , (en preparación)
HSP101	152pb	antisentido	GCTCACCACTGCCCATAGG	Piñeyro-Nelson <i>et al</i> , (en preparación)

En cada reacción de PCR se incluyeron controles positivos y negativos (ver tabla 5) además de muestras blanco para minimizar la posibilidad de artefactos debidos al uso de taq de origen recombinante.

El ciclo de amplificación fue: 94°C por 5 minutos, después 30 ciclos con 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos. Después, la extensión final fue a 72°C por 5 minutos. La temperatura de anclaje (annealing) fue lo único que se modifico para cada uno de los pares de oligonucleótido s: para el 35S fue de 58°C; para tNOS fue de 62.1°; para 16s fue de 55°C y para HSP101 fue de 62°C.

6.2 Hibridación ADN-ADN tipo Southern blot.

Esta técnica se estandarizó para la detección del doble promotor 35S del CaMV en maíz. A continuación se detallan los pasos de esta técnica, así como los puntos importantes a cuidar para obtener una hibridación exitosa.

Se necesitan 20µg de ADN de alto peso molecular, libre de ARN y sales.

Con el fin de liberar el doble promotor 35S del resto del genoma del maíz se lleva a cabo una doble digestión utilizando 20 unidades de cada una de las enzimas de restricción Bgl II y Hind III; se incuban por 6 horas a 37°C y después se precipita la digestión utilizando 0.1 volúmenes de NaOAC 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de Etanol al 100%, se mezcla por inversión suave unas 10 veces y se centrifuga a velocidad máxima por 10 minutos. Se decanta el sobrenadante y se agrega 1ml de etanol al 70% frío, se mezcla por inversión 10 veces y se centrifuga a máxima velocidad por 5 minutos, se decanta el sobrenadante y se deja secar la pastilla a temperatura ambiente.

Ya secas, las muestras se resuspenden en 20 a 30µl de buffer TE (Tris-HCl pH 8.0 10mM, EDTA pH 8.0 1mM), se agrega buffer de carga 1x y los fragmentos de ADN se separan por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% a 60 volts. Ya que el colorante haya corrido las tres cuartas partes del gel, se coloca el gel en un recipiente con 200ml de HCl 0.25M y se agita a 60rpm a temperatura ambiente hasta que el colorante del buffer de carga haya desaparecido. Se enjuaga el gel con agua destilada y se agregan 250ml de solución desnaturizante (NaCl 1.5M , NaOH 0.5M y se afora con agua destilada a 500ml) incubando por 30 minutos con agitación.

Después, se deshecha esta solución y se enjuaga el gel con agua destilada. Se agregan 250ml de solución neutralizante (NaCl 1.5M, Tris-base 0.5M pH 7.2, EDTA; 0.001M pH 7.2 y se afora con agua destilada a 500ml); se incuba por 15 minutos a temperatura ambiente, se deshecha esta solución y se agregan otros 250ml de solución neutralizante fresca. Se incuba por 15 minutos más. Se enjuaga con agua destilada y se monta el dispositivo de transferencia. El gel se coloca boca abajo sobre el dispositivo y se eliminan las burbujas de aire que queden atrapadas entre el gel y el papel filtro con una barilla de vidrio; se agrega una membrana de nylon Hybond+ (Amersham Pharmacia Biotech) a la medida y se agregan tres capas de papel filtro Whatmann. Se coloca una columna de 5cm de papel absorbente encima y después un vidrio con un peso de 1kg. Se agrega SSC 20x como solución de transferencia y se deja transferir toda la noche.

Después de la transferencia, dismantelar el dispositivo. Con pinzas tomar membrana y gel, volteándolos sobre una placa de vidrio, y sin retirar el gel marcar con lápiz los pozos sobre la membrana.

Revisar que la transferencia se haya realizado bien observando el gel y la membrana bajo rayos UV. El gel no debe tener nada de DNA y la membrana debe fluorecer.

Lavar brevemente la membrana en una solución de SSC 2X para remover residuos de agarosa.

Poner la membrana lavada con el DNA hacia abajo sobre un papel filtro nuevo y esperar a que seque.

Fijar el DNA de la membrana en el Sratalinker a 1200 μ joules x 100. (dos corridas).

Llevar a cabo la hibridación o envolver la membrana en plástico adherente y aluminio y guardar a 4 °C.

Preparar 20 ml de la solución de hibridación por cada membrana-tubo que se va a hibridar. Aquí esta la receta para 10ml:

Solución	Volumen	Concentración final
SSC 20X	3.0ml	6x
Soluc. de Denhardt 50x	1.0ml	5x
SDS 20% (p/v)	0.25ml	0.5%

Llevar a 10ml con agua destilada. Colocar la membrana en un tubo de hibridación y agregarle 10 ml de la solución de hibridación.

Desnaturalizar 0.1ml de solución 10mg/ml de DNA de esperma de salmón (conc, final 100 ug/ml), calentándolo a 100o C. por 2-5 minutos. Enfriar en hielo y añadir a la solución de hibridación.

Pre-hibridizar la membrana a 65o C en el horno de hibridación por 30´-2 horas.

Decantar y agregar 10 ml de solución fresca de hibridación. Desnaturalizar la sonda marcada previamente (a menos de que se esté utilizando RNA o DNAss) calentándola a 100o C. 2-5 minutos enfriar en hielo, dar un spin. Agregar la sonda a la solución de hibridación.

Incubar por lo menos 12-16 horas a 65o C.

Lavar los filtros en los mismos tubos de hibridación , incubándolos en 200 ml de SSC 2X y SDS al 0.1% por 15 minutos a 42 C en el horno de hibridación. Repetir.

Reemplazar la solución con SSC 0.1X y SDS al 0.1%. Incubar a 65o C. por 15 minutos. Repetir.

Si es necesario, hacer un lavado mas. (NOTA: este es un baño altamente astringente y debe ser omitido si secuencias relacionadas van a ser marcadas).

Remover la membrana, colocarlo sobre una pantalla y envolverlo en plástico adherente. Pegar asimetricamente dos tiras de masking tipe ancho y sobre estas, dos tiras de marcadores fluorescentes que servirán para localizar la posición exacta del film y llevar a cabo la autoradiografía.

7. REFERENCIAS

7.1. Artículos

Anklam, E., Madani, F., Petra H., Pijnenburg, H., Van Den Eede, G. (2002) *Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products*. **European Food Research Technology** 214:3-26.

Baltazar, M.B., Sánchez-González, J., Cruz-Larios, L., Schoper, J.B. (2005) *Pollination between maize and teosinte: an important determinant of gene flow in Mexico*. **Theoretical Applied Genetics**. 110:519-526.

Benz, B. (2001) *Archeological evidence of teosinte domestication from Guila Naquitz, Oaxaca*. **PNAS**; 98. 2104 2106.

Bohorova, N., Zhang, W., Julstrum, P., McLean, S., Luna, B., Brito, R.M., Diaz, L., Ramos, M.E., Estanol, P., Pacheco, M., Salgado, M., Hoisington, D. (1999) *Production of transgenic tropical maize with cryIAb and cryIAc genes via microprojectile bombardment of immature embryos*. **Theoretical Applied Genetics**. 99:437-444

Bohorova, N., Frutos, R., Royer, M., Estañol, P., Pacheco, M., Rascón, Q., McLean, S., Hoisington, D. (2001) *Novel synthetic Bacillus thuringiensis cry1B gene and the cry1B-cry1A translational fusion confer resistance to southwestern corn borer, sugarcane borer and fall armyworm in transgenic tropical maize*. **Theoretical Applied Genetics**. 103:817-826

Brchers, et al. (1999) *IUPAC collaborative trial study of a method to detect the presence of genetically modified soy beans and maize in food raw material*. **J. AOAC Int.** 82(4): 923-928.

Butler, D. (2002) *Alleged flaws in gene-transfer paper spark row over*. **Nature**. Vol. 415, 28february 2002

Clark, R.M., Tavaré, S., Doebley, J. (2005) *Estimating a Nucleotide Substitution Rate for Maize from Polymorphism at a Major Domestication Locus*. **Molecular Biology and Evolution**. Vol. 22(11): 2304-2312.

Christou, P. (2002) *No Credible Scientific Evidence is Presented to Support Claims that Transgenic DNA was Introgressed into Traditional Maize Landraces in Oaxaca, Mexico*. **Transgenic Research**. Vol 3: III-V.

Cleveland, D.A., Soleri, D., Aragón-Cuevas, F., Crossa, J., Gepts, P. (2005) *Detecting (trans)gene flow to landraces in centers of crop origin: lessons from the case of maize in Mexico*. **Environmental Biosafety Research**. 4: 197-208.

Dellaporta, S.L., Calderon-Urrea, A. (1994) *The Sex Determination Process in Maize*. **Science**. Vol. 266: 1501-1505.

Doebley, J., Iltis, H.H. (1980) *Taxonomy of Zea (Gramineae). I. A Subgeneric Classification with Key to Taxa*. **American Journal of Botany**. Vol. 67(6): 982-993.

- Doebley, J. (2004) *The Genetics of Maize Evolution*. **Annual Review in Genetics**. Vol 38: 37-59.
- Ellstrand, N., Prentice, H.N., Hancock, J.F.(1999) *Gene Flow and Introgression from Domesticated Plants into their Wild Relatives*. **Annual Review in Ecology and Systematics**. 30: 539-563.
- Ezcurra, E., Ortíz, S., Soberón, J. (2002) "Evidence of Gene Flow from Transgenic Maize to Local Varieties in Mexico". En: *LMOs and the Environment: Proceedings of an International Conference*. **OECD** pp. 289-295.
- Fox, J. (2005) *Report recommends ban of US GM maize in Mexico*. **Nature Biotechnology**. Vol. 23, No. 1:6.
- Ittis, H.H., Doebley, J. (1980) *Taxonomy of Zea (Gramineae).II. Subspecific Categories in the Zea Mays Complex and a Generic Synopsis*. **American Journal of Botany**. Vol. 67(6): 994-1004.
- Ittis, H.H. (1983) *From Teosinte to Maize: The Catastrophic Sexual Transmutation*. **Science**, New Series, Vol. 222, No. 4626: 886-894.
- Kaplinsky, N., Braun, B., Lisch, D., Hay, A., Hake, S., Freeling, M. (2002) *Maize transgene results in Mexico are artefacts*. **Nature** (brief communications) Vol. 416. †
- Kohli, A, Griffiths, S., Palacios, N., Twyman R.M., Vain, P., Laurie D.A., Christou, P. (1999) *Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the 35S CaMV promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination*. **The Plant Journal** 17(6), 591-601.
- Khush, G.S. (2001) *Green revolution: the way forward*. **Nature Reviews /Genetics**. Vol. 2, October. p. 815-822.
- Lakshminarayan, M.I, Kumpatla, S.P., Chandrasekharan, M.B., Hall, T. (2000) *Transgene silencing in monocots*. **Plant Molecular Biology**, 43:323-346.
- Lukens, L., Doebley, J. (2001) *Molecular evolution of the teosinte branched Gene Among Maize and Related Grasses*. **Molecular Biology and Evolution**. 18 (4): 627-638.
- Matsuoka, T., Kuribara, H., Takubo, K., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A. (2002) *Detection of Recombinant DNA Segments Introduced to Genetically Modified Maize (Zea mays)*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 50:2100-2109.
- Matsuoka, Y., Mitchell, S.E., Kresovich, S., Goodman, M., Doebley, J. (2002) *Microsatellites in Zea –variability, patterns of mutations and use for evolutionary studies*. **Theoretical Applied Genetics**. 104: 436-450.
- Metz, M., Fütterer, J. (2002) *Suspect evidence of transgenic contamination*. **Nature** (brief communications) Vol. 416.
- Ortiz-García, S., Ezcurra, E., Schoel, B., Acevedo, F., Soberón, J., Snow, A. (2005) *Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico (2003-2004)*. **PNAS**. Vol. 102, No. 35: 12338-12343.

Ortiz-García, S., Ezcurra, E., Schoel, B., Acevedo, F., Soberón, J., Snow, A. (2005) *Reply to Cleveland's et al.'s "Detecting (trans)gene flow to landraces in centers of crop origin: lessons from the case of maize in Mexico"*. **Environmental Biosafety Research**. 4: 209-215.

Qin, H., Dong, Y. y von Armin, A.G. (2003) *Epigenetic interactions between Arabidopsis transgenes: characterization in light of transgene integration sites*. **Plant Molecular Biology**. 52 : 217-231.

Quist, D., Chapela, I. (2001) *Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico*. **Nature**. Vol. 414: 541-543.

Serratos-Hernández JA, Isla-Gutiérrez F, Buendía-Rodríguez E. and Berthaud J. 2004. Transgenic flow scenarios with transgenic maize in Mexico. **Environ Biosafety Res** 3(3) : 149-157.

Shehata, M.M. (2005) *Genetically Modified Organisms (GMOs), food and feed: Current status and detection*. **Journal of Food, Agriculture and Environment**. Vol. 3(2), 43-55.

Tripathi, L. (2005) *Techniques for detecting genetically modified crops and products*. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 4(13) pp. 1472-1479.

Vigouroux, Y., Mitchell, S., Matsuoka, Y., Hamblin, M., Kresovich, S., Smith, J.S.C., Jaqueth, J., Smith, O.S., Doebley, J. (2005) *An Analysis of Genetic Diversity Across the Maize Genome Using Microsatellites*. **Genetics** 169: 1617–1630 .

Wang, R.L.; Stec, A., Hey, J., Lukens, L., Doebley, J. (1999) *The limits of selection during maize domestication*. **Nature**, Vol. 398, pp. 236-239.

Wang, H; Nussbaum-Wagler, T; Li, B; Zhao, Q; Vigouroux, Y; Faller, M; Bomblies, K; Lukens, L; Doebley, JF. (2005) *The origin of the naked grains of maize*. **Nature**, Vol. 436, pp. 714-719.

7.2. Libros y capítulos.

Astier, M. y Barrera, N. (2006) *Catalogo de maíces criollos de las cuencas de Patzcuaro y Zirahuén*. GIRA, INE, INIFAB, SEDAGRO y UNAM. Pp. 55.

Brown, T. (2003) "Commentary" En: *Current Protocols in Molecular Biology*. section 2.9A: *Southern blotting* Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, and Kevin Struhl (eds.) John Wiley & Sons, Inc. Accesado en línea: <http://www.mrw.interscience.wiley.com/cp/cpmb/articles/mb0209a/frame.html>

Bukler, ED y Stevens, NM (2006) *Maize Origins, Domestication and Selection*. Chapter 4, pp. 67-90. En prensa

Comisión de Cooperación Ambiental de América del Norte (CCA) "MAÍZ Y BIODIVERSIDAD Efectos del maíz transgénico en México: Conclusiones y Recomendaciones". En: *Informe del Secretariado conforme al artículo 13 del ACAAN*. Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte. 8 de noviembre de 2004

Dhillon, B.S., Vasal, S.K., Prasanna, B.M. (2002) "Maize" chapter 3 En: Evolution and Adaptation of Cereal Crops. Chpra, V.L. y Prakash, S. (Eds.) Science Publishers Inc. USA p. 97-133.

Doebley, J. (1993) "Sistemática molecular de *Zea* (Gramineae)". En: *Biología, ecología y conservación del género Zea*. Benz, B. (Comp). Universidad de Guadalajara, México. Pp. 43-58.

Florescano, E. (2003) "Imágenes y significados del dios del maíz". En: *Sin Maíz no hay País*. Esteva, G y Marielle, C (coords). Museo Nacional de Culturas Populares, México. pp.

Ittis, H. (1993) "La taxonomía del *Zea* desde una perspectiva histórica". En: *Biología, ecología y conservación del género Zea*. Benz, B. (Comp). Universidad de Guadalajara, México. Pp. 17-41.

Lazzeri, PA y Barceló, P. (2003) "Transformation in monocotyledons". En: *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, Vol. 1; Thomas, B., Murphy, D.J. y Murria, B.G. (eds.) Elsevier Academic Press.

Ortega Paczka, R. (2003) "La diversidad del maíz en México" Capítulo 3. En: *Sin Maíz no hay País*. Esteva, G y Marielle, C (coords). Museo Nacional de Culturas Populares, México. Pp. 123-154.

Sauer, JD. (1993) *Historical Geography of crop plants: a Select Roaster*. CRC press, USA. pp. 228-236.

Turrent A., and, J.A. Serratos. 2004. Chapter 1. Context and background on maize and its wild relatives. En: *Maize and Biodiversity: The effects of transgenic maize in Mexico*. CEC, Montreal, Canada

Twyman, RM; Christou, P; Stöger, E. (2002) "Genetic transformation of plants and their cells". En: *Plant Biotechnology and Transgenic Plants*. Oksman-Caldentey, KM y Barz, WH. (eds). Marcel Dekker Inc. USA. pp. 111-141.

Vavilov, N.I. (1992) "The important agricultural crops of pre-Columbian America and their mutual relationship" En: *Origin and Geography of Cultivated Plants*. Traducción de recopilado de obras de N.I: Vavilov publicado por NAUKA, 1987, URRS. Pp. 391- 416.

APENDICE 1.

El protocolo de extracción de ADN utilizado en este trabajo fue modificado de el siguiente protocolo del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT)

Extracción en gran escala de ADN

Liofilización

1. Coseche las hojas de plantas cultivadas en el invernadero o el campo. Es preferible utilizar hojas jóvenes sin zonas necróticas ni lesiones, aunque también se pueden utilizar hojas maduras que aún no llegan a la senescencia.

2. Si la nervadura central es gruesa y dura, deséchela. Corte o doble las hojas en secciones de 10 a 15 cm y colóquelas en una bolsa de malla de fibra de vidrio junto con la etiqueta que identifica la muestra (se pueden utilizar papel aluminio o bolsas de papel si se perforan para permitir el flujo de aire). Coloque las bolsas en una hielera u otro recipiente con hielo para mantener frías las muestras (pero no permita que se congelen). Asegúrese que no se mojen las muestras.

3. Coloque las muestras en un recipiente de espuma de poliestireno o algún otro tipo de recipiente que pueda contener nitrógeno líquido. Agregue nitrógeno líquido para congelar rápidamente las muestras. *No permita que se descongelen las muestras hasta que estén liofilizadas.*

NOTA: Las muestras pueden congelarse y conservarse a -80°C hasta el momento de liofilizarlas. 4. Transfiera las muestras congeladas al liofilizador. Asegúrese de que el liofilizador esté a una temperatura baja (la cámara debe estar a $< -50^{\circ}\text{C}$) y produzca un vacío adecuado (< 10 micrones Hg) antes de cargar las muestras. No sobrecargue el liofilizador; asegúrese de que el carío siempre sea de < 100 micrones y de que la temperatura de condensador sea de $< -50^{\circ}\text{C}$. Las muestras deben secarse en 72 horas. Por lo general, el peso de las hojas frescas equivale a \approx 10 veces el peso seco.

5. Las muestras secas pueden conservarse en bolsas de plástico herméticamente cerradas a temperatura ambiente por unos días o a -20°C , si se desea almacenarlas varios años.

6. Llene una hoja de registro de la cosecha.

Molienda

1. Muela las hojas con un molino mecánico (Tecator Cyclotec Sample Mill, Model 1093) hasta obtener un polvo fino, en un frasco de plástico que se pueda cerrar herméticamente.

NOTA: Si el material vegetal pesara menos de 4 g (peso fresco), muela hasta pulverizar en un molino de café con tapa al raz o en un mortero con nitrógeno líquido. Cuanto más fino se muela, mayor será la cantidad de ADN obtenida de una determinada cantidad de material.

2. Almacene las muestras molidas en frascos herméticamente cerrados, a -20°C . Así se mantienen estables durante varios años.

2

Aislamiento del ADN genómico

(basado en el método de Saghai-Marroof *et al.*, 19841)

1. Coloque entre 300 y 400 mg de tejido liofilizado y molido en un tubo de polipropileno de 15 ml para centrifugación. Se obtienen de 50 a más de 100 μg de ADN/100 mg de tejido seco. Si se requieren cantidades mayores, comience con 1 g de tejido liofilizado en un tubo de polipropileno de 50 ml para centrifugación y triplique todas las cantidades dada anteriormente. Si se requieren cantidades menores, ponga entre 100 y 150 mg de tejido liofilizado en un tubo de centrifugación de 5 ml y utilice un tercio de las cantidades dadas anteriormente.

2. Agregue 9.0 ml de solución amortiguadora CTAB para extracción, calentada (65°C), a los 300-400 mg de tejido liofilizado y molido. Es mejor distribuir el tejido sobre las paredes laterales del

tubo antes de agregar la solución amortiguadora, con el fin de evitar que se apelmace el tejido seco en el fondo. Mezcle invirtiendo el tubo varias veces con suavidad.

3. Incube durante 60 a 90 min en un horno a 65°C, agitando los tubos continuamente con suavidad.

4. Retire los tubos del horno. Espere de 4 a 5 min para que se enfríen los tubos y agregue 4.5 ml de cloroformo/octanol (24:1). Mezcle agitando suavemente los tubos durante 5 a 10 min.

5. Centrifugue en una centrifugadora de mesa durante 10 min a 1300-1500 x g 2 a TA.

NOTA: A menos de 15°C, el complejo de CTAB/ácido nucleico puede llegar a precipitarse, lo cual podría arruinar la preparación y dañar la centrifugadora.

6. Vierta la capa acuosa superior en otros tubos de 15 ml. Agregue 4.5 ml de cloroformo/ octanol y agite suavemente durante 5 a 10 min.

7. Centrifugue en una centrifugadora de mesa durante 10 min a 1300-1500 x g 2 a TA.

8. Con una pipeta, transfiera la capa acuosa superior a otros tubos de 15 ml que contengan 30 µl de 10 mg/ml de ARNasa A (previamente hervida). Mezcle invirtiendo con suavidad los tubos e incube durante 30 min a TA.

9. Agregue 6.0 ml de isopropanol (2-propanol). Mezcle invirtiendo con suavidad los tubos.

10. Retire el ADN precipitado con un gancho de vidrio.³ Continúe con las OPCIONES A, B o C.

OPCIÓN A: Extracción con fenol para obtener ADN de mayor pureza

Por lo general no es necesaria esta opción para los análisis de RFLP, a menos que el ADN no se digiera adecuadamente. De hecho, es mejor realizar una extracción con fenol sólo después de la digestión con enzimas de restricción; esto mejora la separación en bandas y la resolución de éstas después de la electroforesis del ADN (véanse más detalles en secciones posteriores).

1 Saghai-Maroo, M.A., K. Soliman, R.A. Jorgensen y R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. PNAS 81:8014-8018.

2 3000-3200 rpm en una centrifugadora Beckman GP o GPR, con rotor oscilatorio (que puede contener 56 x tubos de 15 ml).

3 Prepare el gancho de vidrio sellando primero el extremo de una pipeta de vidrio para transferencia de 23 cm, calentando el extremo en una llama durante unos segundos. Caliente luego 1 cm de la punta mientras hace rotar la pipeta. Cuando se ablande, deje que la punta se doble para formar un gancho. Enfríe antes de usarlo. Los ganchos usados se pueden limpiar lavándolos con dH₂O y EtOH.

3

11. Coloque el gancho con ADN en un tubo de plástico de 5 ml que contenga 1 ml de TE; haga girar con suavidad el gancho hasta que el ADN se deslice de él. Tape los tubos y agítelos suavemente a TA hasta el día siguiente, para disolver el ADN.

12. Extraiga cada muestra con 1 ml (1 x el volumen original de TE) de fenol equilibrado o 1:1 de fenol: cloroformo. Centrifugue la muestra durante 10 min a 1300 x g₁ en un rotor de cubeta oscilatoria.

13. Transfiera la capa (acuosa) superior a otro tubo. Extraiga el ADN con 1 ml (1 x el volumen original de TE) de cloroformo/octanol. Centrifugue la muestra 10 min a 1300 g₁ en un rotor con cubeta oscilante. Transfiera la capa (acuosa) superior a un tubo nuevo. Continúe con el paso 15 de la OPCIÓN B.

OPCIÓN B: Precipitación con etanol

14. Coloque el gancho con ADN en un tubo de plástico de 5 ml que contenga 1 ml de TE; rote con suavidad el gancho hasta que el ADN se deslice del mismo. Tape los tubos y agite suavemente durante toda la noche a temperatura ambiente para disolver el ADN. 15. Precipite el

ADN agregando 50 µl de 5 M NaCl y luego 2.5 ml de EtOH absoluto (2.5 el volumen original de TE); mezcle invirtiendo con suavidad el tubo.

16. Retire el ADN precipitado con el gancho de vidrio. Continúe con el paso 17 de la OPCIÓN C.

OPCIÓN C: Lavados del ADN

17. Coloque el gancho con ADN en un tubo de plástico de 5 ml que contenga 3 a 4 ml de LAVADO 1. Deje el ADN en el gancho dentro del tubo durante unos 20 min.

18. Enjuague brevemente el ADN del gancho en 1 a 2 ml del LAVADO 2 y transfíralo a un tubo de plástico de 5 ml (preferiblemente un tubo Sarsted con tapas giratorias para evitar que se evapore el TE) que contenga 0.5 a 1.0 ml de TE (nosotros utilizamos 0.3-0.5 ml. para maíz y 0.5-1.0 ml. para trigo); haga girar con suavidad el gancho hasta que el ADN se deslice del gancho. Tape el tubo y agítelo con suavidad a la temperatura ambiente hasta el día siguiente, para disolver el ADN. Almacene las muestras a 4°C.

Solución amortiguadora con CTAB para extracción¹ 1 RXN 5 RXN 10 RXN 20 RXN 50 RXN 60 RXN

SOL. CONC.	[FINAL]	10 ml	50 ml	100 ml	200 ml	500 ml	600 ml
dH ₂ O		6.5 ml	32.5 ml	65.0 ml	130.0 ml	325.0 ml	390.0 ml
1 M Tris-7.5	100 mM	1.0 ml	5.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	50.0 ml	60.0 ml
5 M NaCl	700 mM	1.4 ml	7.0 ml	14.0 ml	28.0 ml	70.0 ml	84.0 ml
0.5 M EDTA-8.0	50 mM	1.0 ml	5.0 ml	10.0 ml	20.0 ml	50.0 ml	60.0 ml
CTAB ²	1 %	0.1 g	0.5 g	1.0 g	2.0 g	5.0 g	6.0 g
14 M BME ³	140 mM	0.1 ml	0.5 ml	1.0 ml	2.0 ml	5.0 ml	6.0 ml

- 1 Utilice la solución recién hecha; calentar a 60-65 °C antes de agregar CTAB y BME.
- 2 CTAB = bromuro mixto de alquiltrimetil-amonio (Sigma M-7635).
- 3 Agregar BME (β-mercaptoetanol) bajo una campana extractora, justo antes de usarse.

LAVADO 1: 76% de EtOH, 0.2 M NaOAc

SOL. CONC.	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
EtOH absoluto	76 ml	152 ml	228 ml	304 ml	380 ml
2.5 M NaOAc	8 ml	16 ml	24 ml	32 ml	40 ml
dH ₂ O	16 ml	32 ml	48 ml	64 ml	80 ml

LAVADO 2: 76% EtOH, 10 mM NH4OAc

SOL. CONC.	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
EtOH absoluto	76 ml	152 ml	228 ml	304 ml	380 ml
1 M NH4OAc	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml
dH2O		23 ml	46 ml	69 ml	92 ml
					115 ml

**CLOROFORMO:OCTANOL:
24:1**

SOL. CONC.	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
Cloroformo 96 ml		192 ml	288 ml	384 ml	480 ml
Octanol 4 ml		8 ml	12 ml	16 ml	20 ml

Extracción de ADN de pequeñas cantidades de tejido liofilizado

Para extraer ADN de pequeñas cantidades de tejido liofilizado (~ 50 mg), utilice tubos de 2 ml y proceda como sigue:

1. Agregue 1 ml de solución amortiguadora CTAB.
2. Incube durante 60 min agitando continuamente con suavidad.
3. Retire los tubos de la incubadora; déjelos enfriar y agregue 1 ml de cloroformo:etanol. Mezcle durante 10 min.
4. Centrifugue durante 10 min.
5. Retire 700 µl de la capa acuosa superior.
6. Agregue 10 µl de 10 mg/ml ARNasa A. Mezcle e incube durante 30 min.
7. Agregue 1 ml de isopropanol y mezcle.
8. Centrifugue los tubos durante 15 min a 12000 rpm para precipitar el ADN.
9. Retire la capa supernadante y seque el ADN a TA.
10. Vuelva a suspender en 200 µl de TE.

Bibliografía:

CIMMYT. 2006. Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. Tercera edición. México, D.F.: CIMMYT. P.1 a 4. ISBN: 968-6923-43-8

TABLA CALCULO FRECUENCIAS POSITIVOS PARA 35S UNAM

UNAM PRIMERA ESTIMACIÓN					UNAM SEGUNDA ESTIMACIÓN				
Localidad	Valores		Intervalos de 95%		Localidad	Valores		Intervalos de 95%	
	N	frec.	Inf.	Sup.		N	frec.	Inf.	Sup.
1	15	0.07	0.00	0.32	1	17	0.00	0.00	0.16
2	30	0.00	0.00	0.12	2	30	0.09	0.05	0.24
3	51	0.20	0.10	0.33	3	45	0.00	0.00	0.06
4	57	0.11	0.04	0.22	4	45	0.02	0.01	0.10
5	78	0.09	0.04	0.18	5	45	0.09	0.05	0.19
6	66	0.11	0.04	0.21	6	51	0.02	0.01	0.09
7	110	0.09	0.04	0.16	7	79	0.09	0.05	0.16

8	56	0.07	0.02	0.17	8	45	0.00	0.00	0.06
9	53	0.11	0.04	0.23	9	48	0.00	0.00	0.06
10	102	0.05	0.02	0.11	10	75	0.05	0.03	0.12
11	29	0.14	0.04	0.32	11	29	0.10	0.05	0.25
12	15	0.13	0.02	0.40	12	15	0.00	0.00	0.18
13	40	0.08	0.02	0.20	13	45	0.02	0.01	0.10
14	50	0.26	0.15	0.40	14	30	0.06	0.03	0.20
15	47	0.19	0.09	0.33	15	15	0.00	0.00	0.18
16	47	0.00	0.00	0.08	16	15	0.00	0.00	0.18
17	66	0.03	0.00	0.11	17	30	0.03	0.01	0.15
18	40	0.00	0.00	0.09	18	32	0.00	0.00	0.09
19	33	0.03	0.00	0.16	19	50	0.00	0.00	0.06
20	21	0.05	0.00	0.24	20	30	0.00	0.00	0.10
21	86	0.10	0.05	0.19	21	36	0.03	0.01	0.12
22	-	-	-	-	22	15	0.00	0.00	0.18
23	-	-	-	-	23	56	0.04	0.01	0.11
TOTAL	1092	0.09	0.08	0.11	TOTAL	831	0.04	0.03	0.05