



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE QUÍMICA
INOCUIDAD, CALIDAD Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

“DETECCIÓN DE POLEN GENÉTICAMENTE MODIFICADO EN MIEL DE LA COSTA DE
OAXACA”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PRESENTA:
MVZ GEMMA ANGÉLICA IBARRA REGALADO

TUTOR:
MC ENRIQUE JESÚS DELGADO SUÁREZ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

COMITÉ TUTORAL:
DRA. AMANDA GÁLVEZ MARISCAL
FACULTAD DE QUÍMICA UNAM

DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD MX, NOVIEMBRE 2016



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.

DEDICATORIA

A Dios y a la Vida, por el regalo de ser y estar

A mi Mamá, gracias por tu amor incondicional

*A mi Esposo, por tu amor y apoyo absoluto, por ser un excelente compañero, amigo y
cómplice de vida.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme las puertas una vez más, por la oportunidad de conocer y crecer de manera profesional y personal.

Al Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, por permitir realizar pequeños proyectos de investigación que se generan de las necesidades comerciales de grupos vulnerables.

A Fundación PRODUCE Oaxaca AC, por el apoyo económico para la realización de este estudio.

A todos los apicultores que nos abrieron las puertas en sus Asociaciones y participaron en este proyecto, a la MC Aurora Xolalpa Aroche, por el espíritu de entrega a la investigación, por cada enseñanza y sobre todo, por tu amistad.

A la Dra. Amanda Gálvez Mariscal, por su invaluable apoyo, gracias por su amor a la ciencia, por su ejemplo de excelencia, dedicación, humanidad y profesionalismo.

Al MC Enrique Delgado Suárez, por el apoyo y orientación para éste estudio, mi agradecimiento por siempre buscar la forma de fortalecerlo y por su infinita paciencia. A la Dra. María Salud Rubio Lozano por su apoyo.

A mis sinodales, Dra. Laura Espinosa, Dra. Maricarmen Quirasco, Dr. Liborio Carrillo y Dr. Antonio Verdugo, por sus valiosas aportaciones para la mejora de este trabajo, por su trabajo crítico, su paciencia, apoyo y por compartir su experiencia y conocimientos conmigo.

A todo el equipo del laboratorio 312 de la Facultad de Química, a las Doctoras Amelia, Maricarmen y Carolina, junto con todos sus alumnos, por abrirme las puertas de par en par para la realización práctica de este proyecto, así como la oportunidad para aprender de y con Ustedes.

Al Dr. Rogelio Alonso, por su interés en participar en este comité tutorial, por su valiosa orientación y criterio científico. Al laboratorio de Genética Molecular/FMVZ dirigido por la Bióloga Amanda Gayosso, a todo su equipo, en especial a Adriana, Vianey y Benedict.

A la QA Cindy Estrada, por tanto que me enseñaste en esta aventura de integrarme a las actividades de investigación en laboratorio. Soy afortunada porque no pude tener mejor maestra, pero la maravilla fue encontrar en ti a una amiga. También agradezco todo el cariño, amistad y apoyo de la QA Irma Hernández y a la MVZ Julia Hernández gracias, imposible tener mejores compañeras, hicieron de ésta, una de las mejores experiencias.

RESUMEN

DETECCIÓN DE SECUENCIAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS EN MIEL DE LA COSTA DE OAXACA

La creciente autorización de cultivos genéticamente modificados en México representa un riesgo latente de diseminación de secuencias genéticamente modificadas (SGM) en el ambiente. Lo anterior supone un importante desafío para los productores de miel, producto que por naturaleza contiene polen de los cultivos y/o floraciones a partir de los cuales se alimentan las abejas. De hecho, la detección de SGM en la miel ha generado problemas en su comercialización, sobre todo en la que se exporta al mercado europeo, principal destino de la miel mexicana. Lo anterior debido a que en ese mercado existe tolerancia cero para la presencia de SGM no autorizadas por la legislación europea. En el caso de la miel orgánica, muy común en la costa de Oaxaca, el etiquetado orgánico en Europa está condicionado a que la misma esté libre de cualquier tipo de SGM (aun de las autorizadas). Por ello, es imperativo que los productores y exportadores de miel mexicana, tanto convencional como orgánica, evalúen el estado de la miel con respecto a la presencia de SGM para evitar sanciones económicas o rechazos de producto. Este estudio tuvo como objetivos investigar la probable liberación de cultivos transgénicos en municipios de la costa de Oaxaca, así como evaluar la presencia de SGM de origen vegetal en la miel, a partir de la detección del promotor 35S del virus del Mosaico de la Coliflor (p-35S) y/o del terminador Nopalina Sintasa (t-nos), ambos comúnmente empleados en los eventos autorizados en México. Para ello, se realizó una búsqueda de los permisos de liberación otorgados por el gobierno mexicano a escala nacional. Además, se utilizó la técnica de PCR-tiempo real para detectar la presencia de p-35S y t-nos en un grupo de 67 muestras de miel proveniente de 911 apiarios y 18 municipios de la costa oaxaqueña. En la búsqueda de liberación de permisos, se encontró que en Oaxaca no existen permisos oficiales de liberación de cultivos genéticamente modificados. Asimismo, ninguna de las muestras resultó positiva a la presencia de p-35S o t-nos. Sin embargo, estos resultados no significan que haya ausencia de SGM. El presente trabajo no incluyó otros promotores y/o terminadores que pueden estar presentes en otros eventos autorizados en el país. Además, existe el riesgo latente de captación de SGM en la miel debido a la itinerancia de las colmenas con fines de

polinización de cultivos agrícolas. En virtud de lo anterior, resulta conveniente realizar otros estudios que incluyan el perfil completo de eventos autorizados en México. Adicionalmente, resulta imperativo estudiar si la itinerancia de las colmenas para polinización de cultivos representa una fuente oculta de SGM en la miel.

ABSTRACT

The increasing authorizations of genetically modified crops in Mexico pose a latent risk for the dissemination of genetically modified sequences (GMS) in the environment. The latter is an important challenge for honey producers since honey naturally contains pollen, which is introduced by the bees from flowers and crops. In fact, the detection of GMS in honey has been causing trade issues, especially in that exported to the European Union (EU), which is the main market for Mexican honey exports. The latter is due to the zero tolerance policy to non-registered GMS imposed by EU regulations. As regards organic honey, which is common in the Oaxaca shore region, the UE organic labeling regulations forbid the use of the organic denomination if it contains any GMS (even the registered ones). Therefore, it is of utmost importance that Mexican producers and exporters of both conventional and organic honey assess the presence of GMS in their product. This will help them avoid price discounts or even rejection of shipments. The present study is aimed to search for the release of genetically modified crops in the Oaxaca shore region, as well as to assess the presence of GMS in honey by means of detecting the cauliflower mosaic virus 35S promoter (p-35S) and/or the nopaline synthase terminator (t-nos), which are commonly used in the SGM authorized in Mexico. For that purpose, we performed a nationwide search of GMS authorizations given by the Mexican government. Moreover, the real-time PCR technique was used to screen for the presence of p-35S and t-nos in 67 honey samples from 911 apiaries located in 18 municipalities of Oaxaca State. The search for genetically modified crops showed no official authorizations of GMS in Oaxaca. Likewise, none of the samples was positive to 35S or t-nos. However, these results should be used with caution since there are events of GMS that use other promoters and/or terminators. Moreover, the risk of GMS introduction in honey is latent, due to the itinerancy of apiaries for polinization of crops. Given these facts, it is convenient to conduct future studies dealing with the whole profile of GMS authorized in Mexico. In addition, it is imperative to study if the itinerancy of hives for crop polinization represents a hidden source of GMS in honey.

Índice

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT	V
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LA LITERATURA	2
Organismos genéticamente modificados y los cultivos	2
Principales construcciones genéticas en plantas	5
Cultivos GM en el mundo y en México	7
MARCO LEGAL EN MATERIA DE OGM.....	12
En México	12
En Comunidad Europea	14
EL SECTOR APÍCOLA MEXICANO Y LOS OGM.....	15
Producción nacional y exportación de la miel mexicana	15
Problemática de regulación europea y comercialización de miel mexicana.....	18
DETECCIÓN DE SGM EN ADN DE POLEN CONTENIDO EN MIEL	19
Métodos de detección de SGM de polen en miel.....	20
Disposición de recursos técnicos y problemática para la detección en México	21
OBJETIVOS	24
HIPÓTESIS.....	24
MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
Diseño de plan de muestreo	24
Muestreo.....	24
Toma de muestras	27
Análisis de las muestras en laboratorio.....	28
Análisis de muestras por laboratorio extranjero.....	32
Curvas estándar de kits Taqman GMO	33
RESULTADOS.....	39

Análisis PCR tiempo real	39
Detección de maíz GM.....	39
Prueba para t-nos.....	42
Prueba para actina de planta.....	43
Análisis de muestras en laboratorio extranjero	44
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	51
PROSPECTIVA.....	52
REFERENCIAS.....	53

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Estados con cultivos genéticamente modificados	04
Figura 2. Porcentajes de los eventos autorizados en México que se identifican con la prueba de detección de p-35S y t-nos	07
Figura 3. Eventos autorizados para cultivo en México	08
Figura 4. Regiones apícolas de México	09
Figura 5. Movilización nacional de colmenas 2009	11
Figura 6. Ejemplos de rutas de movilización de colmenas y estados con eventos autorizados	11
Figura 7. Eventos autorizados en la Comunidad Europea	15
Figura 8. Principales estados productores de miel orgánica	18
Figura 9. Municipios de Oaxaca en el estudio	26
Figura 10. Proceso para extracción de polen de 50 g de miel	29
Figura 11. Representación esquemática de la construcción del maíz MON810	33
Figura 12. Representación esquemática de la construcción de la soya MON 04032-6	33
Figura 13. Curva estándar y coeficiente de correlación para gen endógeno de maíz	35
Figura 14. . Curva estándar y coeficiente de correlación para p-35S de maíz	36
Figura 15. Curva estándar y coeficiente de correlación para gen endógeno de soya	37
Figura 16. Curva estándar y coeficiente de correlación para p-35S de soya	38
Figura 17. Amplificaciones muestras #3 y #5	41

Figura 18. Amplificaciones muestras #60 y #67	42
Figura 19. Amplificaciones muestras #52 y #65	43
Figura 20. Amplificaciones muestras #25 y #47	44

Lista de Tabla

	Página
Tabla 1. Promotores y terminadores en eventos autorizados en México	06
Tabla 2. Principales cultivos GM en el mundo	07
Tabla 3. Tamaño de muestra	25
Tabla 4. Municipios y números de apiarios en el estudio	27
Tabla 5. Extracción de polen en pellet	28
Tabla 6. Media de la concentración de ADN de polen contenido en miel (ng/ul)	28
Tabla 7. Constantes para PCR tiempo real	31
Tabla 8. Secuencias de primers y sonda para t-nos y actina	31
Tabla 9. Curva estándar para endógeno de maíz MON810	35
Tabla 10. Curva estándar para p-35S en maíz MON810	36
Tabla 11. Curva estándar para endógeno de soya MON 04032-6	37
Tabla 12. Curva estándar para p-35S en soya MON 04032-6	38
Tabla 13. Resultados de las muestras con kit TaqMan GMO Detection Maize	39
Tabla 14. Resultados de las muestras con kit TaqMan GMO Detection Soy	41
Tabla 15. Ct prueba de detección de actina de planta	43

INTRODUCCIÓN

La creciente autorización de cultivos genéticamente modificados en México representa un riesgo latente de diseminación de secuencias genéticamente modificadas (SGM) en el ambiente. Lo anterior supone un importante desafío para los apicultores, ya que la miel por naturaleza contiene polen de las floraciones a partir de los cuales se alimentan las abejas (SENASICA a, 2016; SENASICA b, 2016).

En estudios recientes se ha reportado la presencia de polen con SGM en miel de Yucatán, Campeche y Quintana Roo (CONABIO, 2014; Villanueva et al. 2014). Estos autores encontraron secuencias que contienen el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (p-35S) y/o el terminador Nopalina Sintasa (t-nos), los cuales son comúnmente utilizados para insertar las modificaciones en el material genético de las plantas (Villanueva et al., 2014; Gálvez et al., 2013)

La situación antes descrita ha derivado en serias afectaciones en las exportaciones de miel mexicana (C. García, comunicación personal, enero 2013). Ello obedece a las regulaciones internacionales en materia de organismos genéticamente modificados, especialmente en la Unión Europea (UE), principal destino de la producción nacional. En el caso de la miel orgánica, la problemática es que la legislación europea prohíbe su etiquetado como producto orgánico si ésta contiene SGM de cualquier tipo. En miel convencional, existe tolerancia cero para aquellos eventos no autorizados dentro la UE (Europea, 2003b; Europea, 2008) . Esto representa un serio problema, debido a que del 100% de la miel producida en México, el 30.72 % es utilizada en la industria, el 30.28% en consumo directo, 2% autoconsumo y 34% para exportaciones, este último concepto representa una importante fuente de ingreso para el sector apícola, razón por la cual el desarrollo de este sector puede impulsarse a través de continuar con un crecimiento en las exportaciones (INFOASERCA, 2010; IICA, 2012).

En el estado de Oaxaca, se han presentado incidentes comerciales que involucran a productores de miel orgánica. En estos, los compradores europeos han aplicado penalizaciones en el precio del producto aduciendo la supuesta presencia de SGM en la miel de la zona (C. García, comunicación personal, enero 2013).

Lo anterior motivó la realización de esta investigación, que tiene por objetivos investigar la probabilidad de que haya cultivos transgénicos en el estado de Oaxaca, así como determinar la presencia de SGM en el polen contenido en la miel de la región mediante la detección del p-35S y del t-nos.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Organismos genéticamente modificados y los cultivos

Los OGM, también denominados organismos vivos modificados (OVM) u organismos transgénicos, son organismos vivos que poseen una combinación nueva de material genético, lo cual se logra mediante la aplicación de la biotecnología moderna. Lo anterior implica el uso de técnicas *in vitro* de modificación de ácidos nucleicos, incluidos el ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u organelos; o bien, la fusión de células más allá de la familia taxonómica, superando las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o de la recombinación, ya que no son técnicas utilizadas en la reproducción y en la selección tradicional (ONU, 2000).

En la última década la biotecnología, que es la aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos, organismos vivos o derivados de estos con el propósito de hacer o modificar los productos o procesos para un uso específico, se ha modernizado. Ahora es posible a través de técnicas de laboratorio, separar un solo gen de una célula vegetal o animal e insertarlo en el material genético de otra célula vegetal o animal para proporcionarle una característica deseada (ONU, 2000) .

En las plantas se realizan estas modificaciones para conferirles características específicas a los cultivos. Entre las más frecuentemente expresadas son:

- ✓ Modificación de la planta contra virus, los virus que atacan plantas generan afectaciones a la agricultura, al dañar el crecimiento, calidad y cantidad de los cultivos, por esta razón, se ha incorporado fragmentos de material genético procedente de virus de plantas, con lo cual se desarrolla una inmunidad ante el virus específico.
- ✓ Expresión de toxinas bacterianas, las plantas son susceptibles a los insectos, los cuales pueden ser eliminados mediante insecticidas, pero con la finalidad de disminuir los efectos nocivos de éstos, en los últimos 30 años se ha decidido ocupar pesticidas naturales, como el que produce la bacteria *Bacillus thuringiensis (Bt)*, que es una proteína cristalina de 120 aminoácidos, que es tóxica para las larvas de los lepidópteros (mariposas, polillas) y coleópteros (escarabajos), ésta no tiene efectos en vertebrados.
- ✓ Tolerancia a herbicidas, el uso de herbicidas es común para eliminar las plantas no deseadas de los cultivos, sin embargo, estos no son selectivos, así que merma la producción. Con la biotecnología moderna, se ha podido modificar el ADN de las plantas para generar cultivos tolerantes a herbicidas, como el glifosato. De esta manera, al aplicarlo, no daña el cultivo y sí produce la muerte de las especies no deseadas.
- ✓ Resistencia a herbicidas e insectos, se han generado combinaciones que incluyen la resistencia dual a herbicidas y al ataque de insectos.
- ✓ Resistencia al estrés abiótico, actualmente los problemas ambientales que afectan a los cultivos son, la pérdida de agua y el exceso de sales en el suelo. Es por eso que se buscan modificaciones genéticas que fortalezca a los cultivos frente a estos factores ambientales, mediante la captación y transporte de sodio y potasio, estableciendo gradientes de concentración, eliminación y secuestro de iones tóxicos.
- ✓ Retardamiento en la maduración de frutos y flores, el proceso de inicio y maduración se debe a los niveles de etileno de las plantas. Al controlar los niveles

de etileno se puede prolongar la vida de anaquel de los productos (Watson and Gilman, 1997; CONABIO, 2008; Benítez, 2005).

La biotecnología moderna, se ha utilizado en la agricultura, ha tenido un gran auge, y a su vez, ha sido adoptada cada día por más productores en el mundo. Como resultado, durante el 2009 se sembraron 134 millones de hectáreas de cultivos genéticamente modificados (GM). Para el año 2010, algunos países sembraron más de 1 millón de has de cultivos GM, y la superficie mundial fue de 148 millones has, mientras que en 2012 aumentó a 170.3 has (MONSANTO, 2014; Clive, 2012).

México, en el listado de los 28 países con mayor superficie destinada a cultivos GM, ostenta el lugar número 16. A pesar, de no ser uno de los líderes en hectáreas cultivadas, para la superficie total del país sí es un tema de importancia, debido a que dichos cultivos, se encuentran dispersos en más de la mitad del territorio nacional (Figura 1), este crecimiento en el área cultivable de transgénicos, representa un riesgo de dispersión de material GM, que puede incorporarse a la miel a través del pecoreo de las abejas y de la movilización de colmenas pobladas (MONSANTO, 2014; SENASICAb, 2016).

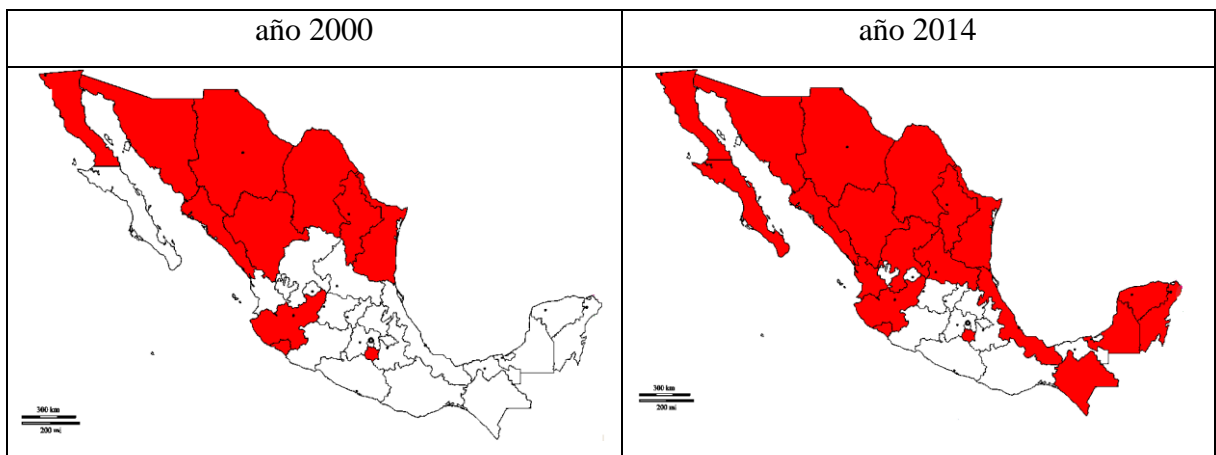


Figura 1 Estados con cultivos genéticamente modificados

Fuente: SENASICAb, 2016.

El área en color rojo representa a los estados donde se han otorgado permisos para siembra de cultivos genéticamente modificados.

Principales construcciones genéticas en plantas

En la producción de cultivos modificados genéticamente se introducen promotores y terminadores de la expresión. Un promotor es una región de ADN que controla la iniciación de la transcripción de una determinada porción del ADN. Por lo tanto, promueve la transcripción de un gen. La región promotora es una secuencia específica de ADN localizada justo donde se encuentra el punto de inicio de la transcripción del ADN y contiene la información necesaria para activar la transcripción del gen que regula (Lewin, 1996).

El promotor más utilizado es el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, éste fue aislado por primera vez en la década de los 80, en la Universidad de Rockefeller. Este promotor es el responsable de la mayor transcripción del genoma del virus de la coliflor. La patente en Estados Unidos y Japón pertenece a la Compañía Monsanto y a la Universidad de Rockefeller, y fue posible debido a que, se realizó la descripción de una secuencia promotora como necesaria para una expresión adecuada de un gen insertado en una planta. Así que, en ese sentido, el concepto de un promotor es de tipo funcional (Lens, 2014).

Por su parte, un terminador es aquel que señala el final de la transcripción, en las células procariotas genera que la ARN polimerasa se desprege del ADN y libere al transcrito, esto es el mARN. (Campell, 2007).

El terminador más utilizado es el terminador 3'Nos (t-nos) que procede del gen de nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*; este contiene la señal de terminación de la transcripción y dirige la poliadenilación (Lens, 2014; Marcia et al., 2010).

El p-35S y el t-nos son secuencias genéticas utilizadas comúnmente en la construcción de eventos transgénicos (plantas OGM), utilizados para iniciar y finalizar la inserción de otras secuencias genéticas que den características de interés, como las que se mencionaron previamente. Sin embargo, el p-35S no es el único promotor que se puede utilizar en la modificación de plantas. Algunos otros son, el de promotor del virus del mosaico de la *Scrophularia* (FMV 35S), de actina de arroz, y de ubiquitina (proveniente del maíz) por

mencionar algunos. De igual manera, también existen otros terminadores como son la secuencia de la subunidad pequeña de *Pisum sativum* (rbcS-E9) y la secuencia de ORF25 proveniente de *Agrobacterium tumefaciens* (ORF25) (Wei et al., 2008a).

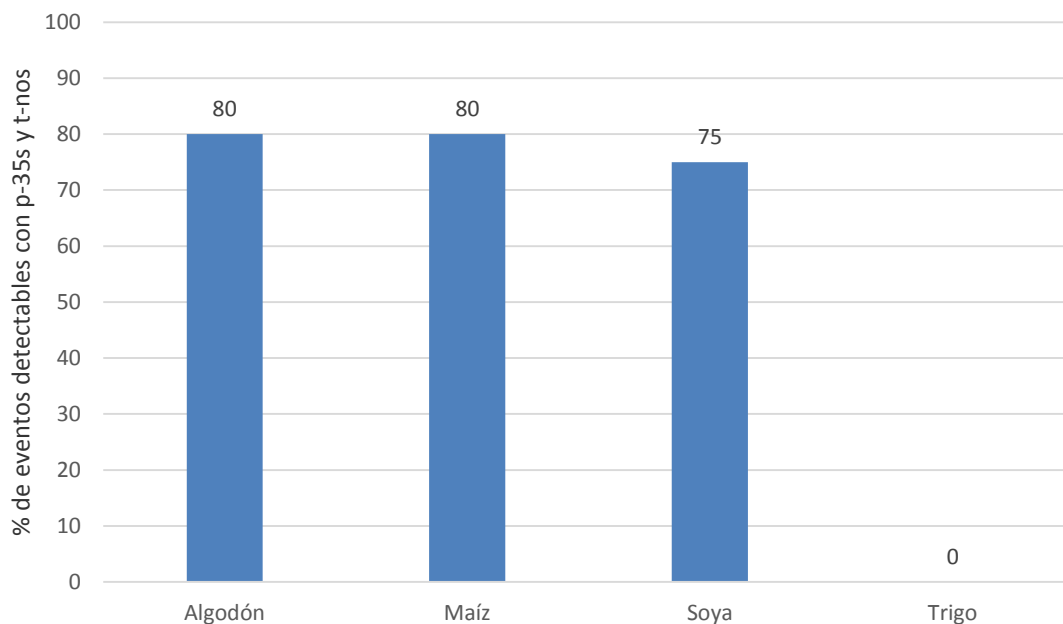
En este trabajo, para decidir el uso del p-35S y t-nos, como secuencias blanco de amplificación, se tomó al revisar la base de datos que el SENASICA publica mensualmente sobre la recepción de solicitudes de liberación de eventos transgénicos. Una vez que se identificaron aquellas que procedieron con autorizaciones, se generó un reporte que contiene los cultivos y eventos autorizados con permiso de liberación, incluyendo qué evento, promotores y terminadores se encuentran en su construcción genética (Tabla 1 Promotores y terminadores en eventos autorizados en México).

Cultivo	promotor 35S Virus del Mosaico de la Coliflor	promotor 35S virus del mosaico de la celidonia menor	promotor actina de arroz	promotor de ubiquitina	t-nos	terminador rbcS-E9	terminador 35S	terminador ORF25
algodón	•	•	•		•	•		
maíz	•	•	•	•	•		•	•
soya	•	•	•		•			
trigo								

Tabla 1 Promotores y terminadores en eventos autorizados en México

Con la prueba de detección de p-35S y t-nos se pueden identificar tres cuartas partes o más del total de los eventos autorizados en México (hasta agosto 2014) para algodón, maíz y soya (Figura 2). No obstante, esta prueba no detectaría en ninguno de los eventos autorizados para el trigo.

Figura 2 Porcentajes de los eventos autorizados en México que se identifican con la prueba de detección de p-35S y t-nos en cultivos de algodón (n=15), maíz (n=25), soya (n=4) y trigo (n=0)



(n=44)

Como se observa en la Figura 2, estas dos secuencias genéticas se encuentran presentes en el 80% de los eventos autorizados para algodón y maíz, y un 75% de los cultivos de soya también las contienen. Por esta razón, se utilizaron estas secuencias como blanco para detectar la presencia de SGM en el polen contenido en las muestras de miel de este estudio.

Cultivos GM en el mundo y en México

Los principales 13 cultivos GM en el mundo se muestran en la siguiente tabla, junto con el árbol GM de mayor cultivo:

Tabla 2 Principales cultivos GM en el mundo

Maíz	Soya	Algodón	Canola
Remolacha azucarera	Alfalfa	Papaya	Calabaza
Álamo (árbol)	Tomate	Pimentón	Papa

forestal)			
Trigo	Arroz		

Fuente (Clive, 2012)

De los cultivos mencionados, en México, el INEGI reportó en el 2009 dentro del listado de los 21 cultivos más importantes sembrados en el territorio nacional, al maíz, el trigo y la soya (INEGI, 2016; SENASICAb, 2016).

Aunado a esto, en México se han otorgado a través del Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria (SENASICA) permisos de liberación para diversos cultivos GM donde de nueva cuenta encontramos los tres granos de interés agrícola en México (Figura 3) (FAO, 2001; SENASICAb, 2016).

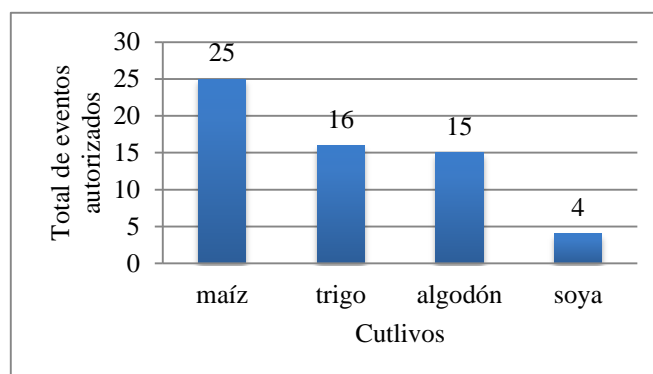


Figura 3. Eventos autorizados para siembra en México N= 60

Fuente: SENASICAb, 2016

El creciente uso de cultivos GM en el mundo, incluyendo algunos países europeos, provocó la presencia de polen de plantas genéticamente modificadas en la miel (Europea, 2011a). Lo anterior, es posible debido a que el polen es recolectado por las abejas pecoreadoras en forma de pequeñas esferas que colocan en la cestilla de sus patas, para transportarlo a la colmena y depositarlo en el fondo de las celdas de la cámara de cría, reservándolo como

fuente de alimento junto con miel operculada (pan de abeja, alimento de las abejas obreras y zánganos) (Agricultura, 2005).

La apicultura en México tiene un lugar importante en la producción mundial, por eso, el país se ha dividido en regiones apícolas acorde con el volumen de producción de miel que se genera en cada una, así como las características que tienen en aspectos apibotánicos y tecnología utilizada para dicha actividad económica (Figura 4).



Figura 4. Regiones apícolas de México.

Fuente: (CGG-SAGARPA, 2000)

Región norte, apicultura con alto grado de tecnificación, principalmente produce miel de floraciones de mezquite, y la que se obtiene del servicio de polinización a cultivos de manzana.

Región centro o altiplano, uso de tecnificación, la principal miel producida es la de tonalidades ámbar claro, en esta región también se utiliza mucho el servicio de polinización para los cultivos de cucurbitáceas, aguacate y moras.

Región golfo, la principal fuente de floración para la producción de miel es de los árboles de cítricos.

Región costa del pacífico, se identifica por producir mieles de origen multifloral y de mangle. En ésta región se utiliza a gran escala la práctica de la polinización, para los cultivos de cucurbitácea, aguacate y moras.

Región península de Yucatán, la región con mayor producción de miel en el territorio nacional, tiene floraciones específicas que no se dan en otras regiones del país, esto es debido a su geografía y condiciones climatológicas, como son la flor del árbol de Dzildzilché y la flor de tajonal, de las cuales se obtienen mieles con sabores suaves y característicos, el principal destino de ésta producción de la península es la UE.

Las regiones costa del pacífico y la península de Yucatán, tienen importancia por el alto nivel de producción. Al extenderse los permisos de cultivos GM en todo el país, es más fácil que su miel pueda llegar a contener granos de polen de cultivos GM, por lo que aumenta la probabilidad de identificar SGM en la miel que se comercializa. Esto no sólo por los cultivos que se generan en cada estado, sino por la movilización de colmenas, la cual se realiza con dos objetivos primordiales, aprovechar las floraciones de otros lugares y la polinización de cultivos (INFOASERCA, 2010).

La movilización de colmenas puede realizarse de manera interestatal desplazando las colmenas a dos o más estados a lo largo del año, o interestatal cuando son trasladadas a otros municipios del mismo estado (INFOASERCA, 2010).

En el caso de la movilización para aprovechamiento de floraciones, esto es porque dicho evento botánico se presenta en distintas épocas del año en las diferentes regiones; y al realizar el movimiento de las colmenas se hace más rentable la actividad apícola, al evitar la alimentación artificial de las abejas y se obtiene más miel por colmena. En nuestro País 8 de cada 10 colmenas que se movilizan en el 78 por ciento del territorio nacional, es para aprovechar las floraciones para producción de miel. Los estados que movilizan el mayor número de colmenas para esta actividad son Veracruz, Puebla, Jalisco, Tlaxcala, Oaxaca, San Luis Potosí, Morelos, Colima y Zacatecas (Figura 5) (INFOASERCA, 2010).

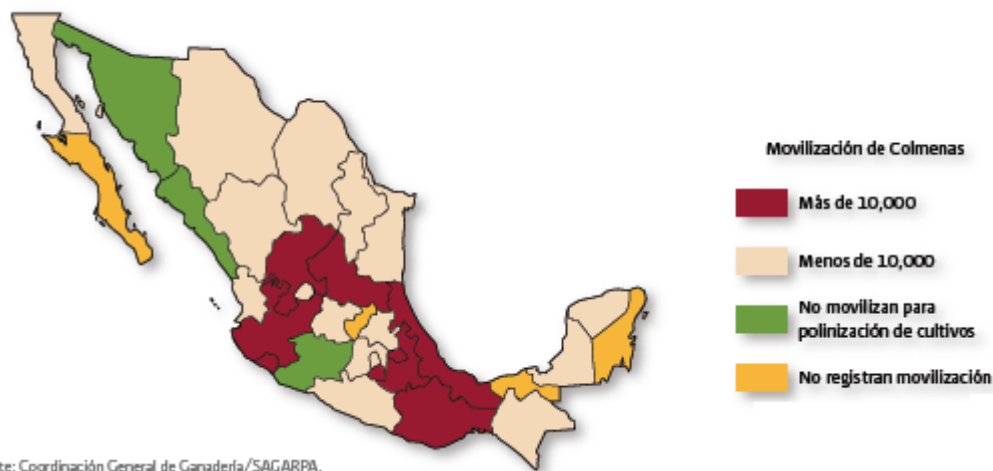


Figura 5. Movilización Nacional de Colmenas 2009

En lo referente a la movilización de colmenas para polinización de cultivos, el impacto económico de este servicio, durante el 2009 representó un ingreso de 61 millones de pesos para los apicultores (CGG, 2000; INFOASERCA, 2010).

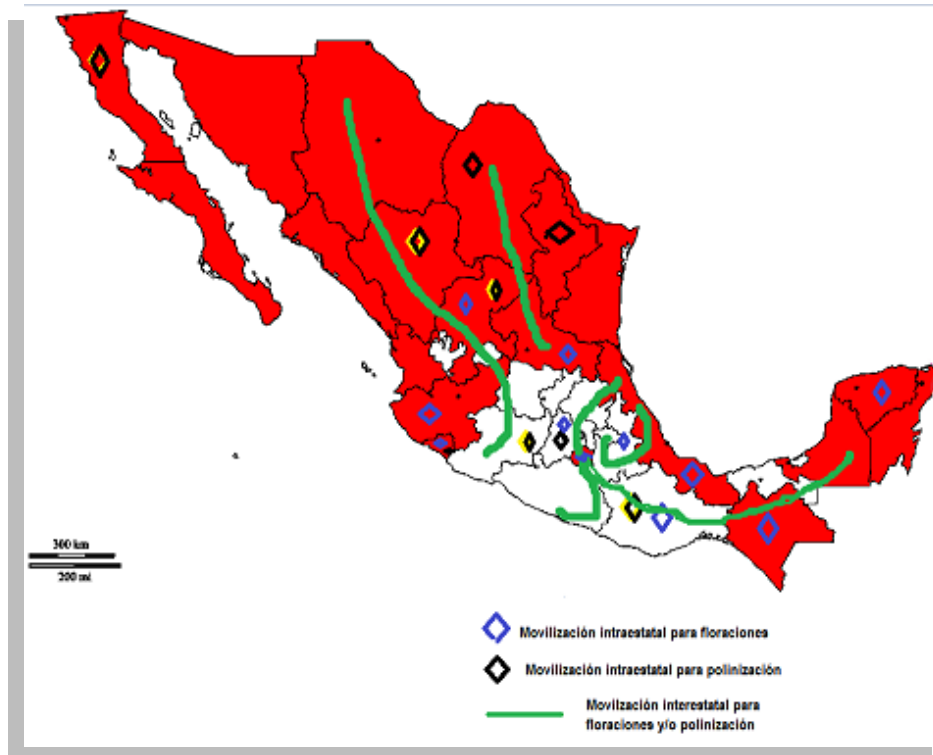


Figura 6. Ejemplos de rutas de movilización de colmenas y estados con eventos autorizados.

Fuente: Coordinación General de Ganadería-SAGARPA

Como se observa en la Figura 6, es posible identificar en la miel polen de cultivos (modificados o no) en estados donde no son cultivados, debido a que las abejas pueden movilizar el polen en su cuerpo, en las reservas de alimento o en la misma colmena.

MARCO LEGAL EN MATERIA DE OGM

En el ámbito internacional, durante la Conferencia de las Naciones Unidas sobre medio ambiente y desarrollo (Río de Janeiro, Brasil 1992) se aprobó el Convenio sobre Diversidad Biológica (CDB), los cuales tratan el tema de la bioseguridad y la biotecnología, de ahí se desprendió la necesidad de generar un protocolo para el uso seguro de los OGM (ONU, 2000).

Lo anterior, llevó a la creación del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica, el cual es un instrumento internacional que tiene como objetivo garantizar un nivel adecuado de protección en la transferencia, manipulación y utilización seguras de los OVM resultantes de la biotecnología moderna que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica. Tiene también en cuenta los riesgos para la salud humana, y se centra concretamente en los movimientos transfronterizos. México firmó el Protocolo el 24 de mayo del 2000 y lo ratificó el 27 de agosto de 2002. A partir de esta adición se crea la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM) (ONU, 2000; CONABIO, 2008.).

En México

La Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM) es un órgano del Poder Ejecutivo Federal que al más alto nivel se encarga de establecer las políticas relativas a la biotecnología, en lo que respecta al uso seguro de los organismos genéticamente modificados. Está integrada por los titulares de las Secretarías de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Salud

(SS), Educación Pública (SEP), Hacienda y Crédito Público (SHCP) y Economía (SE), así como por el Director General del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Algunas de las atribuciones de la CIBIOGEM son las siguientes (CIBIOGEM, 2013):

- ✓ Formular y coordinar las políticas nacionales de bioseguridad de OGM, así como proponer a las dependencias competentes la incorporación de dichas políticas en los programas sectoriales
- ✓ Promover y propiciar la colaboración de manera coordinada de sus integrantes, para el cumplimiento de la Ley y de los objetivos de la CIBIOGEM y el fortalecimiento de la capacidad de las instituciones cuyas actividades se relacionen con los OGM, para el cumplimiento de los objetivos de la Ley y de las demás disposiciones aplicables
- ✓ Promover en el ámbito internacional bilateral, regional y multilateral, el intercambio de información en materia de OGM
- ✓ Desarrollar, a través de la Secretaría Ejecutiva, el Sistema Nacional de Información sobre Bioseguridad y propiciar la colaboración de las dependencias y entidades de la Administración Pública Federal en materia de OGM para el eficaz funcionamiento del Sistema
- ✓ Promover, con la participación que corresponda a la CONABIO, el establecimiento de un banco de datos sobre la presencia y distribución de especies silvestres relacionadas con los OGM que se pudieran liberar, así como mecanismos de monitoreo y evaluación del impacto al ambiente, a la salud humana y animal, derivados de la liberación, producción y consumo de OGM y productos que los contengan
- ✓ Dictaminar, con la participación que corresponda al Consejo Consultivo Científico, sobre el establecimiento de zonas libres de OGM para los efectos que establece la Ley, debiendo contener la opinión que emita la CONABIO
- ✓ Notificar, por conducto de la Secretaría Ejecutiva, las solicitudes de permisos de liberación al ambiente de OGM a los gobiernos de las entidades federativas en las

que se pretenda llevar a cabo dicha actividad, a fin de que puedan emitir sus opiniones en los términos de Ley

Las actividades antes descritas, y las específicas para cada dependencia se encuentran en la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados y su Reglamento. A su vez, también se creó la Red Maíz, que está orientada a la conservación, aprovechamiento y manejo sustentable de las 52 razas de maíz originarias de México (DOF, 2006a; CIBIOGEM, 2013).

México, con la finalidad de dar cumplimiento al Protocolo de Cartagena, estableció a tres dependencias nacionales, como las competentes para dirigir de las actividades en la materia.

- 1) SEMARNAT: evaluar y emitir autorización para los OGM destinados a su introducción intencional en el medio ambiente. Con aquellos de uso agrícola, se hará de manera coordinada con SAGARPA.
- 2) SS: evaluar y autorizar los OGM destinados a uso directo como alimento humano o para procesamiento.
- 3) SAGARPA: a través del SENASICA evalúa y autoriza los OGM destinados a uso directo como alimento animal y los de uso agrícola. Cuando estos se destinen a su introducción intencional en el medio ambiente, lo hará de manera coordinada con SEMARNAT (CONABIO, 2008; CIBIOGEM, 2013).

En Comunidad Europea

En la Comunidad Europea (CE), existen dos reglamentos que regulan los alimentos y piensos GM, estas regulaciones están encaminadas a proteger la salud humana y sanidad animal, a través del aseguramiento de piensos y alimentos GM antes de que sean vendidos en la Comunidad. Asegurar que se realicen procedimientos comunes de evaluación de riesgo para la autorización con procedimientos eficientes y transparentes; asegurar un etiquetado claro que responde a las preocupaciones de los consumidores (incluidos los

agricultores que compran piensos) y les permita así, tomar decisiones informadas (Europea, 2003b; Europea, 2003a).

En comparación con otros países, son muy pocos los OGM aprobados en la CE para ser utilizados en la alimentación humana y/o animal (Figura 7) (Europea, 2014).

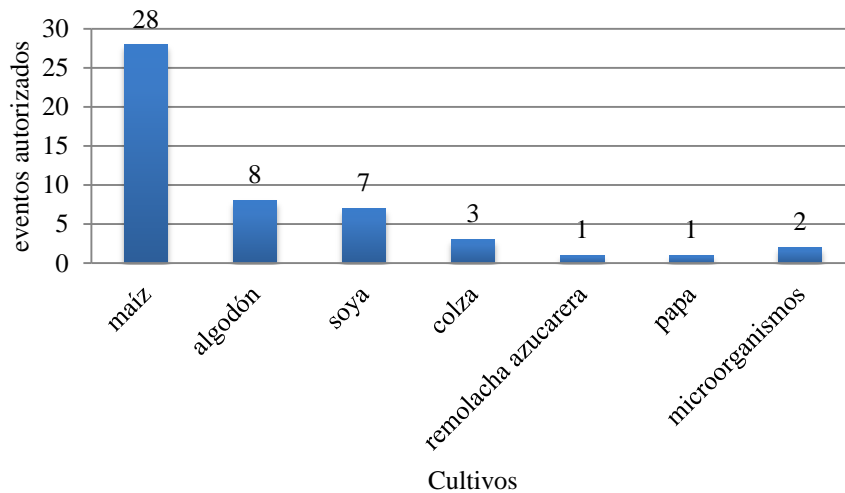


Figura 7. Eventos autorizados en la Comunidad Europea

N= 50

Fuente: Comisión Europea, 2014

EL SECTOR APÍCOLA MEXICANO Y LOS OGM

Producción nacional y exportación de la miel mexicana

México es el sexto productor y quinto exportador de miel a nivel mundial respectivamente. Durante el año 2010 se produjeron 55,684 toneladas, lo que representa el 3.29 por ciento de la producción mundial. Sin embargo, el consumo *per capita* de miel en el país es muy bajo (360 g), si se compara con el consumo en Alemania (1500g), dicho país ostenta, el primer lugar de consumo *per cápita*. En México alrededor del 34 por ciento de la

producción nacional se exporta, los principales mercados son la Comunidad Europea (CE) y Estados Unidos (INFOASERCA, 2010; FAO STAT, 2015).

El principal destino de la miel mexicana es la CE, debido a que su población tiene un consumo *per capita* elevado en algunos países, por ejemplo el alemán y el griego es un 300 por ciento mayor que el mexicano (INFOASERCA, 2010).

En México, para lograr la exportación a la CE, entre otros requisitos, se debe cumplir con la homologación en cuestión de inocuidad agroalimentaria, por esta razón es que la cadena (apicultor, acopiador, envasador y/o exportador) deben encontrarse reconocidos en buenas prácticas de producción de miel (en el caso de los apicultores) y en sistemas de reducción de riesgos de contaminación (envasador y/o exportador), reconocimientos que otorgan respectivamente, la Coordinación General de Ganadería-SAGARPA y el SENASICA (SAGARPA, 2009a; SAGARPA, 2009b).

Y en el tema de la producción de miel orgánica, ésta es un producto que ingresa en la Ley de Productos Orgánicos y se describe en la generalidad como “...producto orgánico, es el que está producido dentro de un sistema con un uso regulado de insumos externos, restringiendo y en su caso prohibiendo la utilización de productos de síntesis química...”. Esta miel, tiene un excelente mercado, principalmente en Alemania (DOF, 2006b).

México ha logrado un incremento anual en la producción de miel orgánica de manera progresiva, esto debido a que los apicultores convencionales que quieren hacer la transición de miel convencional a miel orgánica, se someten a un proceso que se lleva a cabo en un periodo de hasta dos años. El cual es supervisado por un organismo de certificación especializado nacional o internacional (SAGARPA, 2011).

Los requisitos que se deben cumplir para ser apicultor orgánico, son implantar actividades diferenciadas del manejo convencional, los materiales que se utilizan y la cantidad de mano de obra que demanda. Además el cumplimiento de lineamientos, a los cuales se deben apegar estrictamente. Destacan entre estos últimos los siguientes:

- No ubicar colmenas en cultivos donde se aplican agroquímicos y pesticidas. En por lo menos en un radio de tres kilómetros
- No utilizar medicamentos de síntesis química
- La alimentación que se proporcione a las abejas a base de azúcar, fructosa y/o soya que debe provenir de proveedores también certificados en producción orgánica
- La cera para los bastidores será producida en el mismo apiario. Si hubiera necesidad de comprarla se debe asegurar que no esté contaminada con residuos químicos o tóxicos y que tenga su origen en colonias sanas y con certificación orgánica
- El material de combustión de los ahumadores debe ser de origen natural, sin ningún aditivo
- Las herramientas para revisión como son cuña y ahumador deben de ser de acero inoxidable
- El material de madera para las colmenas puede ser tratado con cera y aceite de linaza; nunca pintados (SAGARPA, 2013).

Como se observó en los párrafos anteriores, las regulaciones para satisfacer las necesidades del mercado van en aumento. Y es importante mantener los canales de comercialización existentes para la miel mexicana (convencional y orgánica) que encuentra en la Comunidad Europea su principal destino, lugar donde ha logrado posicionarse al cumplir con las exigencias de inocuidad, calidad y comercio que solicitan los consumidores europeos.

En lo referente a la miel orgánica, México es el tercer exportador en el mundo de este producto, durante el 2009, la producción de miel orgánica fue de 1,300 toneladas, logrando en ese mismo año una exportación de más del 40% de la producción anual. Para los apicultores, la producción orgánica es rentable, pues el precio de la miel orgánica supera en un 30% el precio de la convencional. Los estados con mayor producción de miel orgánica son ocho, en los cuales Oaxaca encabeza el listado, esto pueden observarse en la Figura 8 (SAGARPA, 2013).



Figura 8. Principales estados productores de miel orgánica. Fuente: SAGARPA, 2013

Dichos estados, durante el 2009 exportaron 500 toneladas de miel orgánica, lo cual representó un ingreso de 1 millón 800 mil dólares (SAGARPA,2013).

Acorde con el programa de registro voluntario al sistema de trazabilidad de la miel, que pertenece al SENASICA, dentro del territorio nacional, existen 78,000 apicultores aproximadamente, y en el estado de Oaxaca se localizan más del 4% de éstos productores, los cuales encuentran mercado de venta de su producción en la CE, además cabe señalar que dicho estado posee una gran biodiversidad y ha sido identificado como un importante centro de origen y domesticación del maíz por lo que está protegido por los acuerdos emitidos por CIBIOGEM que se mencionaron anteriormente (Comisión para la Cooperación Ambiental, 2004; Kato et al., 2009; Cuevas, 2006).

El creciente territorio autorizado para cultivos GM en México, el movimiento de colmenas para producción de miel, y la movilización de éstas para servicio de polinización a través del territorio nacional, pone en jaque la comercialización de la miel mexicana.

Problemática de regulación europea y comercialización de miel mexicana

Debido a que el maíz es un cultivo básico de México, la posibilidad de que se halle en la miel polen de maíz es muy alta, como lo han demostrado estudios recientes (Gálvez et al., 2013). Y con la creciente autorización de permisos de liberación de cultivos GM de maíz, eleva la posibilidad de encontrar polen GM en la miel; esto acarrearía un grave problema, para la producción orgánica de miel y su potencial comercialización a la CE, pues la mera

presencia de SGM inhabilita su estatus de producción orgánica. Por otro lado, en Europa se han autorizado muy pocos eventos de transformación de maíz, comparados con los que se han autorizado ya para siembra en México. Así que se eleva fuertemente la posibilidad de la prohibición de la comercialización de la miel convencional, debido a la presencia de polen GM de eventos no autorizados.

El reto para la apicultura orgánica, es que en los ocho estados con mayor producción de miel orgánica, sólo Jalisco y Oaxaca, son los que al momento no tienen autorización para cultivos GM en su territorio (figura 3 y 8).

La comercialización de miel hoy en día, como se ha observado a través de párrafos anteriores ha dejado de basarse solamente en estándares de calidad e inocuidad, ahora deberá garantizarse que este producto, se encuentre libre de secuencias genéticas provenientes de cultivos modificados.

DETECCIÓN DE SGM EN ADN DE POLEN CONTENIDO EN MIEL

La CE, posee un Centro Común de Investigación (llamado en inglés Joint Research Centre, conocido con las siglas JRC) el cual proporciona apoyo científico-técnico orientado al cliente para la concepción, el desarrollo, la aplicación y la supervisión de políticas comunitarias. El JRC constituye un centro de referencia para cuestiones de ciencia y tecnología que atiende los intereses de los estados miembros. Y en el tema de detección análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos ha dedicado recursos para establecer y publicar, las metodologías de la extracción y purificación de ADN, la electroforesis en gel de agarosa, y la determinación de las SGM por medio de la prueba reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, así como publicación de las secuencias genéticas para la detección de eventos específicos acorde con la técnica de PCR tiempo real a utilizarse (normal, dúplex o multiplex) (Commission, 2012; JRC, 2007-a; Centre, 2010; JRC, 2010-b; Europea, 2011b).

Métodos de detección de SGM de polen en miel

Para realizar la detección de las SGM contenidas en el polen de la miel a través de la técnica de PCR tiempo real, es necesario obtener el ADN de dicho polen.

Para ello, primero debe realizarse la extracción del polen de la matriz que lo contiene, en este caso la miel y, una vez obtenido, se deberá iniciar el proceso para la obtención del ADN vegetal.

Extracción y purificación del ADN del polen

El método recomendado para la obtención de ADN vegetal, es el protocolo del método del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB), de igual manera en el kit comercial que se eligió se utiliza proteínasa K y un paso de disrupción para liberar el material genético de la célula. Para la purificación del ADN obtenido se utilizaron dos métodos. El primero, el de precipitación con cloroformo con objeto de eliminar las proteínas y finalmente, el de afinidad a través de columnas (JRC, 2007-a; QIagen, 2010).

Este protocolo ha sido probado con éxito, para la extracción de ADN de polen proveniente de la miel, por estudios de Waiblinger *et al* 2012 y Gálvez *et al* 2013, y también descrito en la metodología publicada por el JRC, como guía de la Unión Europea para la extracción y purificación de ADN de alimentos (JRC, 2007-a).

Detección de SGM del ADN obtenido del polen

Investigaciones recientes, indican que la detección de las SGM del ADN del polen puede realizarse mediante melisopalinología, PCR, PCR tiempo real, PCR digital y amplificación isotérmica. Sin embargo, el método más reportado es el PCR tiempo real (Waiblinger *et al.*, 2012; FOCPFSG, 2011; Randhawa *et al.*, 2013).

La PCR es un método utilizado para amplificar regiones génicas específicas. La PCR tiempo real utiliza los mismos componentes que una PCR convencional, solo que adiciona fluorocromos los cuales emiten una fluorescencia antes de la amplificación. Y así, la acumulación del producto de PCR se monitorea mientras se lleva a cabo la amplificación, se analiza ciclo a ciclo los cambios de la señal fluorescente generada durante las tres etapas

del PCR y entre mayor sea la cantidad de ADN de la muestra, menos serán los ciclos necesarios para obtener una señal fluorescente detectable.

Las ventajas que tiene es que tiene parámetros básicos:

Específico: La especificidad está dada por los primers y sonda TaqMan, que reconocen un sitio específico de secuencia

Exacto: Veracidad del valor medido en una muestra

Preciso: Presenta poca dispersión en los datos obtenidos, es decir, es reproducible.

Amplio rango dinámico: Ventana de concentraciones en la que el blanco puede ser medido con exactitud y precisión

Sensible: bajas cantidades de ADN pueden ser detectadas por PCR en tiempo real. La señal fluorescente obtenida es significativamente mayor al ruido de fondo.

Es un poco menos sensible que el PCR digital, donde es posible detectar la presencia de al menos 1 SGM, pero la ventaja del PCR tiempo real, es que el equipo e insumos son de menor precio.

Disposición de recursos técnicos y problemática para la detección en México

En México, como lo marca la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, se deben llevar actividades de monitoreo, inspección y vigilancia en el territorio nacional, que son realizados los laboratorios de las Autoridades Competentes (SEMARNAT, SALUD y SAGARPA).

Junto con el aumento de las áreas de cultivo OGM, también ha crecido la demanda de sus servicios, es por eso que la CIBIOGEM, durante el 2008, instruyó la conformación de la Red Nacional de Laboratorios de Detección Identificación y Cuantificación de Organismos Genéticamente Modificados. Esta se encuentra integrada de laboratorios que poseen los recursos humanos y técnicos para la detección de OGM. La Red está conformada por un nodo central integrado por el Laboratorio de Biometrología de la División de Materiales Orgánicos (CENAM), el Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental (CENICA), el Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente

Modificados (CNRDOGM), y el Centro de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAyAC). Los laboratorios integrados a la red son el de Biotecnología (Facultad de Química-UNAM), de biología molecular y cultivo de tejidos vegetales (Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima), el # 4 del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Nuevo León (IBT-UANL), de cultivo de tejidos e ingeniería genética, unida de biotecnología del campo experimental bajo (INIFAP), de diagnóstico molecular (DGCORENA-SMA-GDF), del grupo de estudios moleculares aplicados a la biología (GEMBIO-CICY), de biotecnología agrícola del departamento de biotecnología (CINVESTAV - ZAC), de genética molecular del desarrollo sexual y asexual (CINVESTAV-IRA), el centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco (CIATEJ), y el de interacción molecular planta-microorganismo (CBG-IPN).

De todos los laboratorios de la Red, durante el 2014, solamente el de Biotecnología de la FQ-UNAM era el único que al momento tenía montada la técnica para detección de SGM contenidas en el polen de la miel por PCR tiempo real, y ofertaba el servicio con fines de investigación.

En el sector de la administración pública, el SENASICA posee el Laboratorio de Organismos Genéticamente Modificados, lugar donde a partir del año 2014 se ofrecen al público tres servicios de detección de OGM en granos, plantas y miel. Para este último producto, los servicios que oferta son detección de secuencias genéticamente modificadas con la técnica de PCR en tres modalidades.

- Detección de SGM de p-35S t-nos (cualitativo)
- Detección de SGM evento específico (cualitativo)
- Detección de SGM evento específico (cuantitativo)

El servicio es para el público en general, con un costo por muestra dos veces menor, respecto al costo por el mismo análisis en un laboratorio europeo.

Estudios mexicanos sobre OGM en miel

En México, en años recientes se han realizado investigaciones por Narváez, 2013; Gálvez et al, 2014; Villanueva et al, 2014, para detectar SGM en mieles procedentes de algunos estados del País, como son Campeche, Yucatán y Quintana Roo, donde se han utilizado la técnica de melisopalinología, PCR convencional y PCR tiempo real.

En la actualidad, algunos productores y todos los exportadores de miel, la analizan para detectar la presencia de OGM antes de enviar un embarque a la CE, en caso de presentarse resultados positivos la miel no es exportada a este destino, pues su comercialización en Europa es prácticamente imposible, debido a que los consumidores tienden a rechazarla, y en el caso del mercado orgánico, es imposible comercializarla, pues su mera presencia está prohibida.

El hecho de que no existía un servicio al público para estas detecciones previo al 2014, encarecía el costo de comercialización de la miel mexicana, pues se debía realizar los pagos de paquetería de las muestras a algún país europeo (cada muestra de 250g por productor que esté en el lote), el de realización de los análisis de laboratorio, lo cual detenía el proceso de compra-venta del producto, hasta esperar los resultados, para realizar la liberación del lote por parte de SENASICA para la exportación. Sin embargo, a pesar de que ya se tiene el servicio en México, algunos compradores aún solicitan que los estudios de detección de SGM se realicen en laboratorios europeos. Lo anterior, coloca en una situación de desventaja a México, poniendo así en peligro el mercado de la miel mexicana, lo cual implicaría la pérdida de divisas por este concepto.

Con la finalidad de dar cumplimiento a una regulación y con la finalidad de no perder un mercado de comercio para la miel mexicana que no se consume en el país y que genera una importante entrada de divisas, es necesario, conocer y detectar SGM en el ADN contenido en el polen de la miel.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la ocurrencia de incidentes comerciales derivados de la presunta presencia de OGM en miel de la costa de Oaxaca, es imperativo para los productores de la región no sólo conocer el estatus de liberación de OGM en la zona, sino también es importante realizar un diagnóstico que permita estimar la presencia de secuencias GM en el polen del producto destinado a la exportación. Esta información es de vital importancia para los apicultores afectados, pues servirá como fundamento científico para determinar la existencia de polen proveniente de OGM en la miel que producen y, en consecuencia, sobre las implicaciones económicas y comerciales que de ello se derivan.

OBJETIVOS

- Determinar presencia de las secuencias genéticas p-35S y t-nos utilizadas en cultivos transgénicos en muestras de miel producida en la costa de Oaxaca.

HIPÓTESIS

La media de la presencia de las SGM p-35S y t-nos en el polen contenido en la miel de la costa oaxaqueña es igual a cero, debido a que no existen permisos de liberación de cultivos GM en el estado de Oaxaca.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño de plan de muestreo

Muestreo

Se realizó una primer visita a Oaxaca, en la cual se solicitaron los datos de todos los apicultores activos que entregan miel a la planta, clasificándose en municipios y localidades, a partir de estos datos se obtuvo el marco muestral (apiarios y municipios

presentes), para determinar el tamaño de la muestra. Se utilizó la fórmula estadística de tamaño de muestra para una proporción de una población, cuando se conoce el número de elementos en esa población (Ducoing, 2009):

$$n = Z^2 \cdot q \cdot p \cdot N / (N \cdot e^2) + (Z^2 \cdot q \cdot p); \text{ donde:}$$

n = tamaño de la muestra

Z α = 1.96 (asumiendo 95% de confianza)

p = proporción aproximada de la población que presenta la característica estudiada. Como no se dispone de información previa se utilizará 0.5

$$q = 1 - p = 0.5$$

N = Tamaño de la población = Número de apiarios

e = margen de error, fijado en 12%

Se trabajó con los datos proporcionados por los productores, los cuales tenían un total de 911 apiarios, ubicados en 18 municipios de la costa de Oaxaca (Figura 7).

Con los datos anteriores, se realizó el cálculo estadístico para obtención de tamaño de muestra, los valores resultantes, se observan en el Tabla 3 Tamaño de muestra.

Tabla 3 .Tamaño de muestra	
valor	
0.12	E, margen de error
0.5	Proporción estimada de la población al no existir datos previos
95%	Nivel de confianza
1.960	Z
66.692	Tamaño de muestra
67	Tamaño de muestra redondeado

Megastat 2007

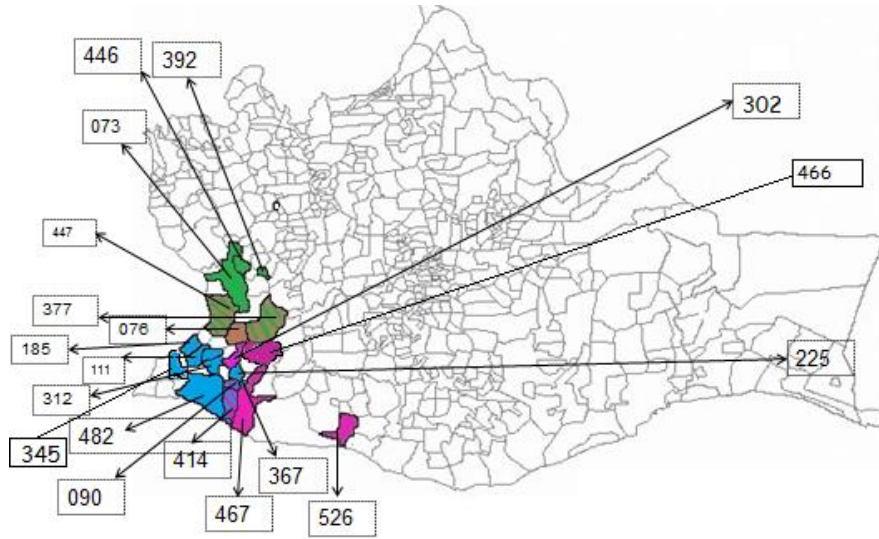


Figura 9. Municipios de Oaxaca en el estudio

Las 67 muestras del estudio, fueron recolectadas en la primavera de 2013, y los municipios a los que pertenecen, se enlistan en la Tabla 4 Municipios y número de apiarios en el estudio.

Tabla 4. Municipios y números de apiario en el estudio	
MUNICIPIO (Número INEGI)	Número de apiarios
Pinotepa De Don Luis (70)	1
San Antonio Tepetlapa (111)	1
San Miguel Tlacamama (285)	3
Santa María Zacatepec (447)	1
Santiago Jamiltepec (467)	2
Santos Reyes Nopala (526)	1
Tututepec (334)	2
Santiago Ixtayutla (466)	2
La Reforma (76)	3
San Lorenzo (225)	4
San Pedro Jicayán (312)	3
Santa María Huazolotitlán (414)	3
Santa María Yucuhiti (446)	3
Santiago Pinotepa Nacional	7
San Juan Cacahuatepec (185)	6
San Andrés Huaxpaltepec (90)	7
Putla (73)	9
Santa Cruz Itundujia (377)	9
	67

Toma de muestras

De cada apiario que se eligió, se identificó el nombre del dueño y en planta se buscó el tambo correspondiente al mismo. Se tomó una muestra de 500 g por triplicado directamente de tambo, utilizando una barra muestreadora de acero inoxidable de 30 cm de largo. Las muestras fueron resguardadas de la siguiente manera, un tanto por la empresa, otro tanto fue el que se procesó en laboratorio, y el tercer tanto quedó disponible como testigo. Una vez que la muestra correspondiente llegó a laboratorio, fue necesario dividirla en 4 tantos de 125 g, esto con la finalidad de resguardarla y evitar alguna contaminación durante el proceso.

Análisis de las muestras en laboratorio

Se realizó en laboratorio la extracción del ADN del polen contenido en la miel, para este proceso se utilizó el DNeasy Mericon Food Kit de la marca Qiagen, acorde con el protocolo del método del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) referido por la Unión Europea para la extracción y purificación de ADN. A este protocolo se le realizaron modificaciones, como agregar un paso de disrupción mecánica con balines de tungsteno, así como unos pasos previos para la extracción del polen, los cuales se describen en la figura 10 (JRC, 2007.-a; FOCPFSG, 2011; Qiagen, 2010).

Una vez que se realizó la extracción del polen contenido en la miel, se pesaron los pellets obtenidos (Tabla 5. Media de la extracción de polen en pellet), posteriormente, se realizó la extracción de ADN descrita previamente. El siguiente paso fue cuantificar por duplicado cada muestra obtenida de ADN utilizando un sistema Espectrofotométrico con micro-volumenes. Con estos datos se evaluó la pureza (índice de refracción) y concentración del ADN obtenido (Tabla 5 Media de la concentración de ADN de polen contenido en miel ng/ul), a continuación se realizó el ajuste a la concentración deseada (20ng/ul) para la prueba de PCR tiempo real.

	Peso
Media de peso polen húmedo	518 mg
Desviación estándar de peso polen húmedo	203 mg

Megastat 2007

	Concentración ng/ul	Relación 260/280
Media	44.35	1.9
Desviación estándar	25.27	0.2

Megastat 2007

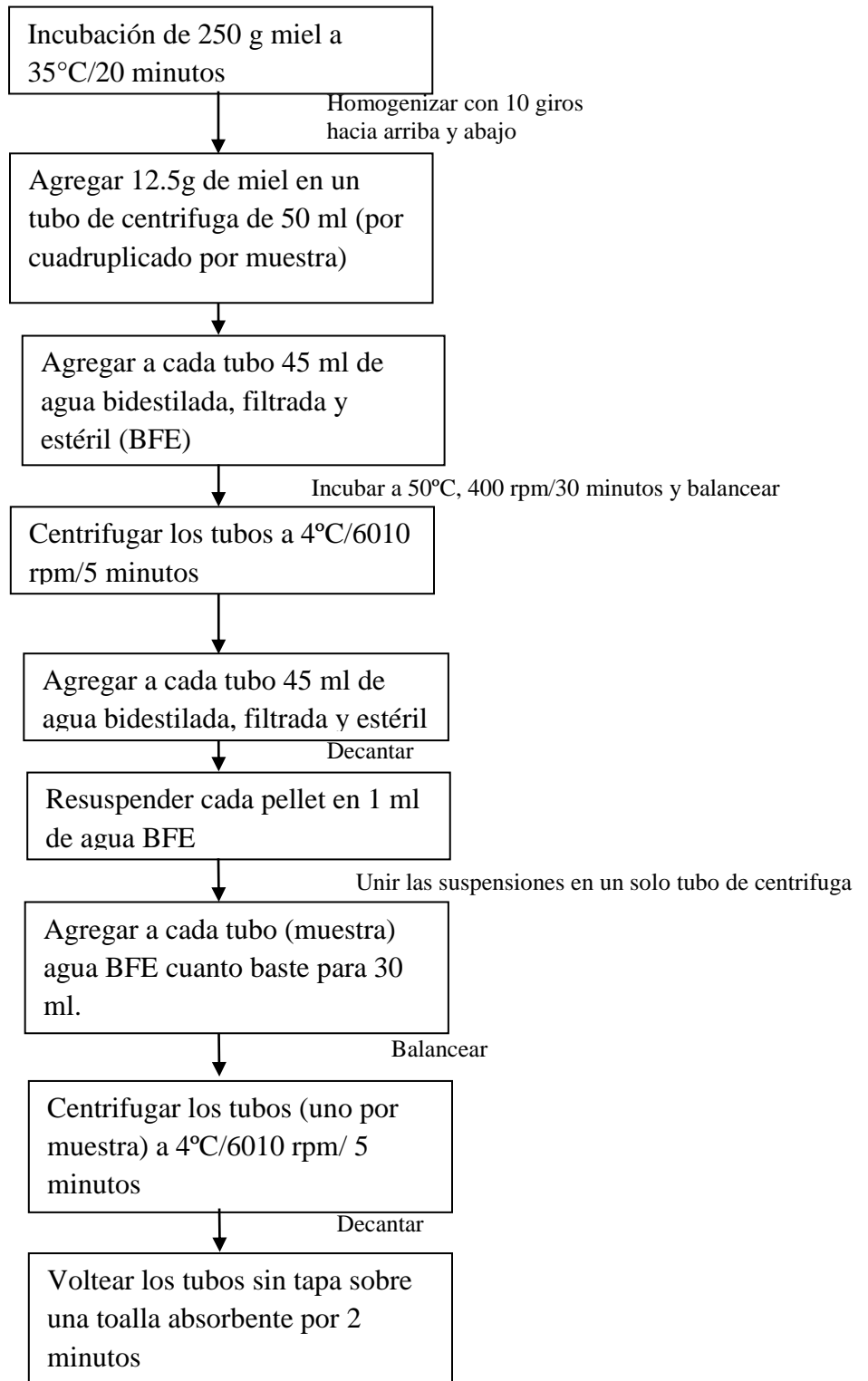


Figura 10. Proceso para extracción de polen de 50 g de miel

La evaluación de la absorbancia de luz ultravioleta, es un control de calidad que se realiza sabiendo que los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta (UV) debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas de ADN, es posible determinar la concentración (IBT, 2015) .

El cálculo de la relación A_{260} / A_{280} es una manera común para expresar la pureza del DNA. Los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción a una longitud de onda de 260nm. A esta longitud por lo tanto, la absorción es proporcional a la concentración. Dependiendo de la composición nucleica, una muestra pura arroja valores que van del 1.65 al 2 (IBT, 2015.; JRC, 2007-a). En este caso, con los valores obtenidos se descarta la contaminación con proteínas, las cuales tienen un máximo de absorción a A_{280} (principalmente por residuos de triptófano), cuando existe proteína en la muestra obtenida, los resultados que se obtienen de la relación 260/280, son mayores a 2, y valores menores a 1.8 indican presencia de carbohidratos, fenoles o degradación de la muestra (IBT, 2015; JRC, 2007-a).

Es este trabajo se realizó una extracción de ADN de polen, por cada muestra de miel obtenida. Dicho ADN fue analizado por duplicado con la técnica de PCR tiempo real.

Para la prueba de PCR tiempo real, se utilizaron sonda y cebadores forward (F) y reverse (R) de actina, que es una proteína conservada en plantas, la cual permitió identificar que las muestras tenían tejido vegetal, para la detección de las modificaciones de interés, se utilizaron los kit denominados, TaqMan soy 35S y TaqMan maize 35S (Thermo Fisher Scientific Inc), siguiendo para su realización el protocolo descrito en la guía de usuario TaqMan Genetically Modified Organism (GMO) Detection Kits, así como las sondas y cebadores para t-nos diseñadas por la misma empresa, utilizando en el termociclado las constantes descritas en el Tabla 7. Constantes para PCR tiempo real (AppliedBiosystems, 2010).

Tabla 7. Constantes para PCR tiempo real			
Etapa	Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
Activación	1	50.0 °C	02:00
Inicio de desnaturalización	1	95.0 °C	10:00
Desnaturalización	45	95.0 °C	00:15
Alineación y extensión	45	60.0 °C	01:00

Para la PCR tiempo real del p-35S, se utilizan los kits de identificación de Taqman Genetically Modified Organism (GMO) Detection Kit (maize y soy 35S) de Thermo Fisher Scientific Inc, utilizando un ciclador ABI7500, con el volumen de 25 ul por reacción, los cuales corresponden a:

Coctel Mastermix	22 ul
Amplitaq	0.5 ul
ADN	2.5 ul (con 50 ng de ADN)

Para la prueba de detección de t-nos y actina de planta, se utilizaron sondas a diseño realizadas por la empresa Applied Biosystems, las secuencias se describen a continuación.

Tabla 8. Secuencias de primers y sonda t-nos y actina	
Nombre	Secuencia
t-nos Cebador R	5'TTG TTT TCT ATC GCG TAT TAA ATG T-3'

t-nos Cebador F	5'CAT GTA ATG CAT GAC GTT ATT TAT G-3'
t-nos Sonda	5' VIC ATG GGT TTT TAT GAT TAG AGT CCC GCA A-TAMRA 3'
Actina de planta Cebador R	5'CAC ATC TGT TGG AAA GTG CTG AG 3'
Actina de planta Cebador F	5'CAA GCA GCA TGA AGA TCA AGG T 3'
Actina de planta Sonda	5' FAMCCT CCA ATC CAG ACA CTG TAC TTY CTC TC- TAMRA 3'

(JRC, 2010; Gálvez et al., 2013)

La prueba se realizó en un Ciclador ABI7500, con un volumen de 20 ul por reacción, los cuales corresponden a:

Mastermix	10 ul
Primer F t-nos	02 ul
Primer R t-nos	02 ul
Sonda t-nos	1.2 ul
Primer F actina	0.6 ul
Primer R actina	0.6 ul
Sonda actina	1.1 ul
ADN 50 ng	2.5 ul

Análisis de muestras por laboratorio extranjero

Como parte del proyecto, se pactó con los apicultores que participaron, que de las 67 muestras, solamente cinco serían enviadas a un laboratorio extranjero, Eurofins GeneScan GmbH. Este laboratorio es utilizado por exportadores mexicanos y compradores europeos de miel para realizar de manera privada la detección de SGM en la miel, previo a la compra del producto.

Curvas estándar de kits Taqman GMO

Se realizan curvas estándar por triplicado para los Kits GMO 35S, con material genéticamente modificado, del cual se conoce que en su construcción tienen p-35S.

En el caso del Kit GM 35S Maize se utilizó maíz MON 810, el cual posee la siguiente construcción genética (Figura 11)

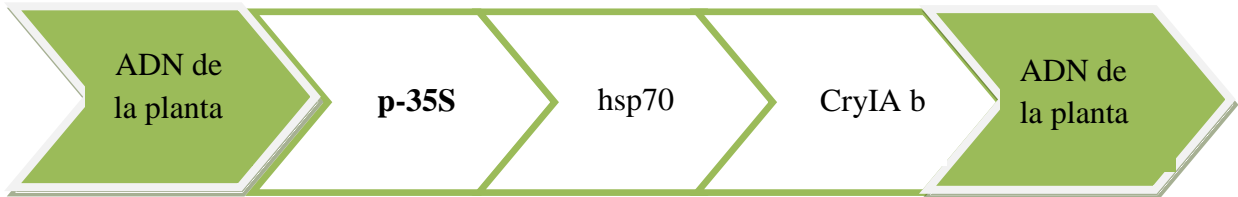


Figura 11. Representación esquemática de la construcción del maíz MON 810. Fuente: (Wei et al., 2008b)

Para el caso de la soya, se utilizó el evento denominado MON 04032-6. La construcción genética, se observa en la siguiente figura.



Figura 12. Representación esquemática de la construcción de la soya MON 04032-6. Fuente (Wei et al., 2008c)

Las curvas estándar, se realizaron para tener la certeza que existía una eficiente amplificación para el material endógeno y el blanco (p-35S) con los kits GMO 35S, así como tener una aproximación de la detección que presentan estos kits comerciales, aun cuando la detección de este estudio fue cualitativa.

Dentro de las curvas encontraremos valores, como son la pendiente, que refleja la eficiencia de amplificación, el valor óptimo es de -3.33, aceptando valores que van del -3.0 a -3.6. Y el coeficiente de correlación R^2 , que indica el ajuste muy cercano entre la regresión lineal

de la curva patrón y los valores individuales de Ct de las muestras patrón, este debe ser de 0.99 (LifeTechnologies, 2013).

Las construcciones antes mencionadas contienen algunos de los siguientes elementos(Wei et al., 2008b; Wei et al., 2008c; COMPASS, 2009):

p-35S: promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor

hsp70: intrón hsp70 del maíz

CryIA b: gen que codifica para una toxina Bt, que protege a la planta del barrenador europeo *Ostrinia nubilalis*

CTP4: segmento que codifica para un péptido señal dirigida a cloroplasto

CP4 epsps: aislado de una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que provee la resistencia al herbicida glifosato

t-nos: terminador del gen de la nopalina sintasa, proveniente de *Agrobacterium tumefaciens*

Para la realización de la curva estándar, se utilizó ADN extraído de maíz MON-810 con una concentración de 66%.

Tabla 9. Curva estándar para endógeno de maíz MON 810			
Nanogramos de ADN de maíz por reacción	Media Ct	Desviación estándar	Log
100	21.86	0	2
10	24.87	0.23	1
1	27.87	0.16	0
0.1	31.48	0.99	-1

Pie de tabla 9: los valores positivos para el gen endógeno del maíz, serán tomados acorde con el ciclo umbral o Ct (por sus siglas en inglés de threshold cycle) del menor a 21.86 al mayor 31.48.

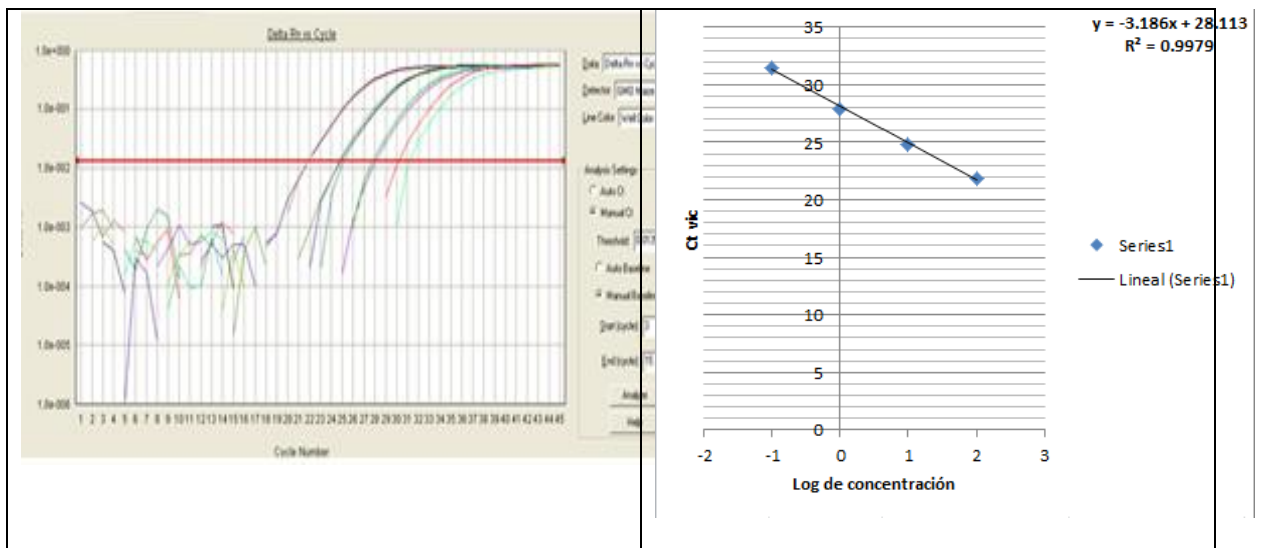


Figura 13. Curva estándar y coeficiente de correlación para gen endógeno de maíz

La curva estándar para el gen endógeno del maíz tiene una correlación de 0.99 lo que indica que es reproducible, la pendiente obtenida es de -3.186. Los niveles establecidos en ambos casos es de 0.99 y -3.3 ± 0.3 respectivamente, por lo tanto, los valores obtenidos, son aceptables.

En el caso del mismo ejercicio para el transgén 35S, los resultados se muestran en la tabla 10. Curva estándar para p-35S en maíz MON 810 y figura 14.

Tabla 10. Curva estándar para p- 35S en maíz MON 810			
Nanogramos de ADN de 35S por reacción	Media Ct	Desviación estándar	Log
66	21.4	0.09	1.819543936
6.6	24.5	0.09	0.819543936
0.66	27.53	0.23	-0.180456064
0.066	30.4	0.76	-1.180456064

Pie de tabla. 10: los valores positivos para el p-35S en la prueba comercial del maíz, serán tomados acorde con el ciclo umbral del menor a 21.4 al mayor 30.4.

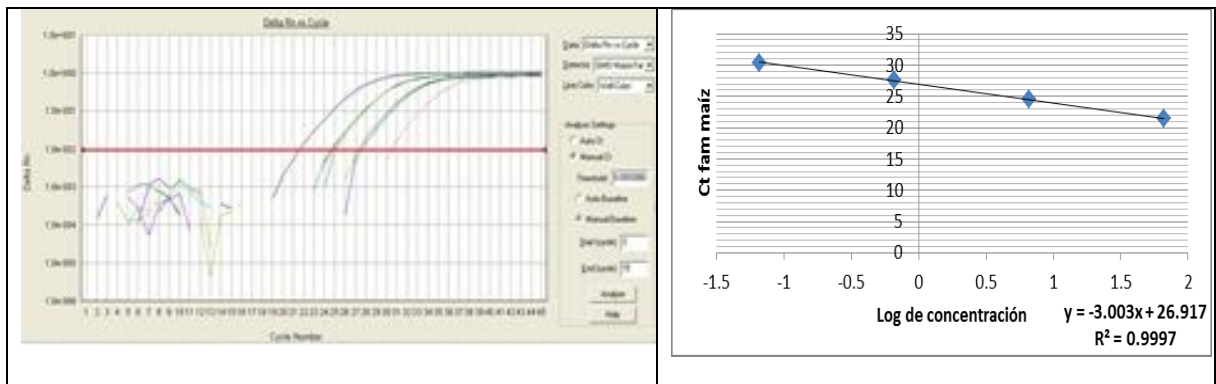


Figura 14. Curva estándar y coeficiente de correlación para p-35S de maíz

En el caso de la curva estándar para p-35-S se obtuvo una correlación de 0.99 lo que indica que es reproducible, y la pendiente fue de -3.003. Los niveles establecidos en ambos casos es de 0.99 y -3.3 ± 0.3 respectivamente, por lo tanto, los valores obtenidos, son aceptables.

En el caso de la soya MON-0432-6, también se realizaron 3 curvas patrón, los resultados para el gen endógeno se muestran a continuación

Tabla 11. Curva estándar para endógeno de soya MON 04032-6			
Nanogramos de ADN de soya por reacción	Media Ct	Desviación estándar	Log
100	27.46	0.10	2
10	30.60	0.24	1
1	33.75	0.15	0
0.1	36.89	0.18	-1

Pie de tabla 11: los valores positivos para el gen endógeno del soya, serán tomados acorde con el ciclo umbral o Ct (por sus siglas en inglés de threshold cycle) del menor a 27.46 al mayor 36.89

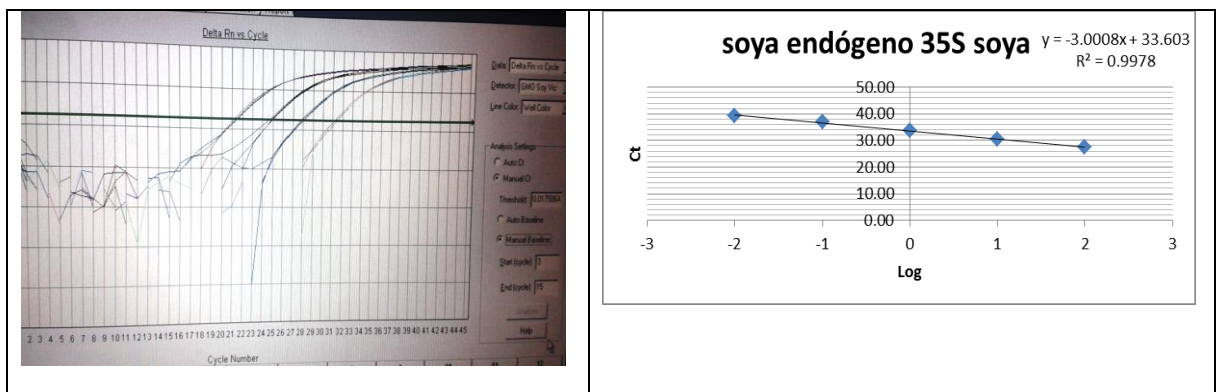


Figura 15. Curva estándar y coeficiente de correlación para endógeno de soya

En el caso de la curva estándar para el gen endógeno de soya, se obtuvo una correlación de 0.99 lo que indica que es reproducible, y la pendiente fue de -3.00. Los niveles establecidos en ambos casos es de 0.99 y -3.3 ± 0.3 respectivamente, por lo tanto, los valores obtenidos, son aceptables.

Los resultados de las curvas estándar utilizando el Kit Taqman GMO Detection soy, fueron los siguientes:

Tabla 12. Curva estándar para p-35S en soya MON 04032-6			
Nanogramos de ADN de 35S por reacción	Media Ct	Desviación estándar	Log
100	21.27	0.09	2
10	24.68	0.22	1
1	28.07	0.00	0
0.1	30.87	0.27	-1

Pie de tabla 12: los valores positivos para el p-35S en la prueba comercial de soya, serán tomados acorde con el ciclo umbral del menor a 21.27 al mayor 30.87.

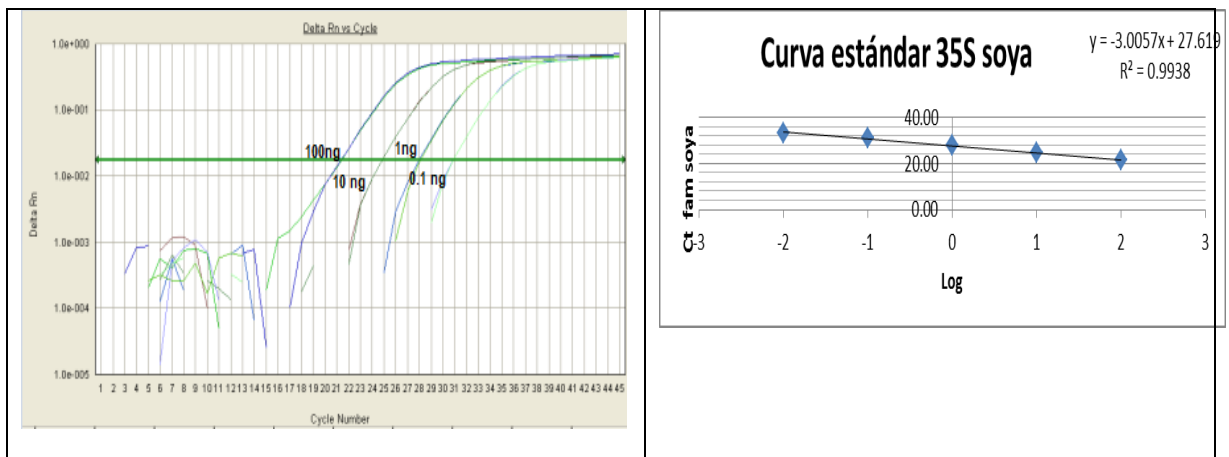


Figura 16. Curva estándar y coeficiente de relación para p-35 en soya MON 0432-6

En el caso de la curva estándar para p-35-S se obtuvo una correlación de 0.99 lo que indica que es reproducible, y la pendiente fue de -3.00. Los niveles establecidos en ambos casos es de 0.99 y -3.3 ± 0.3 respectivamente, por lo tanto, los valores obtenidos, son aceptables.

RESULTADOS

Análisis PCR tiempo real

Detección de maíz GM

Los resultados obtenidos en el PCR tiempo real para el Taqman GMO Detection Maize, se observan en la Tabla 13.

Las muestras que dieron no detectado para el material endógeno y p-35S se omitieron.

muestra	media de Ct material endógeno	desviación estándar de Ct material endógeno	Media de Ct p-35S	desviación estándar de Ct p-35S
1	34.665	0.671	37.14	0
2	35.185	0.36	No detectado	No detectado
3	34.05	0	32.93	0
4	35.81	0.282	36.66	0
5	33.425	0.742	34.87	0
6	32.99	0.537	39	5.826
7	36.43	0	36.43	0
8	33.935	2.835	36.57	0
9	33.245	1.279	39.24	0
10	36.18	0	42.9	0
11	38.445	6.526	No detectado	No detectado
12	32.045	1.025	No detectado	No detectado
13	34.1	0	No detectado	No detectado
14	38.79	0	36.12	0
15	No detectado	No detectado	35.265	2.011
17	36.45	2.008	37.29	0
18	37.72	0	38.88	0
19	32.7	0	35.39	0.141
20	35.87	0	36.865	1.718
21	No detectado	No detectado	33.68	0
22	No detectado	No detectado	35.94	0.947
23	34.655	0	39.74	0
24	No detectado	No detectado	39.26	0
25	32.71	0	36.22	0
28	35.04	0	42.325	0.0919
29	34.47	0	No detectado	No detectado

30	No detectado	No detectado	42.1	0
31	38.89	0	No detectado	No detectado
32	34.43	2.814	No detectado	No detectado
33	44.34	0	40.25	0
36	38.49	5.78	42.76	0
37	32.91	0	36.74	0
39	39.05	0	No detectado	No detectado
40	36.8	5.586	32.325	0.8131
41	No detectado	No detectado	37.2	0
43	No detectado	No detectado	37.08	0
44	No detectado	No detectado	33.06	0
45	No detectado	No detectado	35.13	0
47	33.48	1.01	31.905	1.081
48	34.97	0	No detectado	No detectado
49	No detectado	No detectado	35.99	0
50	35.12	0	No detectado	No detectado
52	33.96	1.24	31.68	1.48
53	No detectado	No detectado	37.27	0
54	No detectado	No detectado	37.27	0
55	33.69	0.0565	No detectado	No detectado
57	36.115	0.063	No detectado	No detectado
58	30.45	8.43	No detectado	No detectado
59	38.06	0.268	No detectado	No detectado
60	37.015	1.95	No detectado	No detectado
61	36.63	0	No detectado	No detectado
62	33.58	0	No detectado	No detectado
63	32.32	1.598	29.83	0
64	35.87	0	No detectado	No detectado
65	No detectado	No detectado	36.51	0

Pie de tabla 12. De las 67 muestras, solamente se dio una amplificación (muestra no. 58) a la presencia de material endógeno de maíz. En lo referente al p-35S, solamente una muestra (Muestra No. 63) dio señal de amplificación tardía a dicha modificación genética, dentro de los valores establecidos en la curva de estándar. Acorde con las curvas estándar a partir del Ct 21.86 se considera positivo a la presencia de material endógeno de soya, para el p-35S se considera un resultado positivo a partir del Ct 21.4.

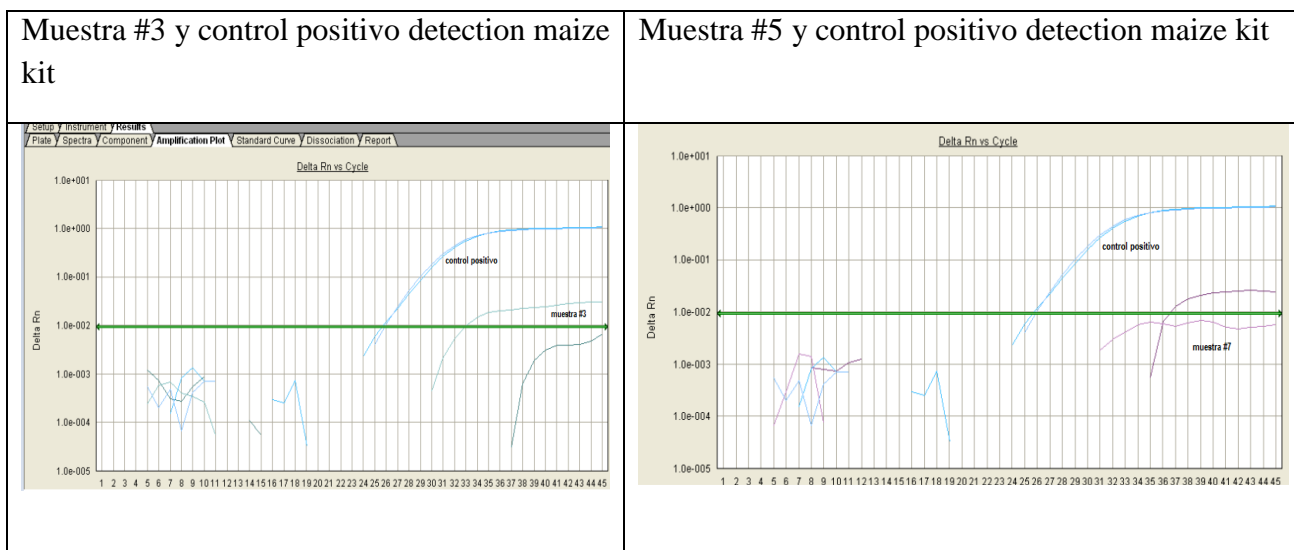


Figura 17. Amplificaciones muestras #3 y #5

Detección de soya GM

Los resultados obtenidos en el PCR tiempo real para el Taqman GMO Detection soy, se observan en la Tabla 14.

Las muestras que dieron no detectado para el material endógeno y p-35S se omitieron.

muestra	media de Ct material endógeno	desviación estándar de Ct material endógeno	Media de Ct p-35S	desviación estándar de Ct p-35S
4	No detectado	No detectado	39.04	0
5	No detectado	No detectado	39.08	0
14	No detectado	No detectado	38.3	0
15	No detectado	No detectado	37.43	0
18	No detectado	No detectado	37.74	0
19	22.87	0	44.92	0
20	No detectado	No detectado	34.8	0
22	No detectado	No detectado	38.17	0.035
24	No detectado	No detectado	38.2	0
25	No detectado	No detectado	36.03	0
30	No detectado	No detectado	39.49	0
32	No detectado	No detectado	39.18	0
33	No detectado	No detectado	38.69	0

41	No detectado	No detectado	38.13	0
44	No detectado	No detectado	38.85	0
46	No detectado	No detectado	37.88	0
47	35.025	2.976	29.82	0.6505
52	36.025	0.049	30.23	0.0989
59	38.58	0	No detectado	No detectado
60	No detectado	No detectado	38.91	0
61	38.82	1.796	30.33	0.1414
64	No detectado	No detectado	38.34	1.074
65	36.43	0.848	29.11	1.682
67	No detectado	No detectado	37.96	0

Pie de tabla 13. De las 67 muestras, tres muestras (muestras No. 47, 52 y 65) emitieron amplificación a la presencia de material endógeno de soya, dichas amplificaciones se dieron en ciclos que corresponden a los valores establecidos en la curva estándar. Del total de muestras cuatro (Muestras No. 47, 52, 61 y 65) emitieron señales de amplificación dentro de los valores establecidos en la curva estándar para el p-35S. Acorde con las curvas estándar a partir del Ct 27.46 se considera positivo a la presencia de material endógeno de soya, para el p-35S se considera un resultado positivo a partir del Ct 21.27.

Muestra #60 y control positivo detection soy kit

Muestra #67 y control positivo detection soy kit

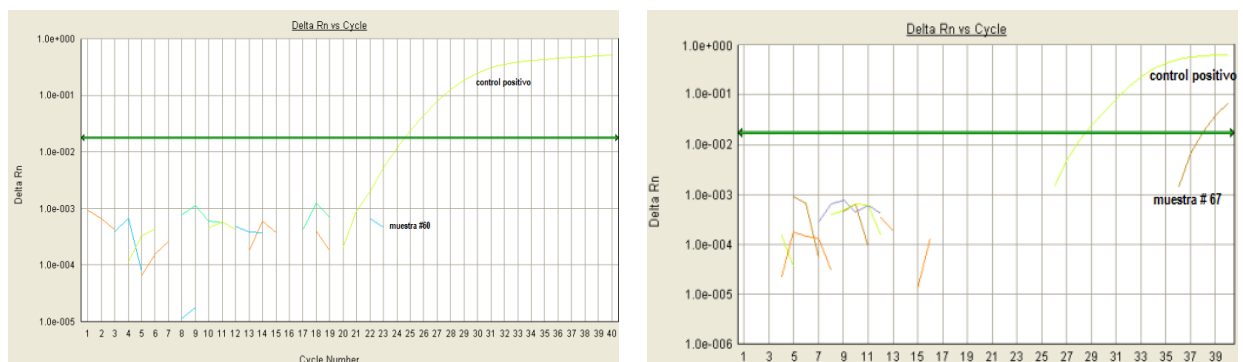


Figura 18. Amplificaciones muestras #60 y #67

Prueba para t-nos

Para la realización de la prueba para la detección de t-nos, se eligió el 10% del total de las muestras, dicho cálculo arrojaba un valor de 6.7 muestras, éste número se redondeó, obteniendo

una total de 7 muestras (20, 25, 40, 47, 52, 61, 65). El total de las muestras tuvieron resultado negativo a la presencia de dicha secuencia, lo cual se puede observar en la figura 19.

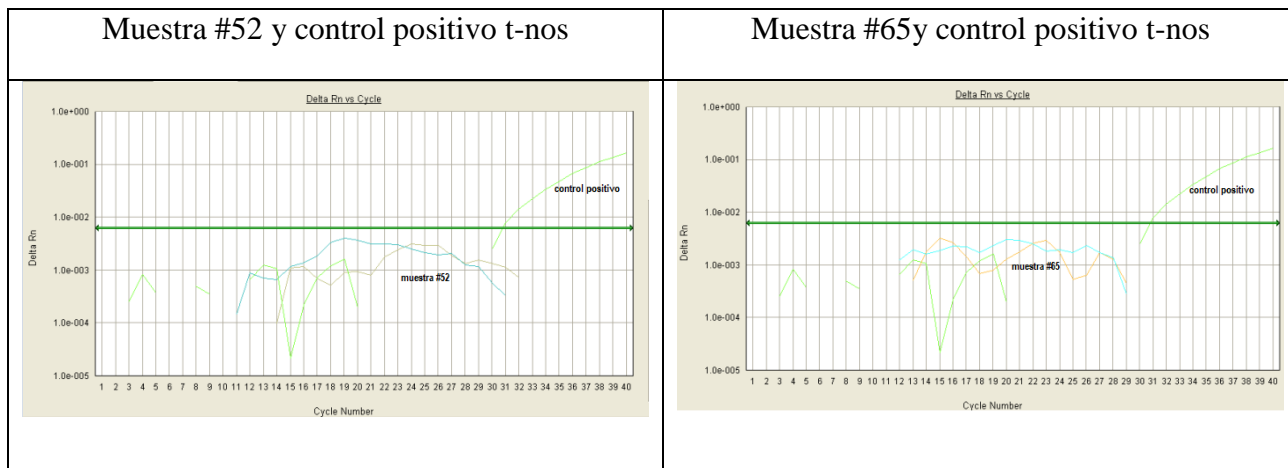


Figura 19. Amplificaciones muestras #52 y #65

Prueba para actina de planta

Para la presencia de actina. Las mismas 7 muestras mencionadas para la prueba de t-nos, se sometieron a la detección de actina de planta. Exceptuando la muestra #84, todos las muestras dieron positivo a la presencia de esta secuencia, los controles positivos emitieron señales de amplificación, y en los controles negativos no la hubo, los Ct se muestra a continuación en la Tabla 15.

Tabla15. Media de los Ct prueba de detección de actina de planta	
Muestras	Media del Ct actina
20	30.98
25	31.505
40	29.38
47	36.08
52	30.42
61	No detectado
65	28.49
Control positivo	23.62

Pie de tabla 14: De las 7 muestras sometidas a la prueba para detección de actina de planta, 6 dieron positiva a la presencia de la misma.

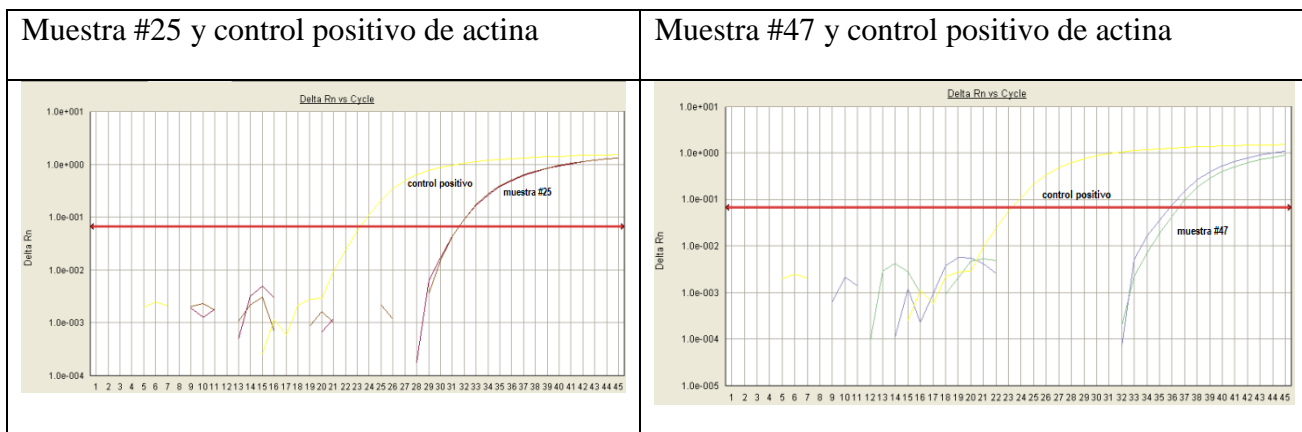


Figura 20. Amplificaciones muestras #25 y #47

Análisis de muestras en laboratorio extranjero

Los resultados obtenidos de las cinco muestras enviadas (muestras 10, 25, 40, 48 y 64) fueron cuatro muestras negativas y una muestra positiva a p-35S.

Al recibir la comunicación electrónica de que la muestra #25 dio positivo al p-35S, se solicitó que del frasco testigo se realizara un segundo análisis, en el cual se obtuvo resultado positivo a p-35S y t-nos.

DISCUSIÓN

Para el inicio de las investigaciones para detectar la presencia de SGM en miel, se debe una metodología establecida para obtener el polen contenido en la miel, y a su vez, lograr de éste la extracción de un ADN puro e íntegro que pueda ser utilizado en las pruebas de PCR tiempo real, existen protocolos que han sido descritos para esta finalidad como lo es la guía publicada por la Oficina Federal de Protección al Consumidor en Alemania en 2011.

Previo a dicha guía, se cuentan con trabajos que aunque la finalidad era describir las técnicas necesarias para lograr una identificación de especies vegetales en distintas mieles con la finalidad de evidenciar su denominación de origen Laube et al. (2010) describieron una metodología para la obtención del ADN del polen de la miel como matriz.

Más adelante Waiblinger et al. (2012), publicó una guía para la extracción de ADN del polen en la miel, la cual fue validada por el propio equipo de trabajo así como por 14 laboratorios más, los cuales lograron obtener con dicha metodología resultados equiparables.

Recientemente se ha desarrollado por Torricelli et al. (2016) un protocolo para validar la extracción del ADN del polen en miel, éste grupo de trabajo ha retomado las investigaciones antes mencionadas, adicionando un etapa de purificación del ADN. Este trabajo utilizó 18 muestras de miel comercial proveniente de diferentes países de Europa y América, encontrando en una muestra la presencia de una SGM, dicha muestra provenía de Italia. La diferencia de este protocolo con los anteriores es que no se utilizó un método de disrupción a través de balines para la extracción del ADN del polen

En México, se han realizado investigaciones para identificar SGM en miel de colmenas del país, Gálvez et al. (2013) realizó una investigación para proponer una estrategia metodológica para conocer si existe o no la presencia de SGM en el polen contenido en la miel de 56 muestras provenientes de Campeche, Yucatán y Quintana Roo, que en conjunto forman la Península de Yucatán.

Los blancos para identificar las modificaciones genéticas que utilizaron fueron el p-35S, t-nos y el evento específico soya MON04032-6 o también llamada RounUp Ready, la técnica de análisis fue PCR tiempo real, utilizando sondas y cebadores con los diseños emitidos por el JRC de la Comunidad Europea. En el estudio mencionado se encontró sólo una muestra positiva.

A su vez, en la península de Yucatán se llevó a cabo una investigación por Narváez (2013), en la cual a través de distintas técnicas como melisopalinología, PCR tiempo real y PRC punto final, se identificó material genético de soya no GM así como material genético correspondiente al evento específico soya MON04032-6, aunque las pruebas emitieron resultados diferentes debido a la sensibilidad de cada una.

Por su parte Villanueva et al. (2014) en la misma península (de Yucatán) detectó la presencia de polen de soya transgénica en dos de las muestras de su estudio (n=9), sin embargo, no se menciona cuáles son las SGM específicas que encontraron en el estudio de laboratorio realizado, ni bajo que técnica se hicieron. Los tres estudios, aunque en diferentes años, se localizaron en la misma región geográfica del país, donde SENASICA emitió la autorización para cultivar soya con evento MON04032-6, por lo que ambas investigaciones coinciden en la identificación de al menos una muestra positiva para SGM.

El presente trabajo se situó en la costa de Oaxaca, lugar donde al momento no se han encontrado otros estudios para identificar SGM en miel de esa región. Para el presente trabajo, se utilizó una metodología similar que a de la Oficina Federal de Protección al Consumidor en Alemania (2011), Laube et al. (2010), Waiblinger et al. (2012), Gálvez et al. (2013), Narváez (2013) y Torricelli et al. (2016), para la obtención del polen así como la extracción del ADN del mismo, mediante el método del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB), el cual es el elección para la extracción y purificación del ADN de plantas y alimentos provenientes de las mismas.

La diferencia existente con Torricelli et al. (2016) es que en la presente investigación si se utilizó el paso de disrupción con el TissueLyser® de Qiagen®.

Para la detección de las SGM, sólo en el caso de t-nos, se utilizaron sondas a diseño basadas en el JRC de la Comunidad Europea, las cuales demostraron arrojar datos precisos. En el caso de la búsqueda del p-35S, se utilizaron estudios comerciales para soya y maíz los cuales para esta matriz no demostraron resultados equiparables entre ambas pruebas, aun cuando ambas eran para la detección del mismo blanco.

Cabe señalar que desde el periodo comprendido en el proceso de la investigación al momento, en el estado de Oaxaca, no existen permisos de liberación de cultivos GM, por lo que la posibilidad de encontrar SGM en la miel de la zona era nula.

La razón por la cual no existen permisos de liberación de cultivos GM en Oaxaca es derivado que en la Ley de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados, en su artículo 2 fracción XI dice a la letra: “Para cumplir su objeto, este ordenamiento tiene como finalidades: Fracción XI. Determinar las bases para el establecimiento caso por caso de áreas geográficas libres de OGMs en las que se prohíba y aquellas en las que se restrinja la realización de actividades con determinados organismos genéticamente modificados, así como de cultivos de los cuales México sea centro de origen, en especial del maíz, que mantendrá un régimen de protección especial”.

A la par en este estudio se encontró un problema al momento de realizar el manejo de la miel en los tambos cuando se obtuvieron las muestras, para esta actividad se decidió utilizar la metodología aprobada por el SENASICA para el muestreo oficial en el Programa Nacional de Monitoreo y Control de Residuos Tóxicos en Miel que a su vez es el que se encuentra autorizado para el muestreo oficial previo a las exportaciones nacionales.

Sin embargo, esta metodología no garantiza que la miel se encuentre homogeneizada en su totalidad, debido a las condiciones propias de la miel, como es la cristalización, donde a pesar de mover el muestreador no es posible mezclar el producto, y si se encuentra todavía en estado líquido el proceso natural de sedimentación no es del todo revertido al ser un producto viscoso. Aunado a esto, los tambos que contenían la miel tenían un peso de 300kg aproximadamente, lo que no permitía agitarlos o moverlos.

Las razones descritas en el párrafo anterior, permiten discernir, que a pesar del muestreo, existió una separación natural de los componentes de la miel, ya sea de sedimentos que se fueron al fondo del barril o de aquellos componentes que por su peso pudieron ir hacia la parte superior (polen).

Dentro de la problemática metodológica, se encontró discrepancia en los resultados de las muestras analizadas en un laboratorio extranjero “Eurofins GeneScan GmbH” situado en la ciudad de Friburgo de Brisgovia, Alemania, donde en dos muestras pertenecientes al mismo tambo de miel arrojaron diferentes resultados entre sí, igualmente estos resultados son diferentes a los obtenidos en esta investigación; esto podría ser, debido a la posibilidad de que la distribución y cantidad del polen no fuese la misma en las tres muestras analizadas.

En cuanto a la problemática práctica, podemos decir que este estudio indica que las muestras analizadas que emitieron amplificaciones tardías a la pruebas comerciales para detección de p-35S (maíz y soya), obteniéndose disparidad en los resultados de ambas pruebas, lo que presumiblemente puede ser visto como falsos positivos.

En lo referente a las sondas a diseño para la detección de t-nos, las muestras analizadas resultaron negativas. Sin embargo, estos resultados no exentan al polen contenido en las muestras de la posibilidad de ser positivo a otros elementos que se insertan en la modificación genética de plantas.

Otra limitante en la presente investigación fue la económica, al no lograr obtener un apoyo mayor, para poder realizar los ensayos por duplicado o triplicado, lo cual otorgaría mayor confiabilidad al presente trabajo. Dentro de las recomendaciones más importantes que se pueden indicar, son que en futuros estudios, la toma de muestra de miel de los barriles deberá modificarse, y lograr una muestra inicial de 1.5 kg en vez de tres muestras de 0.500 kg, esto con la finalidad de llevar la muestra inicial a laboratorio y poder manejarla de manera adecuada para realizar una correcta homogenización de ésta y posteriormente dividirla en las tres muestras para análisis y custodia respectivamente.

Otra recomendación que puede enriquecer futuros trabajos de investigación que deseen detectar la presencia de SGM, es el incluir un perfil con mayor cantidad de SGM de los eventos de cultivos GM autorizados en México y no autorizados en la Unión Europea, con la finalidad de descartar la presencia de dichas SGM en la miel que pueda ser comercializada a dicho destino.

En el presente trabajo se detectó la presencia de 1 muestra con maíz no GM (no.58), la baja incidencia de maíz en las muestras, pudo deberse a la ubicación de las colmenas, pues los apiarios se localizaban en terrenos donde no se observó el cultivo de la milpa (maíz asociado con frijol, calabaza y quelites), pudiendo observarse en la cercanía la presencia de árboles frutales de la región, vegetación nativa y cultivos cafetaleros.

La número 63 de la prueba comercial de maíz amplificó para el gen endógeno, amplificando dentro de los valores de la curva estándar para p-35S.

La número 61, de la prueba comercial de soya amplificó de manera tardía para el gen endógeno y amplificando dentro de los valores de la curva estándar para p-35S.

La número 19, de la prueba comercial de soya amplificó de manera temprana (previo al valor establecido como inicio de positivo Ct 27.46) para el gen endógeno, dicho resultado se pudo deber si existía en la zona cultivos de soya o como resultado de la alimentación de las abejas a través de preparados proteínicos con harina de soya.

En el caso de la soya GM se identificaron tres muestras (47, 52 y 65) que amplificaron dentro de los valores de las curvas estándar de endógeno de soya y p-35S.

Todas las muestras obtenidas para el presente estudio, provenían de apicultores certificados bajo el esquema de producción orgánica por la sociedad civil Certificadora Mexicana de Productos y Procesos Ecológico (CERTIMEX), en este esquema los apicultores alimentan a las abejas con la miel que reservan de la cosecha previa al periodo de estiaje, en caso de no

contar con suficiente miel propia, pueden alimentar con miel de otros apicultores certificados en el mismo esquema o con torta (mezcla de proteína, levadura, polen, miel o azúcar) producida a partir de harina de soya certificada como orgánica.

Es importante señalar que de acuerdo a datos publicados por la SAGARPA (2010), México es el tercer exportador de miel orgánica, y dentro de los ocho estados productores de la misma, Oaxaca es quien liderea la producción de miel orgánica. Aun cuando dicho estado participa con el 5.5% de las población total de colmenas del país acorde con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera durante el 2015.

Ahora bien, la producción de miel orgánica en el estado de Oaxaca ha abierto la puerta a pequeños productores de zonas marginadas para ingresar de manera organizada a la cadena internacional del esquema Comercio Justo México, mediante el cual estos productores tienen la posibilidad de colocar su producto en el mercado nacional e internacional sin intermediarios, y con un sobreprecio, el cual es aceptado por el comprador como lo menciona Doppler et al. (2006). Con este esquema se beneficia al medio ambiente a través de un esquema de producción sustentable, se beneficia al productor de manera económica, y el consumidor obtiene un producto acorde con sus necesidades.

CONCLUSIONES

- No existe autorizaciones de cultivos GM en la costa de Oaxaca, debido a que dicho estado, es considerado centro de origen y domesticación del maíz.
- De las 67 muestras de miel producida en la costa de Oaxaca, procesadas en laboratorio no se identificó ninguna positiva a t-nos.

PROSPECTIVA

- Es importante crear conciencia de que existe el riesgo latente de captación de SGM en la miel debido a la itinerancia de las colmenas con fines de polinización de cultivos agrícolas o de aprovechamiento de floraciones. En virtud de lo anterior, resulta conveniente realizar otros estudios que incluyan el perfil completo de eventos autorizados en México.
- Es necesaria la generación de investigación para estudiar si la movilización de las colmenas representa una fuente oculta de SGM en la miel, debido a que más del 50% de las entidades federativas del país cuentan con algún tipo de permiso de liberación de cultivos genéticamente modificados.
- Es imprescindible que se genere capacitación referente al tema para los profesionistas del área, y de este modo se pueda generar mayor información con sustento científico sobre el impacto comercial que puede tener la continua autorización de liberación de cultivos GM en la producción y comercialización de la miel orgánica y convencional mexicana.
- De igual forma es necesario que se puede generar la oferta del servicio de detección de SGM por parte de instituciones con personal que tenga la competencia técnica y científica para llevar a cabo dichos estudios.
- Debido a los resultados no equiparables entre las pruebas comerciales y los análisis en laboratorios extranjeros, es recomendable que se realicen estudios en el estado de Oaxaca, con mejores recursos económicos para obtener un mayor rigor científico, al realizar muestras pareadas que a su vez tengan pruebas al menos por duplicado, utilizando sondas a diseño y no pruebas comerciales, en las cuales se desconoce el gen endógeno utilizado así como la secuencia genética para la detección de la modificación genética.
- En futuras investigaciones, es importante analizar el alimento proporcionado a las abejas en la época de estiaje, para determinar si éste es una fuente de polen OGM para la miel.

REFERENCIAS

- APPLIEDBIOSYSTEMS 2010. TaqMan Genetically Modified Organism (GMO) Detection Kits. User Guide.
- BENÍTEZ, A. 2005. Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas. In: REVERTÉ (ed.). España.
- CAMPELL, N. 2007. *Biología*, Ed. Médica Panamericana, Madrid.
- CENTRE, J. R. 2010. *Compendium of reference methods for GMO analysis*, Italy.
- CGG 2000. Coordinación General de Ganadería. Situación actual y perspectiva de la Apicultura en México 2000. In: PNCAA (ed.) SAGARPA ed.
- CIBIOGEM. 2013. *Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados* [Online]. México. Disponible en: <http://www.cibiogem.gob.mx/Acerca/Paginas/default.aspx> [Último Acceso 08 junio 2013].
- CLIVE, J. 2012. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crop*. Nueva York: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA).
- COMISIÓN PARA LA COOPERACIÓN AMBIENTAL. 2004. *Maíz y Biodiversidad Efecto del maíz transgénico en México*, CEC-CCA-CCE Canadá.
- COMMISSION EUROPEAN. 2012. *Standar Operating Procedure DNA Extraction from honey and pollen*. In: PROTECTION, I. F. H. A. C. (ed.). European Union.
- COMPASS, G. 2009. Gene CryIA in MON 810 maize.
- CONABIO. 2008. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. *Preguntas comunes sobre los organismos genéticamente modificados o transgénicos*, [Online]. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/doctos/preguntas.html> [Último Acceso Junio 2014]
- CONABIO. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. *Biodiversidad Mexicana* [Online]. Disponible en: <http://www.biodiversidad.gob.mx/> [Último Acceso Junio 2014].
- CUEVAS, F. 2006. Actualización de la información sobre los maíces criollos de Oaxaca. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.
- DOF. 2006a. Diario Oficial de la Federación. *Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados*. Distrito Federal, México.
- DOF. 2006b. Diario Oficial de la Federación. *Ley de Productos Orgánicos* Distrito Federal, México.
- DOPPLER, F., GONZALEZ, A. 2007. El comercio justo: entre la institucionalización y la confianza. Problemas del Desarrollo, Revista Latinoamericana de Economía. Vol. 38, núm. 149, abril-junio.
- DUCOING, A. 2009. *Introducción a la Estadística*, UNAM, México.
- EUROPEA, C. 2003a. Reglamento 1830/2003 trazabilidad, etiquetado y presentación de alimentos y piensos OGM.
- EUROPEA, C. 2003b. Reglamento (CE) No 1829/2003 del Parlamento Europeo y del consejo sobre alimentos y piensos modificados genéticamente. Unión Europea.

- EUROPEA, C. 2008. Consejo sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos con respecto a a producción ecológica, su etiquetado y su control. *In:* EUROPEA, C. (ed.) 889/2008.
- EUROPEA, C. 2011a. Comunicado de Prensa no 79/11. *In:* JUSTICIA, T. D. (ed.). Luxemburgo.
- EUROPEA, C. 2011b. *Servicio de información comunitario sobre investigación* [Online]. Disponible en: http://cordis.europa.eu/fp7/jrc/home_es.html [Último Acceso Agosto 2014].
- EUROPEA, C. 2014. EU register of authorised GMOs Plants. Health and Consumers.
- FAO. 2005. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. *La apicultura y los medios de vida sostenible* [Online]. Roma: FAO. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/008/y5110s/y5110s00.htm#Contents> [Último Acceso 06 junio 2013].
- FAO 2001. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. Cultivos genéticamente modificados. *In:* FRESCO, L. O. (ed.). Falkenberg, Suecia.
- FOCPFSG 2011. Federal Office of Consumer Protection and Food Safety of Germany. Guideline on sampling and analysis for the detection of pollen from genetically modified plants in honey. Germany.
- GÁLVEZ, A., QUIRASCO, M., PEÑA, C. & ESTRADA, C. 2013. Detección de polen de plantas genéticamente modificadas en miel. Fase I. Informe final SNIB-CONABIO, proyecto KE007. *In:* UNAM-IQ (ed.). México, D.F.
- IBT. 2015. INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA. *Cuantificación ADN* [Online]. Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/cuantificacion.html> [Último acceso 20 agosto 2016].
- IICA 2012. Caracterización de la cadena productiva de miel en El Salvador. Ministerio de Agricultura y Ganadería. El Salvador.
- INEGI n.d. Cuéntame Economía, Agricultura. [Online]. Disponible en: <http://cuentame.inegi.org.mx/economia/primarias/agri/default.aspx?tema=E> [Último acceso 19 agosto 2016].
- INFOASERCA 2010. Situación actual y perspectiva de la apicultura en México. *In:* ASERCA (ed.). Claridades Agropecuarias. México, D.F.
- JRC 207-a. Joint Research Centre. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Extracción y purificación de ADN. Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas, Comunidades Europeas.
- JRC n.d.-b. Joint Research Centre. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. PCR Cuantitativa para la detección de OGM. Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas, Comunidades Europeas.
- KATO, T., MAPES, C., MERA, L. M., SERRATOS, J. & BYE, R. 2009. *Origen y diversificación del maíz, una revisión analítica*, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

- LAUBE I, HIRD H, BRODMANN P, ULLMANN S, SCHÖNE-MICHLING M, CHRISHOLM J, BROLL H. 2010. Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey. *Food Chem* 118:979–986
- LENS, P. n.d. The CaMV 35S promoter. [Online]. Disponible en: <http://www.cambia.org/daisy/promoters/242/g1/250.html> [último acceso 28 septiembre 2015].
- LEWIN, B. 1996. *Genes IV*, Oxford University Press, New York.
- LIFETECHNOLOGIES 2013. Introducción a PCR Tiempo Real y sus Aplicaciones: Cualitativas y Cuantitativas. *Curso Teórico-Práctico de PCR Tiempo Real y sus aplicaciones v.1.2013*.
- MARCIA, H., MARCI, L. & TANDANCE, S. 2010. The use of 35S and Thos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials. *Anal Bioanal Chem*, 12.
- MEGASTAT, programa para funciones estadísticas en excell.
- MONSANTO. *Cultivos genéticamente modificados en el mundo*, [Online]. Disponible en: <http://www.monsanto.com/global/ar/productos/pages/cultivos-gm.aspx> [enero 2014].
- NARVAEZ, P. 2013. *Detección de polen convencional y genéticamente modificado de soay, Glycine Max L., en la miel de abeja, apis melifera de los estados de Campeche y Yucatán*.
- ONU. 2000. *Organización de las Naciones Unidas. Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología del Convenio sobre diversidad biológica*, Canadá.
- QIAGEN 2010. DNeasy® mericon™ Food Handbook. In: QIAGEN (ed.).
- RANDHAWA, G., SINGH, M. & MORISSET, D. 2013. Loop-Mediated isothermal amplification: Rapid visual and real-time methods for detection of genetically modified crops. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61, 9.
- TORRICELLI, M., PIERBONI, E., TOVO, G., CURCIO, L., RONDINI, C. 2016. In-house Validation of a DNA Extraction Protocol from Honey and Bee Pollen and Analysis in Fast Real-Time PCR of Commercial Honey Samples Using a Knowledge-Based Approach. *Food Anal. Methods*.
- SAGARPA. 2009a. SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN. Manual de buenas prácticas pecuarias en la producción de miel. In: CCG/SENASICA (ed.) 2 ed. México, D.F.
- SAGARPA. 2009 b. SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN. Manual de buenas prácticas y envasado de la miel. In: CGG/SENASICA (ed.) 2 ed. México, D.F.
- SAGARPA. 2011. SECRETARÍA DE AGRICULTURA, G., DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN. Apoya SAGARPA a apicultores del sur-sureste para certificarse en buenas prácticas de producción.
- SAGARPA. 2013. SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN 2013. Infografía Miel orgánica. In: SOCIAL, C. (ed.).
- SENASICA. SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA. SENASICAa. 2016. *Bioseguridad para Organismos*

- Genéticamente Modificado. 2016* [Online]. Disponible en: <http://senasica.gob.mx/?id=6206> [Último Acceso Agosto 2016].
- SENASICA. SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA. SENASICAb. 2016. *Resoluciones a Solicitudes de Permiso de Liberación al Ambiente de OGM 2008-2015. 2016* [Online]. Disponible en: <http://senasica.gob.mx/?id=6496> [Último Acceso Agosto 2016].
- VILLANUEVA, R., ECHAZARRETA, C., ROUBIK, D. & MOGUEL, Y. 2014. “Transgenic soybean pollen (*Glycine max* L.) in honey from the Yucatán peninsula”, *Scientific Reports*, vol. 4, no. 4022. [Online].
- WAIBLINGER, H., OHMENHAEUSER, M., MEISSNER, S., SCHILLINGER, M., PIESTCH, K., GOERLICH, O., MANKERTZ, J., LIESKE, K. & BROLL, H. 2012. In-house and interlaboratory validation of a method for the extraction of DNA from pollen in honey. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 7, 12.
- WATSON, J. & GILMAN, M. 1997. *Recombinant DNA*, Scientific American Books,
- WEI, D., LITAO, Y., KAILIN, S., BANGHYUN, K., GIJS, K., HANS, M., RONG, G., WANQI, L. & DABING, Z. 2008a. GMDD: a database of GMO detection methods. Basic information. In: SHANGHAI, G. D. L. I. (ed.). Tong University.
- WEI, D., LITAO, Y., KAILIN, S., KIM, B., GIJS, K., HANS, M., WANQI, L. & DABING, Z. 2008b. GMDD: a database of GMO detection methods. MON810.
- WEI, D., LITAO, Y., KAILIN, S., KIM, B., GIJS, K., HANS, M., WANQI, L. & DABING, Z. 2008c. GMDD: a database of GMO detection methods. MON-Ø4Ø32-6.