

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y BIOLÓGICA DE GENES RECOMBINANTES EN MAÍZ CRIOLLO DE OAXACA*

MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT GENES IN MAIZE LANDRACES FROM OAXACA

Dora Alicia Landavazo Gamboa¹, Karla Guadalupe Calvillo Alba¹, Elsa Espinosa Huerta¹, Laura González Morelos¹, Flavio Aragón Cuevas², Irineo Torres Pacheco¹, Salvador Horacio Guzmán Maldonado¹, Víctor Montero Tavera¹ y María Alejandra Mora Avilés^{1*}

¹Unidad de Biotecnología, Campo Experimental Bajío, INIFAP. Km. 6.5 carretera Celaya-San Miguel de Allende. Apartado Postal 112. 38010. Celaya, Guanajuato, México. ²Campo Experimental Valles Centrales de Oaxaca, INIFAP. ³Autora para correspondencia: mora.alejandra@inifap.gob.mx

RESUMEN

Se analizó maíz criollo de tres regiones representativas de producción del estado de Oaxaca (Sierra Norte, Valles Centrales y Costa), con el fin de establecer la presencia de secuencias transgénicas. Las estrategias empleadas fueron: 1) búsqueda del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor por medio de PCR cualitativo, 2) detección inmunológica de la actividad de la enzima fosfinotricin acetil transferasa (PAT) que confiere resistencia a herbicida 3) detección de resistencia a la aplicación de glufosinato en plantas, 4) detección molecular del transgen *bar*, mismo que codifica la proteína fosfinotricin acetil transferasa, 5) determinación del contenido transgénico de las muestras positivas por PCR en tiempo real y 6) secuenciación de las bandas específicas de amplificación. Como resultado de la primera estrategia se detectó la secuencia del promotor 35S en plantas de cinco parcelas de maíz de la Sierra Norte, pertenecientes al distrito de Ixtlán. Este promotor no se detectó en el resto de las muestras colectadas de las regiones Valles Centrales y Costa. La detección inmunológica de la proteína PAT fue negativa en todas las muestras analizadas. De 1435 plantas sometidas a la aplicación de glufosinato, 23 resistieron la actividad del herbicida; sin embargo, ninguna evidenció amplificación del fragmento del transgen *bar*. Las

cinco plantas inicialmente positivas para PCR cualitativo se redujeron a tres muestras positivas por PCR cuantitativo y secuenciación. En conclusión, las muestras amplificadas para el promotor 35S no evidenciaron presencia ni actividad del gen *bar*; sin embargo, podría ser otro el origen del promotor 35S y la naturaleza de la resistencia al glufosinato en los maíces criollos de la Sierra Norte.

Palabras clave: *Zeamays* L., fosfinotricin acetil transferasa, glufosinato de amonio, PCR tiempo real, promotor 35S, virus del mosaico de la coliflor.

ABSTRACT

Maize landraces from three regions: Sierra Norte, Valles Centrales and Costa in the state Oaxaca, were sampled looking for transgenic sequences. The strategies to accomplish this goal were: 1) search for 35S promoter of the cauliflower mosaic virus by qualitative PCR, 2) immunological detection of phosphinotricin acetyl transferase (PAT) enzyme activity, which confers resistance to the herbicides glufosinate, 3) detection of resistant plants to glufosinate, 4) detection

* Recibido: Mayo de 2005

Aceptado: Julio de 2006

of the transgene *bar* by PCR, 5) assessment of transgenic content by quantitative PCR and 6) sequencing of specific amplified fragments. The use of the first technique allowed for the detection of the 35S promoter sequence in plants from five plots from the Sierra Norte region, in the district of Ixtlan. The 35S promoter was not detected in samples from the other two regions. Immunological detection for the phosphinotricin acetyl transferase protein was negative for all samples analyzed. Twenty-three plants out of 1435 were resistant to the herbicide glufosinate; however, none showed amplification of the *bar* transgene. Out of five initial samples only three were confirmed positive for 35S promoter by quantitative PCR and sequencing. The 35S positive samples did not test positive for the *bar* transgen; therefore, the detected 35S promoter sequence might have a different origin as well as the herbicide resistance present in these maize landraces from the region Sierra Norte.

Key words: *Zea mays* L., cauliflower mosaic virus, glufosinate-ammonium, phosphinotricin acetyl transferase, real time PCR, 35S promoter.

INTRODUCCIÓN

México es reconocido como el centro de origen del maíz (*Zea mays* L.). La arqueología demuestra que los restos más antiguos provienen de los estados de Oaxaca y Puebla, donde existe una gran variedad de especies criollas y parientes silvestres (Benz, 2001; Piperno y Flannery, 2001). La diversidad genética del maíz es patrimonio nacional y mundial, y una fuente importante para los programas de mejoramiento genético en este cultivo (FAO, 1995).

La biotecnología ha producido cultivos de maíz modificado genéticamente con la introducción de genes que codifican para resistir a diferentes factores: por ejemplo, los genes *cry* (cristal de proteína insecticida, de *Bacillus thuringiensis*) le confieren resistencia al ataque por lepidópteros; los genes *pat* (fosfinotricin N-acetiltransferasa, de *Streptomyces viridochromogenes*) y *bar* (resistencia a bialafos, de *Streptomyces hygroscopicus*) proveen resistencia a los herbicidas glufosinato, bialafos y fosfinotricina; el gen *cp4 epsps* (3-enol piruvil siquimato 5-fosfato sintasa, de *Agrobacterium tumefaciens*) proporciona resistencia al glifosato (James, 2005). De los materiales de maíz comerciales patentados, 69% poseen resistencia a insectos y a herbicidas simultáneamente: predomina el resistente a

glufosinato, en 60% de los tipos de resistencia a herbicidas y los resistentes a glifosato representan 24% (James, 2005).

Estos maíces modificados se han aprobado y liberado comercialmente en Estados Unidos de América, China, Canadá y Argentina. Sin embargo, en muchos otros países aún existen dudas e inquietudes respecto al riesgo sobre la salud de los seres humanos y animales. Asimismo, preocupan las posibles modificaciones de los ecosistemas al introducir estos organismos, aun cuando no se ha reportado algún efecto dañino. Por lo tanto, es importante establecer si existen maíces modificados en áreas de cultivo en México, para aclarar los temores de su posible riesgo ambiental y de consumo.

En el marco de la moratoria de facto al maíz transgénico, se publicó en el año 2001 un reporte que muestra la presencia de dos secuencias de ADN en la construcción de organismos transgénicos, inexistentes en forma natural en el maíz convencional (Quist y Chapela, 2001). Este reporte provocó mucha incertidumbre y preocupación a nivel internacional, tanto en la comunidad científica como en la sociedad civil, debido al flujo de genes del maíz transgénico hacia los parientes silvestres y maíces criollos. Preocupa, principalmente, que los transgenes del maíz resistente a herbicidas se desplacen hacia la maleza, situación naturalmente indeseable (Altieri, 2002).

Ante este escenario, se analizaron las secuencias del promotor 35S del CaMV y del gen *bar*, así como la expresión y actividad de la proteína PAT, en plantas de maíz tomadas de un número mayor de parcelas de las que se han estudiado a la fecha. Además, se utilizó un mayor número de estrategias de detección, con el objetivo de analizar globalmente la situación actual de la presencia de los genes *pat/bar* y del promotor 35S del CaMV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de Muestreo

Las muestras de maíz criollo se colectaron en las regiones Sierra Norte (Distrito de Ixtlán), Valles Centrales (Distritos de Tlacolula, Ocotlán, Ejutla de Crespo y Etla) y Costa (Distritos de Pochutla, Juquila y Jamiltepec) del estado de Oaxaca, abarcando todas las formas y colores de grano (Cuadro 1).

Cuadro 1. Procedencia del maíz criollo colectado en el estado de Oaxaca.

Región	No. de localidades seleccionadas	No. de parcelas seleccionadas	No. de productores donantes
Costa	22	106	95
Valles Centrales	8	91	83
Sierra Norte	14	162	95
Total	44	309	273

Tipo de Muestreo

En cada región se seleccionaron al menos ocho localidades y en cada una de éstas al menos cuatro parcelas, de las que se colectaron de 10 a 20 mazorcas de maíz. De cada mazorca se desgranó 50% y el grano se concentró por parcela, cuyo tamaño de muestra consistió en la agrupación de 400 semillas seleccionadas arbitrariamente.

Sensibilidad del tamaño de muestra

El grado de sensibilidad del tamaño de muestra se definió con la ecuación:

$$r = (1 - (p/100))^n \times 100$$

donde:

r= Probabilidad de que exista un porcentaje máximo de semillas transgénicas igual a p, aún sin detectar transgenes.

p= Porcentaje de GMO en el lote (0.9%, European Parliament and Council Regulation 1829/2003).

n= Tamaño de muestra [Número de semillas (Dodd, 2002)].

Dado que se seleccionaron 400 granos de maíz por parcela, la ecuación anterior quedó de la siguiente forma: $r = (1 - (0.9/100))^{400} \times 100$. Como resultado se obtuvo un valor de r= 2.7%.

La probabilidad de que exista un porcentaje máximo de semillas transgénicas igual a 0.9% aun si no se detectan transgenes, fue de 2.7%. En otras palabras, existe un nivel de confianza del 97.3% de encontrar 0.9% de semillas transgénicas en las muestras analizadas.

Germinación de semillas y procesamiento de muestras

Las 400 semillas de cada parcela se trataron con una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex ®) al 5% por 10 min, y se lavaron, al menos tres veces, con agua destilada-estéril; para su germinación se colocaron en papel de estraza previamente humedecido con agua destilada-estéril y se depositaron dentro de una bandeja cubierta con plástico en una incubadora a 20-25 °C por tres a cuatro días en oscuridad, hasta el desarrollo del epicótilo.

Los epicótilos se disectaron de los granos germinados y se colocaron en bolsas de malla, distribuidos en tres submuestras de cada parcela. Las bolsas se colocaron sobre hielo, para congelarse posteriormente con nitrógeno líquido. Finalmente, se conservaron en un ultracongelador REVCO a -41 °C hasta su liofilización.

Las muestras congeladas se liofilizaron a 20 milibares de presión y a -48 a -50 °C de temperatura por tres días; después se molieron y se les extrajo el ADN, de acuerdo con la técnica modificada de Dellaporta *et al.* (1983).

Detección molecular del promotor 35S del CaMV

Las mezclas del PCR se prepararon en un volumen de 25 µL, combinando el ADN blanco (150-300 ng/µL), iniciadores (0.2 µM; sentido: 5'-gCACCTACAAATgCCATCA-3', antisentido: 5'-gATAgTggATTgTgCgTCA-3', de PROMEGA, Corp.); dNTP's (0.25 mM), Taq Polimerasa (1.5 U), cloruro de magnesio (2 mM), solución salina reguladora (buffer; 1X), y agua destilada estéril. El fragmento esperado fue de 195 pb.

Como control interno se amplificó la secuencia 16S ribosomal con los iniciadores, sentido: 5'-TgAgAATggATAAgAggCTC-3' y antisentido: 5'-

TgTTgTTCCCCCTCCCAAggg-3' (Rivera-Bustamante¹, comunicación personal). Las concentraciones de los componentes para cada reacción de PCR fueron las mismas que las del promotor 35S. El fragmento esperado fue de 315 pb.

Las reacciones anteriores se amplificaron en un termociclador (Techne, TC-412) bajo las mismas condiciones: desnaturación a 95 °C por 4 min durante un ciclo y 30 ciclos de desnaturación a 95 °C por 1 min, alineamiento a 54 °C por 1 min, y extensión a 72 °C por 1 min; y una extensión final a 72 °C por 7 min durante un ciclo. Los fragmentos amplificados se separaron en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio (5 ng/100 ml), para visualizar el producto de la amplificación.

Bioensayo para la detección de resistencia a fosfinotricina

La selección de muestras para este experimento se basó en los resultados de la detección por PCR del promotor 35S, por lo cual se trabajó con muestras que revelaron indicios de contener dicho promotor.

Se probaron un total de 1435 plantas de cinco parcelas, cuyas semillas se obtuvieron de las mazorcas desgranadas de origen, y 50 controles positivos que consistieron en 50 semillas T3, producto de dos retrocruzadas parentales transformadas con el promotor 35S y el transgen *bar*. Además, se probaron 20 controles negativos de maíz híbrido de Michoacán y 20 controles negativos de maíz de la Sierra Norte.

Las semillas se colocaron en una cámara de crecimiento sobre bandejas germinadoras, usando, para germinación, el sustrato Sunshine No. 3® a 25±1 °C; las plántulas se sometieron a un fotoperíodo de 12 h luz-12 h oscuridad e iluminación de 20 000 luxes, después de 15 días, se trasplantaron a vasos de 355 ml, y se trasladaron a un invernadero con medidas de bioseguridad de nivel 1 (Traynor *et al.*, 2001) y mantenidas a 30-32 °C, hasta obtener plantas con cuatro hojas verdaderas. La solución de fosfinotricina (BASTA®) se aplicó a una hoja por planta, mediante un hisopo que absorbió un volumen aproximado de 130 µL de una solución, con una concentración de 0.75% (De la Fuente², comunicación personal). El hisopo se frotó tres veces a lo largo de la hoja, dentro de un área de 5 cm entre dos líneas delimitadas con un marcador. Los resultados se

evaluaron diariamente durante 15 días. Se analizó el área marcada con base en seis niveles de daño (0, 5, 25, 50, 75 y 100%), en función del grado de avance de toxicidad en el tejido del control negativo susceptible a fosfinotricina. Después 24 h de la inoculación, se inició una observación (considerada día 1) del nivel de daño sobre las hojas inoculadas con fosfinotricina. A partir de la aplicación del herbicida se realizaron tres mediciones cada tres días, por un período de 15 días.

Detección del transgen *bar* por PCR

Las muestras sometidas a este análisis provinieron de las plantas resistentes a la fosfinitosina en el bioensayo. La secuencia del transgen *bar* se detectó con iniciadores *bar1* (sentido: 5'-TgCACCATCgTCAACCACTA-3') y *bar2* (antisentido: 5'-CACgCgACCACgCTCTTgAA-3') (Spangenberg *et al.*, 1994), y los iniciadores *patjv1* (Sentido: 5'-CAGgAACCGCAGgAgTggA-3') y *patjv2* (antisentido: 5'-CCAgAAACCCACgTCATgCC-3') (Vickers *et al.*, 1996). Las concentraciones del resto de los componentes de la reacción de amplificación del gen *bar* fueron similares a las empleadas para amplificar el promotor 35S. El tamaño de fragmento esperado para cada par de iniciadores fue de 310 pb y 372 pb, respectivamente. Las condiciones de amplificación para ambos pares de iniciadores fueron: desnaturación inicial a 95 °C por 2 min durante 1 ciclo; 30 ciclos de desnaturación a 95 °C por 45 seg, alineamiento a 58 °C por 30 seg y extensión a 72 °C por 1 min y una extensión final de un ciclo a 72 °C por 7 min. Los productos de las reacciones de amplificación fueron corridas en geles de agarosa a 2% con TBE 1X teñidos con bromuro de etidio.

Detección inmunológica de la actividad de la enzima PAT

Se empleó el paquete comercial Trait LL Lateral Flow (Strategic Diagnostics Inc.), para detectar la expresión de la proteína PAT producida por los genes *bary* y *pat* derivados de *S. hygroscopicus* y *S. viridochromogenes*, respectivamente. Se molieron 400 semillas por muestra y se tomaron 10 g de polvo. Cada muestra se colocó en pequeños recipientes y se agregaron 10 ml de buffer del kit; se introdujo una tira reactiva y se incubó a temperatura ambiente por 10-15 min. Transcurrido el tiempo, se verificó la presencia de la banda de prueba que indica el resultado positivo.

¹Rivera-Bustamante, R. CINVESTAV-Campus Irapuato.

²De la Fuente, J. M., Monsanto-México

Contenido transgénico por PCR en tiempo real

Muestras, iniciadores y sondas. Se utilizó el mismo ADN empleado para los análisis por PCR cualitativo. Los iniciadores y sonda del gen 35S se diseñaron en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Unidad de Biotecnología del Bajío del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Los iniciadores sentido fueron: MORASEQ SF (5'-gACAgTggTCCCAAAGATggA-3') y antisentido MORASEQ SR (5'-TgCTTgAAgACgTggTTggAA-3'), y la sonda MORASEQ SM1 FAM 5'-CCCACgAggAgCATC-3' 5NFQ marcada con el fluoróforo FAM en su extremo 3' y el apagador NFQ (non fluorescent quencher) en su extremo 5'.

El control interno (18S) pertenece a un kit, prediseñado por Applied Biosystems (Applied Biosystems Lincoln, USA) marcado con el fluoróforo VIC y el terminador NFQ. Las reacciones se amplificaron en un volumen total de 25 μ l (2.5 μ l de sonda, 0.25 μ M) y oligos (2.0 μ l, 0.9 μ M), 12.5 μ l de Master Mix (Taq DNA polimerasa, dNTP's y buffer; Applied Biosystems Lincoln, USA) y de ADN (25 ng). Cada reacción de amplificación para el promotor 35S y el gen 18S se desarrolló por separado (single) y en forma conjunta (multiplex).

Se generó una curva estándar de calibración para determinar el umbral crítico Ct de detección, utilizando concentraciones de ADN conocido, correspondiente al maíz MON 810 en concentraciones de 0, 0.1, 0.5, 1, 2 y 5% de contenido transgénico (IRMM 413; Institute for Reference Materials and Measurements, Fluka). Las condiciones de amplificación se desnaturalizaron inicialmente a 94 °C por 9 min, posteriormente a 95 °C durante 20 seg, alineación a 60 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 30 seg durante 40 ciclos (PCR tiempo real Applied Biosystems 7000). El promedio de los valores Δ Ct se calcularon para determinar el porcentaje de contenido transgénico de cada muestra. Los valores comparativos de Ct ($\Delta\Delta$ Ct) se calcularon restando los valores Δ Ct del gen endógeno marcado con el fluoróforo VIC a los valores Δ Ct del transgen marcado con el fluoróforo FAM. Los datos se analizaron calculando el logaritmo de la tendencia de los valores $\Delta\Delta$ Ct (calculada con el método de mínimos cuadrados) con respecto a los valores de los estándares definidos y analizados previamente.

Clonación y secuenciación de fragmento amplificado

Se purificaron tres fragmentos amplificados a partir de las bandas aisladas de agarosa, con el kit de extracción QIAquick (QIAGEN Inc. CA, USA). La concentración de estos productos se cuantificó mediante fluorómetro (Minifluorometer, TBS-380 TURNER Biosystems, Inc.), utilizando el kit de medición PicoGreen (Molecular Probes ds DNA Quantitation Reagent and Kits, USA).

El ADN purificado fue precipitado (NaOAc 3M y etanol absoluto) para eliminar trazas de dNTP's e iniciadores. Los controles de amplificación fueron los plásmidos pCAMBIA y pUC. El fragmento amplificado se clonó en el vector pGEM®-T Easy Vector Systems (PROMEGA, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los posibles transformantes se seleccionaron en medio LB, adicionado con ampicilina (100mg/l), IPTG (0.5 mM), X-Gal (40 μ g/ml). En un proceso aleatorio se seleccionó un total de 158 colonias, en su mayoría bacterias blancas, que indican una transformación positiva.

La transformación se verificó mediante amplificación del fragmento insertado en el vector. Se realizó una lisis bacteriana en 50 μ l de agua desionizada estéril, se administró choque térmico en termobaño a 95 °C por 10 min y posteriormente se colocó la muestra en hielo por otros 10 min. Se tomaron 3 μ l de muestra para la verificación por amplificación, empleando los iniciadores de PROMEGA.

De la amplificación se definieron las colonias que dieron positivo para el fragmento de interés, de ellas se extrajeron los plásmidos mediante la técnica de minipreps (Qiagen Spin Miniprep QIAGEN, USA), siguiendo el protocolo de extracción. La calidad de los plásmidos se visualizó en un gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X y se cuantificaron con el fluorómetro.

Se seleccionaron tres muestras para secuenciarse (dos controles positivos pCAMBIA y pUC y un producto de PCR purificado contenido el fragmento 35S) mediante la reacción de PCR, en base a los protocolos de iniciadores marcados de Sequi Therm EXCEL™ (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA). Los productos del PCR anterior se amplificaron a partir de 400 fmoles del

vector pGEM®-T, conteniendo el fragmento 35S de 195 pb, utilizando 1.5 pmoles de iniciadores universales M13 (-29) sentido (5'-CACgACgTTgTAAACgAC-3') y M13 antisentido (5'-ggATAACAAATTTCACACAGgg-3') marcados con fluoróforos infrarrojos por los canales de 795 nm (IRD800 heptametino alanina) y 685 nm (IRD 700 pentametino carbocianina), respectivamente, desarrollados por Li-cor (Li-cor Lincoln, USA). El programa de amplificación consistió en un ciclo inicial de desnaturación de 92 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 92 °C de desnaturación por 30 seg, 54 °C por 30 seg de alineamiento específico de los iniciadores y 70 °C por 1 min de extensión. Finalmente, las reacciones se mantuvieron a 4 °C para conservar estable la reacción.

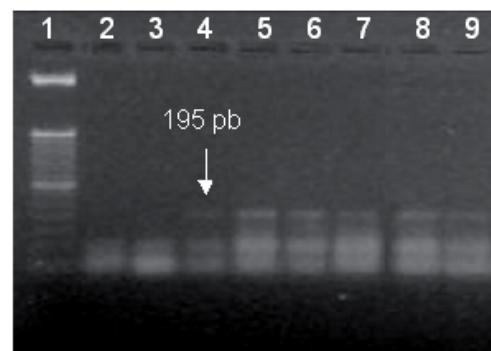
La reacción de secuenciación se analizó directamente con el secuenciador automático de ADN Li-cor Global Edition IR² System Modelo 4200 (Li-cor Inc., Lincoln, USA), a través de la secuenciación simultánea bidireccional previamente desnaturizada a 95 °C por 3 min, con 3 µl de amortiguador de carga a base de formamida, y colocados en el sistema de gel vertical de 41 cm de poliacrilamida KB plus 5.5% y 1X TBE KB plus [0.89 M Tris base, 0.89 M ácido bórico, 0.02 M EDTA, agua desionizada (18 MΩ) pH 8.3] de Li-cor a 55 °C y 1200 voltios.

Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa e-Seq 3.0.9 (DNA Sequencing and Analysis Software, Copyright 1999-2003, Li-cor Inc., Michigan Technology University), las cuales finalmente se compararon con secuencias conocidas y reportadas en la base de datos NCBI mediante Blast (Altschul *et al.*, 1997) y Blast 2 sequences (Tatusova y Madden, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Detección del promotor 35S del CaMV por PCR. En cinco parcelas de la Sierra Norte (SN-18, SN-28, SN-30, SN-70 y SN-153) se identificaron plantas que mostraron evidencia de amplificación del promotor 35S, mediante la técnica de PCR, obteniéndose un fragmento esperado de 195 pb (Figura 1). Por otro lado, en ninguna de las parcelas de las regiones Valles Centrales ni Costa se amplificó la secuencia del promotor de las plantas analizadas. Las muestras positivas representan 3.1 del número total de parcelas analizadas de la región Sierra Norte. Asimismo, representan 1.62% de las regiones Sierra Norte, Valles Centrales y Costa con un nivel de confianza de 97.3%.



Carril 1= Escalera de 50 pb; Carril 2= Control negativo sin ADN con componentes de la reacción; Carril 3= Control negativo con ADN de maíz no modificado genéticamente con componentes de la reacción; Carril 4= Control positivo; Carriles 5-9= Plantas de parcelas (SN-18, SN-28, SN-30, SN-70 y SN-153 respectivamente).

Figura 1. Productos de amplificación para el fragmento 35S del CaMV visualizados en gel de agarosa a 2%.

El fragmento de 315 pb de la secuencia 16S ribosomal, usado como control interno, se amplificó con plantas de todas las parcelas, demostrando que el protocolo de amplificación se realizó eficientemente (datos no mostrados).

Detección inmunológica de la actividad de la enzima PAT. La detección de la expresión de la proteína fosfinotricin acetil transferasa (PAT) por medio de tiras de flujo lateral, resultó negativa para las plantas de todas las parcelas de las tres regiones sometidas a esta prueba (datos no mostrados).

Detección de resistencia a fosfinotricina: bioensayo. La observación de daño de las plantas indicó que al tercer día entre 65 y 93% de las plantas presentaron 25% de daño (Figura 2). Al sexto día, del 89 al 98% de las plantas estaban totalmente cloróticas en el área marcada en las hojas; para el noveno día, del 93 al 99.4% de las plantas mostraban daño en 100% de la superficie de la hoja inoculada; el día 12, 98.4% las plantas mostraron toxicidad en 100% de la planta y para el día 15, habían muerto todas las plantas que mostraron alto nivel de toxicidad (98.4%).

El nivel de daño ocasionado por el herbicida indica que la muestra SN-18 presentó una incipiente resistencia al herbicida durante los primeros tres días del bioensayo; sin embargo, a partir del día seis se aproximó a la media de respuesta del resto de las muestras (Figura 3). Sólo 23 plantas que representan a las cinco parcelas, resistieron la acción del herbicida sin ningún síntoma de toxicidad.

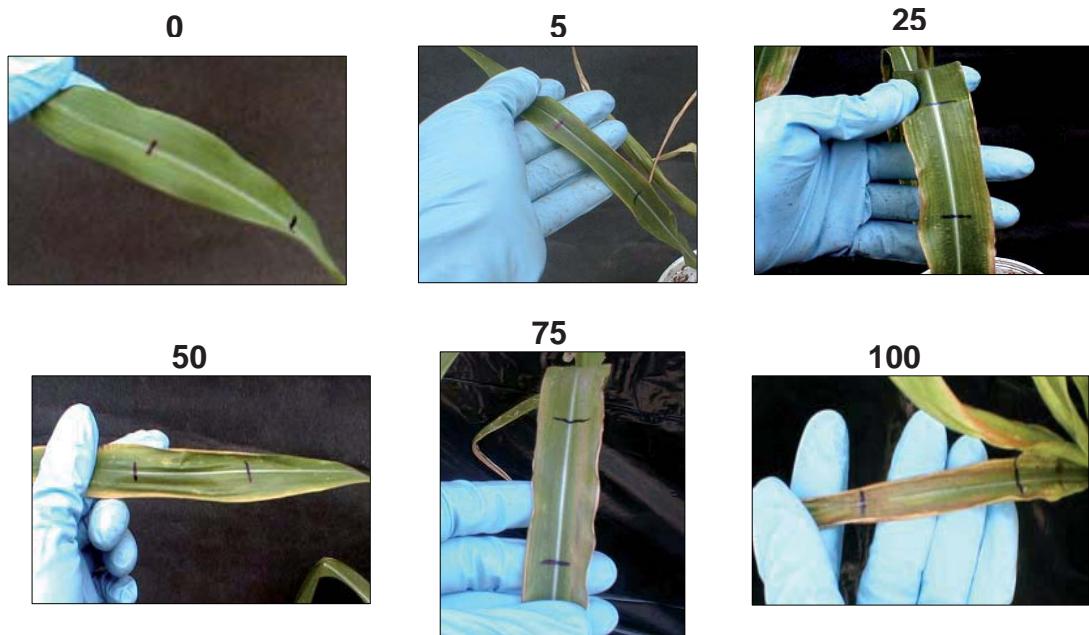


Figura 2. Porcentaje de avance de daño en hoja de maíz en planta control susceptible a fosfinotricina inoculada con 0.75% de BASTA®.

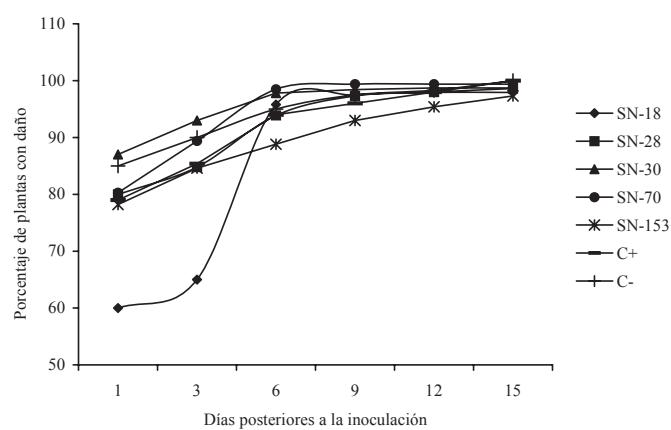


Figura 3. Porcentaje de daño en plantas de maíz de la Sierra Norte (SN) de Oaxaca inoculadas con fosfinotricina a lo largo de los 15 días de duración del bioensayo (positivas en la amplificación del CaMV 35S) y de plantas control con y sin el gen bar.

Los controles negativos exhibieron daño en la misma proporción que las plantas bajo estudio. Los daños y número de plantas afectadas cayeron dentro del margen esperado. En el caso de los controles positivos, el número

de plantas dañadas también estuvo dentro del rango de los controles negativos y de las muestras. Ninguna de las plantas utilizadas como control positivo sobrevivió, lo cual impidió compararlas con las plantas resistentes.

Detección del transgen bar por PCR. Se analizó el ADN extraído de las 23 plantas que resistieron el efecto del herbicida fosfinotricina en el experimento anterior. Los resultados de la amplificación con los iniciadores *pat1v1-pat1v2* y *bar1-bar2*, fueron negativos para todas las plantas; ninguna de las 23 presentó las bandas esperadas de 375 pb y 310 pb, respectivamente, las que se observaron en el control positivo (Cuadro 2).

PCR en tiempo real. Se realizó un rango dinámico de la concentración del control positivo para determinar la curva estándar y definir el rango de detección confiable y consistente. El rango dinámico consistió en cuatro diluciones seriales de ADN, manejadas al 50% en cada etapa. El rango dinámico para el gen 35S y el gen 18S muestran una alta eficiencia, de acuerdo a las curvas de cada concentración en las que en puntos equidistantes y paralelos se duplica la concentración de ADN de una dilución (Figura 4). La curva estándar define el umbral de detección (C_t), donde se observa una relación lineal entre los productos de PCR y la concentración de ADN durante la fase exponencial (Figura 5). La correlación del 98.5%, proporcionada en este análisis,

Cuadro 2. Resultados de los diferentes métodos de detección de los eventos transgénicos del promotor 35S del CaMV y del gen/proteína bar/PAT.

Parcela	Comunidad	Detección proteína PAT	Núm. de plantas resistentes a Fosfinotricina	bar (PCR)	35S (PCR)	% Contenido transgénico PCR tiempo real
SN-18	La Nevería					
	17° 07' 30'' LN, 96° 31'49'' LW	-	5(2.1)°	-	+	0.00000000143
SN-28	Latuvi					
	17° 11' 01'' LN, 96° 30' 46'' LW	-	4(1.4)	-	+	0.00000023
SN-30	Latuvi					
	17° 11' 46'' LN, 96° 30' 48'' LW	-	4(1.3)	-	+	0.000016
SN-70	Santiago Comaltepec					
	17° 33' 54'' LN 96° 32' 54'' LW	-	2(0.61)	-	+	0.000012
SN-153	Santiago Xiacui					
	17° 17' 25'' LN, 96° 25' 11'' LW	-	8(2.9)	-	+	1.038404
Control positivo	N/A	-	0(0.0)	+	+	1, 2 y 5
Control negativo	N/A	-	0(0.0)	-	-	-

N/A= No aplica; += Resultado positivo; -= Resultado negativo; °= Porcentaje de plantas resistentes a glufosinato, con respecto a la población total evaluada.

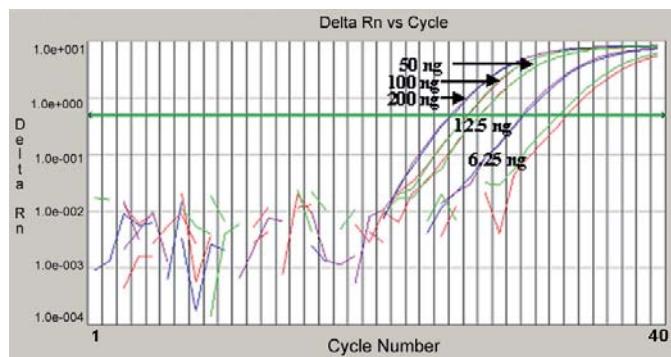
indica que es posible detectar organismos genéticamente modificados en un rango entre 100ng y 12.5ng de ADN inicial.

Los estándares de referencia se ajustaron a 12.5 ng. Los estándares de contenido transgénico de 0.1 y 0.5% fueron inconsistentes en su amplificación, por lo que se desecharon en los siguientes análisis.

Únicamente se analizaron los estándares representados por las plantas que contenían 1, 2 y 5% de contenido transgénico.

El patrón de comportamiento de las curvas de amplificación en cada caso corresponde a una distancia equivalente a un ciclo, definiéndose como el doble de contenido transgénico en cada caso (2n). En todos los casos, el control interno amplificó (datos no mostrados).

Las plantas de tres parcelas del distrito de Ixtlán (Figura 6 y Cuadro 2), amplificaron el fragmento 35S, correspondientes a SN-153 de la localidad de Santiago Xiacui, SN-30 de la localidad de Latuvi y SN-70 de la localidad de Santiago



Cada barra vertical tiene un número consecutivo del 1 al 40.

Figura 4. Rango de detección de amplificación del promotor 35S.

Comaltepec. Todas las muestras amplificaron el gen 18S (datos no mostrados).

Secuenciación de fragmento amplificado. De las tres secuencias analizadas, dos coincidieron con la secuencia del vector pGem7ZF, una correspondió en 100% a la secuencia del promotor 35S del CaMV en ambas secuenciaciones (700 y 800 nm). La secuencia correspondiente al 35S tuvo alta similitud con la p35S-GFP (NCBI U28417) en 95%, evidenciando la presencia del promotor 35S en el maíz de la muestra SN-30, correspondiente a la Sierra Norte de Oaxaca.

De 354 nucleótidos de la secuencia (NCBI X04879) del promotor reportada por Sanders *et al.* (1987), hubo similitud al 100% en la secuencia amplificada en el material de maíz SN-30 (Figura 7).

Discusión

Todas las muestras evidentes del promotor 35S del CaMV provienen del distrito de Ixtlán de la región Sierra Norte del estado de Oaxaca, resultado concordante con el estudio realizado por Quist y Chapela (2001), quienes reportaron la presencia del promotor 35S en el mismo estado. El muestreo en cada una de las parcelas es un sistema eficiente para detectar introgresiones del promotor 35S a los materiales criollos de maíz. El grado de sensibilidad en el muestreo, indica que el tamaño de muestra fue suficiente tanto para manipular apropiadamente un número sustancial de muestras, como para asegurar un nivel de confianza hasta ahora sin reportar en los análisis publicados.

En conjunto, las muestras SN-18, SN-28, SN-30, SN-70 y SN-153 representan 3.1 del número total de las analizadas

en la región Sierra Norte, evidencia contrastante con los datos del reporte preliminar de Herrera *et al.* (2002), donde se revelan 13 parcelas positivas (44%) con el promotor 35S, de un análisis de 29 parcelas en el estado de Oaxaca.

Es importante resaltar que las frecuencias transgénicas (el número de muestras positivas y el contenido transgénico) son bajas, ya que el porcentaje de parcelas positivas es reducido, sin detectar inmigración en parcelas vecinas. La baja incidencia del promotor 35S puede deberse a varias causas, entre las que destacan: a) las plantas híbridas (con introgresión) tienen baja adaptación a las condiciones ambientales de la región, b) una posible asincronía en los períodos de floración, limitando así la posibilidad del cruzamiento entre la planta transgénica y el criollo, o c) la introgresión puede encontrarse en etapa temprana, por lo que su distribución aún sería limitada.

Las evidencias en los análisis por PCR en tiempo real y secuenciación del promotor 35S, sugieren que la introducción de transgenes proviene de la mezcla de grano a las parcelas y no por polinización libre, en cuyo caso se esperaría un número mayor de parcelas positivas en las localidades a las cuales pertenecen. El promotor 35S resultó inexistente en todas las parcelas de las localidades pertenecientes a las regiones Valles Centrales y Costa.

La ausencia de amplificación de la secuencia del gen *bar* en las plantas resistentes a fosfinotricina, y de la actividad proteica de la enzima PAT, descarta la hipótesis de la resistencia de las plantas por el transgen *'bar'*. Esta prueba puede eliminar las teorías del silenciamiento del gen *bar* (Matzke y Matzke, 1995; Baulcombe, 1996; Depickery Van Montangu, 1997) o de la baja expresión de la proteína que impidiera detectar su actividad. Una posible explicación de la resistencia a fosfinotricina en las 23 plantas, es la resistencia natural, tomando en cuenta la amplia diversidad genética del maíz en el estado de Oaxaca.

Con este estudio se descarta la presencia del transgen *bar*; sin embargo, puede haber otros transgenes diferentes como los de la delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* (*cry*), para la resistencia a insectos. Otro evento a detectar en maíz es la presencia del gen *cp4 epsps* que confiere resistencia al herbicida glifosato; aunque con mucha menor incidencia en los productos biotecnológicos comerciales de maíz. Además, en el análisis realizado por Herrera *et al.* (2002), se reportó sin ningún evento *cp4 epsps*.

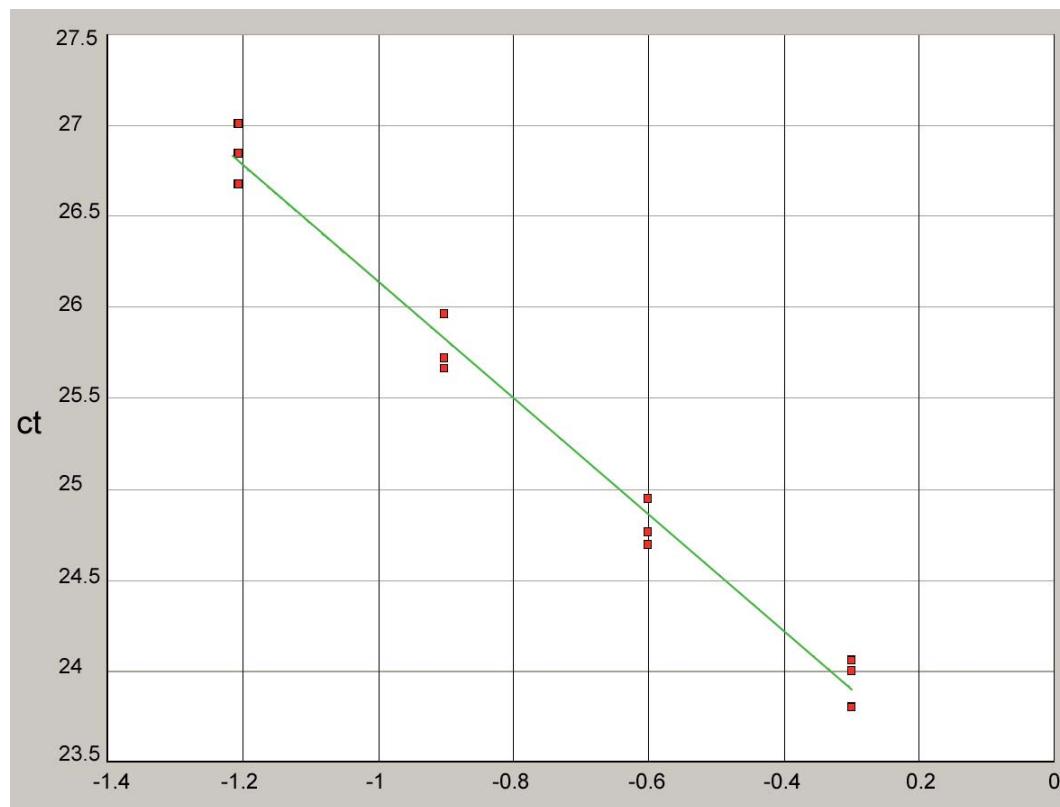
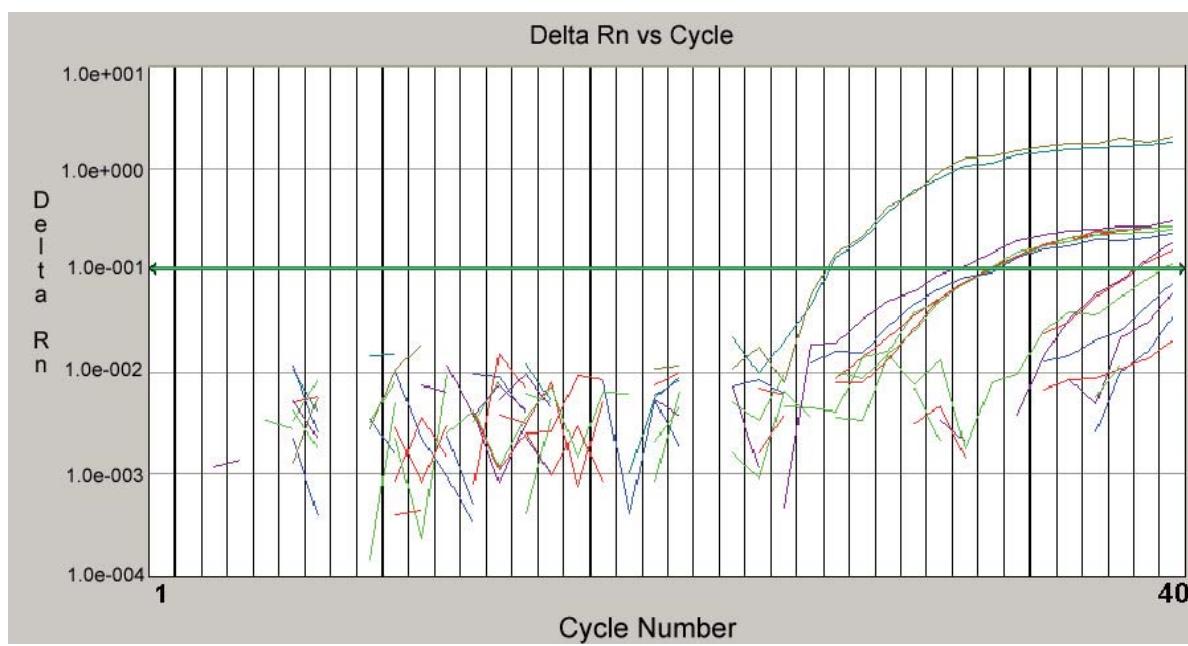


Figura 5. Curva estándar para el promotor 35S del CaMV, muestra el log de referencias de maíz MON 810, con cantidades conocidas de contenido transgénico versus el umbral Ct, con datos de Figura 4.



Cada barra vertical tiene un número consecutivo del 1 al 40.

Figura 6. Amplificación del promotor 35S de muestras de plantas de maíz. Muestra SN-153 ubica su Ct en el ciclo 26, en tanto que las muestras SN-30 y SN-70 amplificaron en el ciclo 32.

a)

X04879:	58
ctacaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgtaagatgcctctgccacag	117
S.I.:	9
ctacaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcgtaagatgcctctgccacag	68
X04879:	118
tggtcccaaagatggaccccccacccacgaggagcatcgtaaaaaagaagacgttccaac	177
S.I.:	69
tggtcccaaagatggaccccccacccacgaggagcatcgtaaaaaagaagacgttccaac	128
X04879:	178
cacgtttcaaagcaagtggattgtgatatctccactgacgtaaggatgacgcaca	237
S.I.:	129
cacgtttcaaagcaagtggattgtgatatctccactgacgtaaggatgacgcaca	188
X04879: 238 atcccactatac 248	
S.I.: 189 atcccactatac 199	

b)

```

1 gaattcccgta tcctatctgt cacttcatca aaaggacagt agaaaaggaa ggtggcacta
61 caaatgccat cattgcgata aaggaaaggc tatcgtaa gatgcctcg ccgacagtgg
121 tcccaaagat ggaccccccac ccacgaggag catcgtaaaaaaaagaagacg ttccaaaccac
181 gtcttcaaag caagtggatt gatgtgatat ctccactgac gtaaggatg acgcacaatc
241 ccactatct tcgcaagacc ctcccttat ataaggaaatg tcatttcatt tggagaggac
301 acgtaaat caccagtctc tcttacaag atctctagac gatcgttcg catg

```

Figura 7. a) Alineación de la secuencia amplificada de plantas de la muestra SN-30, con la secuencia del promotor 35S de CaMV en pMON 273, vector 3 [NCBI X04879; Sanders *et al.*, (1987)]; Score= 367 bits (191); Esperado= 8e-99; Idéntico= 191/191 (100%); Cadena= Sentido/Sentido. b) La secuencia sombreada corresponde al 100% de similitud con la secuencia amplificada. Los iniciadores se muestran subrayados.

Los resultados de PCR cuantitativo reducen a tres las muestras positivas de las cinco originalmente obtenidas por PCR. La inconsistencia en resultados de PCR cualitativo y PCR cuantitativo demuestran que, la detección por la técnica de PCR cualitativo no necesariamente proporciona resultados fiables respecto a las muestras positivas. Es claro que amplicones no específicos pueden reducirse eventualmente; sin embargo, también representa una fuente

de falsos positivos indeseables en detecciones puntuales. La ventaja del análisis por PCR en tiempo real es la inclusión de una sonda específica, la cual incrementa la precisión en la detección.

La verificación de las muestras positivas mediante secuenciación, valida los resultados de amplificación por PCR y PCR en tiempo real en las muestras SN-30, SN-70 y

SN-153. La elevada identidad de las secuencias obtenidas y comparadas con bases de datos de secuencias reportadas para el promotor 35S, confiere la presencia de este promotor en el genoma de maíz en dos parcelas a niveles de introgresión menor al 1% (una semilla de cada 100 tiene el promotor 35S).

Respecto a la posible persistencia de los elementos de introgresión detectados, es importante destacar su permanencia o incremento de su frecuencia en selección positiva, es decir, la asociación de estos genes con otros genes nativos que confieren características seleccionadas por el agricultor, la aplicación de herbicidas o bien la resistencia a plagas. Sin embargo, en la región Sierra Norte no se reporta la aplicación de estos químicos o la presencia de plagas como el gusano barrenador del tallo o algún otro lepidóptero plaga considerado blanco de la toxina Bt, por lo que el material estaría libre a una selección que representara desventaja para los materiales criollos nativos, disminuyendo así la frecuencia del transgen hasta desaparecer. Es importante considerar que, dada la diversidad del maíz criollo, se han detectado genes que de manera natural codifican para la resistencia a glufosinato, como lo demuestran los resultados del bioensayo. Probablemente existen maíces criollos con resistencia natural, sin detectar por falta de selección. Por lo tanto, si hubiera un maíz transgénico resistente a herbicidas en la misma zona donde se encuentra un maíz con resistencia natural a herbicidas, ambos podrían coexistir sin ninguna alteración a la diversidad genética.

Respecto a la preocupación de la seguridad para el consumo, se han desarrollado protocolos de evaluación previos a la aprobación del cultivo comercial de maíz genéticamente modificado. Los protocolos contemplan análisis de alergenicidad y toxicidad de la nueva proteína sintetizada. En ninguno de los casos estudiados hasta ahora, relacionados con las proteínas PAT, se ha reportado un efecto tóxico. Tampoco se ha presentado algún cuadro alergénico en consumidores humanos (Ash *et al.*, 2000; Khumniridpetch *et al.*, 2001; Klotz *et al.*, 2002). Por lo tanto, con respecto a la inocuidad alimentaria, como se reportó, es improbable el riesgo en el consumo de maíz con la proteína PAT.

Finalmente, queda abierta la posibilidad de encontrar otros eventos transgénicos; sin embargo, la pregunta más importante es: ¿Cuál es la posibilidad de que esto ocurra y sus consecuencias? posteriormente, ¿Estas consecuencias son un riesgo real y científicamente avalado? Los esfuerzos deben orientarse en el análisis de posibles riesgos de la introgresión en especies de países de origen.

CONCLUSIONES

Existe evidencia de la presencia del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor en plantas de maíz de tres parcelas de la región Sierra Norte de Oaxaca. La base para detectarlo fue la vinculación del promotor 35S con construcciones transgénicas, ya que lo contienen la mayoría de los materiales comerciales de maíz genéticamente modificados. El número de parcelas positivas, así como el porcentaje de contenido transgénico (en relación a las referencias internacionales) fue bajo, por lo que se infiere que el tiempo en el que ocurrió la introgresión es reciente. Si bien se desconoce con toda certeza la existencia de transgenes específicos, la evidencia para encontrar el gen *bar*, que confiere resistencia al herbicida fosfinotricina, está ausente en las muestras obtenidas o no fue posible detectarlo con los diferentes métodos ensayados.

LITERATURA CITADA

- Altieri, M. A. 2002. Aspectos socioculturales de la diversidad del maíz nativo. Departamento de Ciencias Políticas y Gestión del Medio Ambiente, Universidad de California. www.cec.org/files/pdf//altieri-s.pdf
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. and Lipman, D. J. 1997. GappedBLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.
- Ash, J. A.; Sceideler, E. and Novak, C. L. 2000. The fate of genetically modified protein from Roundup Ready soybeans in the laying hen. *Poultry Sci.* 79 (Suppl.1), 26.
- Baulcombe, D. C. 1996. RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 32:79-88.
- Benz, B. F. 2001. Archeological evidence of teosinte domestication from Guilá Naquitz, Oaxaca. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:2104-2106.
- Dellaporta, S. L.; Wood, J. and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA minipreparation. Version II. *Plant. Mol. Biol. Repr.* 1:19-21.
- Depicker, A. and Van Montagu, M. 1997. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:373-382.
- Dodd, D. 2002. When zero is not zero. www.psrcorn.com/zeronotzero.htm

- European Parliament and Council Regulation 1829/2003. REGULATION(EC) No 1829/2003 of the european parliament and of the council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. Official Journal of the European Union 18.10.2003.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 1995. Conferencia técnica internacional de la FAO sobre los recursos fitogenéticos. Conservación y utilización sostenible de los recursos fitogenéticos en América Central y México. Informe síntesis regional. San José, Costa Rica, 57 p.
- Herrera L. A.; Joffre y G., A.; Álvarez, M. A.; Huerta, E.; Arriaga, L.; Soberón, J.; Ortiz, S.; Aldama, A.; Coto, M. A.; Serratos, J. A. 2002. Primer informe sobre análisis de la presencia de maíz transgénico en Oaxaca y Puebla. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación/ Dirección General de Sanidad Vegetal/Comité Intersecretarial de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. No publicado, 20 p.
- James, C. 2005. Global status of commercialized biotech/ GM Crops: 2005. ISAAA Briefs No. 34. ISAAA: Ithaca, N. Y., USA., 11 p.
- Khumnirdpatch, V.; Intarachote, U.; Treemance, S.; Tragoonroong, S. and Thummabood, S. 2001. Detection of GMOs in the broilers that utilized genetically modified soybean meals as a feed ingredient. Plant & Animal Genome IX Conference, January 2001, San Diego, USA. (Poster 585).
- Klotz, A.; Mayer, J. and Einspanier, R. 2002. Degradation and possible carry over of feed DNA monitored in pigs and poultry. Eur. Food Res. Technol. 214: 271-275.
- Matzke, M. A. and Matzke, A. J. M. 1995. How and why do plants inactivate homologous (Trans)genes? Plant Physiol. 107:679-685.
- Piperno, D. R. and Flannery, K. V. 2001. The earliest archeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: New accelerator mass spectrometry dates and their implications. Proc. Natl. Acad. Sci. 98:2101-2103.
- Quist, D. and Chapela, I. 2001. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. Nature 29:541-543.
- Sanders, P. R.; Winter, J. A.; Barnason, A. R.; Rogers, S. G. and Fraley, R. T. 1987. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. Nucl. Acids Res. 15:1543-1558.
- Spangenberg, G.; Wang, Z.Y.; Nagel, J., and Potrykus, I. 1994. Protoplast culture and generation of transgenic plants in red fescue (*Festuca rubra* L.). Plant Sci. 97:83-94.
- Tatusova, T.A. and Madden, T. L. 1999. BLAST2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. FEMS Microbiol. Lett. 174:247-250.
- Traynor, P. L., Adair, D. and Irwin, R. 2001. Greenhouse research with transgenic plants and microbes: A practical guide to containment. Information Systems for Biotechnology. Virginia Tech. Blacksburg VA, USA. 59 p.
- Vickers, J. E.; Graham, G. C. and Henry, R. J. 1996. A protocol for the efficient screening of putatively transformed plants for *bar*, the selectable marker gene, using the polymerase chain reaction. Plant Molecular Biology Reporter 14:363-368.