

PROPUESTA DE COTEJO DE IMPACTO DE LA ACUMULACIÓN DE TRANSGENES EN EL MAÍZ (*Zea mays* L.) NATIVO MEXICANO

EVALUATION PROPOSAL OF POSSIBLE IMPACT OF TRANSGENE ACCUMULATION IN MEXICAN MAIZE LANDRACES

Antonio Turrent-Fernández^{1*}, J. Antonio Serratos-Hernández², Hugo Mejía-Andrade¹, Alejandro Espinosa-Calderón¹

¹Campo Experimental Valle de México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km 18.5, Carretera Los Reyes-Lechería, 53200, Texcoco, Estado de México. (aturrent@att.net.mx). ²Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Coordinación Académica, Avenida División del Norte, No. 906, Colonia Narvarte, Delegación Benito Juárez, México. D.F.

RESUMEN

La liberación del cultivo de maíz genéticamente modificado (MGM) a escala comercial en México, involucra potencialmente la interacción genética entre más de 30 eventos transgénicos independientes (probablemente más de 30 *loci* transgénicos diferentes) y más de 50 razas nativas de maíz (RNM) en el campo mexicano. Aunque la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) y su reglamento establecen el supuesto de que el control del polen permite minimizar la interacción genética entre ambos maíces, es posible que la vía alterna “semilla-polen”, no prevista en esa ley, contravenga el realismo del supuesto. El status actual de la tecnología del ADN recombinante no permite predeterminar el *locus* transgénico de cada transformación, por lo que los más de 30 *loci* transgénicos independientes del mercado de semillas estarían dispersos en el espacio cromosómico. Esto es causa central de la acumulación de transgenes en las RNM, cuando los MGM y las RNM interactúan genéticamente, con efectos que se desconocen. En este ensayo se propone el cotejo de la hipótesis de un umbral deletéreo de acumulación de transgenes en cada RNM. Se discute el impacto de 10 ciclos de cruzamientos entre las RNM y 32 o más híbridos transgénicos, para obtener poblaciones con individuos que acumulen cargas transgénicas desde cero hasta 32 o más. Además se discute la evaluación biológica, agronómica y molecular de los genotipos estudiados.

Palabras clave: Acumulación de transgenes en los maíces nativos, maíz genéticamente modificado, razas nativas de maíz.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de seguridad alimentaria y los avances tecnológicos que promete la biotecnología moderna, explican la proclividad del Estado Mexicano por adoptar al maíz transgénico, a pesar del carácter *sui generis* de México, por ser centro de origen

ABSTRACT

The liberation of genetically modified maize (GMM) on commercial scale in México, potentially involves the genetic interaction among over 30 independent transgenic events (probably more than 30 different transgenic *loci*) and more than 50 Mexican maize landraces (MML) in Mexican farmlands. Although the Law of Biosecurity of Genetically Modified Organisms (LBGMO) and its Norms establish the assumption that the control of pollen makes it possible to minimize the genetic interaction between the two maizes, it is possible that the “seed-pollen” alternative, not foreseen in this law, contradicts the realism of this assumption. The present status of recombinant DNA technology does not allow the predetermination of the transgenic *locus* of each transformation, thus the more than 30 independent transgenic *loci* of the seed market would be dispersed in the chromosomal space. This is the central cause of transgene accumulation in the MML, when the GMM and the MML interact genetically, with effects that still unknown. This assay proposes a test of the hypothesis of a damage deleterious threshold of transgene accumulation in each MML. The impact of 10 cycles of crosses between the MML and 32 or more transgenic hybrids is discussed, to obtain populations with individuals that accumulate transgenic weights from zero to 32 or more. Also it is discussed the biological, agronomic and molecular evaluation of the genotypes under study.

Key words: Transgene accumulation in Mexican maize landraces, genetically modified maize, maize landraces.

INTRODUCTION

The quest for food safety and the technological advances promised by modern biotechnology, explain the proclivity of the Mexican State for adopting transgenic maize, despite the *sui generis* nature of México as the center of origin (Piperno and Flannery, 2001; Matsuoaka *et al.*, 2002), and of maximum genetic diversity of maize (Goodman and Brown, 1988). This tendency contradicts the fact that the self-sufficiency of this grain with public technology based on non-

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Agosto, 2007. Aprobado: Enero, 2009

Publicado como ENSAYO en Agrobiencia 43: 257-265. 2009.

(Piperno y Flannery, 2001; Matsuoka *et al.*, 2002), y de máxima diversidad genética de maíz (Goodman y Brown, 1988); también a pesar de que la autosuficiencia de este grano con tecnología pública basada en maíz no transgénico es alcanzable (Turrent *et al.*, 1996; Ortiz *et al.*, 2007); y el hecho de que la presencia de ADN transgénico en algunas razas nativas de maíz se ha demostrado (Quist y Chapela, 2001; Serratos *et al.*, 2007; Piñeyro-Nelson *et al.*, 2008).

La Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) (Anónimo, 2005) y su reglamento (Anónimo, 2008) presuponen que el maíz transgénico y el maíz nativo pueden coexistir en el campo mexicano, siendo posible minimizar su intercambio genético mediante el control de la ruta del polen, ampliamente estudiada en otros países (Jarosz *et al.*, 2003; Luna *et al.*, 2001; Goggi *et al.*, 2007). Sin embargo, varios autores justifican la hipótesis alterna, de una significativa interacción genética en México, con base en: 1) La presencia demostrada de ADN transgénico en algunas RNM, cuyos posibles efectos han sido discutidos por varios autores (Bellón y Berthaud, 2004; Kato, 2006; y Mercer y Wainright, 2008); 2) el carácter *sui generis* de México donde en más del 75 % del área de maíz cultivado se practica mejoramiento genético autóctono en las RNM (Turrent *et al.*, 2009, en prensa).

Un grupo de instituciones mexicanas propuso el Proyecto Maestro de Maíz (PMM) al Gobierno Mexicano (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2006), para evaluar: 1) La adaptación a México de híbridos de MGM que los consorcios multinacionales han desarrollado; 2) el impacto de su interacción genética con el maíz nativo; 3) el efecto sobre el ecosistema. En cuanto al impacto de la transformación del maíz nativo, el cotejo propuesto es incompleto, al considerar sólo el primer producto de la interacción genética, esto es, una monotransformación de la RNM. Es claro que el realismo de este cotejo es sólo válido si los campesinos mexicanos abandonaran el mejoramiento genético autóctono de maíz y si obtuvieran toda su semilla, de maíz transformado todos los años.

Los autores de este ensayo argumentan que la interacción genética entre el MGM y las RNM podría proceder mediante la ruta semilla-polen, propiciada por: 1) El Mejoramiento Genético Autóctono de Maíz (MGAM); 2) la biología reproductiva del maíz; 3) la dispersión de los más de 30 *loci* transgénicos en el espacio cromosómico; 4) una nueva generación de maíz transgénico adaptado al agroecosistema mexicano. El resultado de ésta interacción genética podría dar la acumulación progresiva e irreversible de ADN transgénico en las RNM. Su efecto podría ser inócuo o bien, causar

transgénico maíz es achievable (Turrent *et al.*, 1996; Ortiz *et al.*, 2007), and the fact that the presence of transgenic DNA in some Mexican landraces has been demonstrated (Quist and Chapela, 2001; Serratos *et al.*, 2007; Piñeyro-Nelson *et al.*, 2008).

The Law of Biosecurity of Genetically Modified Organisms (Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, LBOGM) (Anonymous, 2005) and its norms (Anonymous, 2008) assume that the transgenic maize and the landraces can coexist in Mexican farmlands, and that it is possible to minimize their genetic exchange through the control of the pollen route, which has been studied extensively in other countries (Jarosz *et al.*, 2003; Luna *et al.*, 2001; Goggi *et al.*, 2007). However, various authors justify the alternative hypothesis, of a significant genetic interaction in México, based on: 1) The already demonstrated presence of transgenic DNA in some MML, the possible effects of which have been discussed by various authors (Bellón and Berthaud, 2004; Kato, 2006; Mercer and Wainright, 2008); 2) the *sui generis* nature of México, where in over 75 % of the cultivated maize area, autochthonous maize breeding is carried out in the MML (Turrent *et al.*, 2009 in publication).

A group of Mexican institutions proposed the Master Maize Project (Proyecto Maestro de Maíz, PMM) to the Mexican Government (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2006), to evaluate the following: 1) The adaptation of the hybrids of GMM developed by multinational consortiums; 2) the impact of their genetic interaction with the Mexican landraces; 3) the effect on the ecosystem. With respect to the impact of the transformation of the Mexican maize landraces, the proposed test is incomplete, given that it only considers the first product of the genetic interaction, that is, a monotransformation of the MML. It is clear that the realism of this test is only valid if the Mexican farmers abandon the autochthonous maize breeding and if they obtained all seeds from transformed maize every year.

The authors of the present essay argue that the genetic interaction between the GMM and the MML could proceed through the seed-pollen route, propitiated by: 1) Autochthonous Maize Breeding (AMB); 2) the reproductive biology of maize; 3) the dispersal of the more than 30 transgenic *loci* in the chromosomal space; 4) a new generation of transgenic maize adapted to the Mexican agroecosystem. The result of this genetic interaction could give the progressive and irreversible accumulation of transgenic DNA in the MML. Its effect could be innocuous or cause interferences of the function of the resident DNA (Kato, 2006) and loss of genetic diversity of the MML. This essay proposes that it is necessary to test the hypothesis: the accumulation of

interferencias de la función del ADN residente (Kato, 2006) y pérdida de diversidad genética de las RNM. En este ensayo se propone que es necesario cotejar la hipótesis: la acumulación de transgenes mayor a cierto umbral, interferirá con el genoma del maíz nativo, siendo este umbral y tipo de interferencia, diferenciales para cada raza nativa, según la ubicación relativa del inserto y la estabilidad de las construcciones transgénicas. Sólo la investigación de la interacción genética entre el maíz nativo y el transgénico, aclararía esta duda. Se propone en este ensayo: 1) Obtener poblaciones de las RNM de México que concentren 32 o más transgenes (Agbios, 2009; Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo, 2009) mediante cruzamientos inducidos; 2) evaluar los desempeños agronómicos y biológicos de los individuos multitransformados, sometidos a los esfuerzos bióticos y abióticos de sus agroecosistemas de origen; 3) caracterizar a los genotipos multitransformados con técnicas de biología molecular. El conocimiento derivado de esta investigación de naturaleza multianual y de financiamiento elevado, es necesario para definir el riesgo de la liberación de MGM a escala comercial en México.

INTERACCIÓN GENÉTICA ENTRE EL MAÍZ NATIVO Y EL TRANSGÉNICO

En este ensayo se explora el escenario hipotético del cultivo comercial de MGM en una superficie del orden de un millón de hectáreas, distribuidas en las principales regiones agroclimáticas del país. Se argumenta que será inevitable la incidencia de los cuatro elementos de la interacción genética entre el MGM y las RNM: 1) El Mejoramiento Genético Autóctono de Maíz (MGAM) como factor de acceso vía semilla-polen; 2) la biología reproductiva del maíz, como factor proclive a la infiltración en el espacio genómico; 3) la dispersión no controlada de más de 30 *loci* transgénicos en el espacio cromosómico, como factor de acumulación de transgenes; 4) una nueva generación de MGM adaptado al agroecosistema mexicano, como vehículo más potente que la primera generación de MGM (grano producido en EE.UU.) para impulsar la infiltración de ADN transgénico.

Después de varios ciclos anuales de introducción de un MGM específico a un agroecosistema en el que se cultiva una RNM específica, y de su recirculación entre predios, los cuatro factores arriba mencionados, propiciarían, ignorando al ADN residente, 2^{2L} genotipos posibles (L es el número de *loci* transgénicos diferentes introducidos). Nombraremos 1,0 a un genotipo transgénico que es: 1) Hemigigote (sólo una de las dos cromátidas porta el transgene); 2) sin duplicados; 3)

transgenes higher than a certain threshold, will interfere with the genome of the native race maize, this threshold and type of interference being differential for each landrace, according to the relative location of the insert and the stability of the transgenic constructions. Only the investigation of the genetic interaction between the landrace and transgenic maize, will clarify this doubt. The present study proposes the following: 1) To obtain populations of the MML of México that concentrate 32 or more transgenes (Agbios, 2009; Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo, 2009) through induced crosses; 2) to evaluate the agronomic and biological performances of the multitransformed individuals, subjecting them to the biotic and abiotic stresses of their agroecosystems of origin; 3) to characterize the multitransformed genotypes with techniques of molecular biology. The knowledge derived from this high cost multiannual investigation, is necessary to define of the risk of the liberation of GMM on the commercial scale in México.

GENETIC INTERACTION BETWEEN THE LANDRACE AND TRANSGENIC MAIZE

This study explore the hypothetical scenario of the commercial cultivation of GMM on a surface of a million hectares, distributed across the principal agroclimatic regions of the country. It is argued that the incidence of the four elements of the genetic interaction between the GMM and the MML will be inevitable: 1) The Autochthonous Maize Breeding (MGAM) as factor of access via seed-pollen; 2) the reproductive biology of maize, as a factor of proclivity to infiltration in the genomic space; 3) the uncontrolled dispersal of more than 30 transgenic *loci* in the chromosomal space, as factor of accumulation of transgenes; 4) a new generation of GMM adapted to the Mexican agroecosystem, as a more potent vehicle than the first generation of GMM (grain produced in the USA.) to provoke the infiltration of transgenic DNA.

After various cycles of annual introduction of a specific GMM to an agroecosystem in which a specific MML is cultivated, and its recirculation among plots, the four abovementioned factors will propitiate, ignoring the resident DNA, 2^{2L} possible genotypes (L is the number of different transgenic *loci* introduced). We will use 1,0 to refer to a transgenic genotype that is: 1) Hemizygous (only one of the two chromatids carries the transgene); 2) without duplicates; 3) genetically stable; 4) with Mendelian heredity. Its cross with a MML, whose genotype will be 0,0 will form an F1 integrated by genotypes 1,0 and 0,0 that will share the dose of 50 % of germplasm of each origin. Through their free crossing, these genotypes will derive in

genéticamente estable, y 4) con herencia Mendeliana. Su cruzamiento con una RNM, cuyo genotipo será 0,0 formará una F1 integrada por genotipos 1,0 y 0,0 que compartirían la dosis de 50 % de germoplasma de cada origen. Mediante su cruzamiento libre, estos genotipos derivarían a los genotipos 0,0; 0,1; 1,0 y 1,1; este último sería transgénico hemigote. La frecuencia del genotipo 0,0 en la población total de la RNM sería muy alta en los primeros años después de iniciado el flujo de ADN transgénico al maíz nativo. Después de suficiente tiempo de este proceso, la frecuencia relativa del genotipo 0,0 decrecería para dar lugar a los otros tres genotipos. Es teóricamente posible alcanzar el escenario en que la frecuencia del genotipo 0,0 sea $100/2^{2L}$ por ciento (25 %), igual a la de los otros tres genotipos. La introducción de un nuevo MGM que portara un diferente *locus* ocupado por la misma construcción transgénica o por otra, conduciría a una nueva acumulación de ADN transgénico; L sería igual a 2.

La LBOGM es permisiva con respecto al espacio genómico porque, ignora que por razones comerciales y tecnológicas, dos o más CMN, poseedoras de híbridos transgénicos de maíz, ofrezcan el mismo transgene en *loci* diferentes. Tampoco está limitado el número de copias del transgene incluidas en un híbrido transgénico comercial. Los CMN que generaron más de 30 eventos transgénicos de MGM comestible en EE.UU. y Canadá (Agbios, 2009; OECD, 2009), introducirían éstos al campo mexicano, según sus intereses corporativos, en los años posteriores a la liberación de la siembra comercial de MGM en México.

La libertad irrestricta sobre el espacio genómico del maíz que concede la LBOGM conducirá a que, el caso arriba examinado de un *locus* transgénico, represente el límite inferior en términos de acumulación de ADN transgénico en los años siguientes a la liberación comercial. La infiltración podría ocurrir de manera simultánea en las más de 50 RNM.

Adicionalmente, el número de eventos transgénicos independientes podría crecer a partir de por lo menos nuevos objetivos de transformación, nuevos materiales transgénicos de maíz desarrollados por la colaboración entre instituciones públicas nacionales, y sustitución de transgenes superados por la resistencia genética a plagas y patógenos del maíz. El potencial de aparición de nuevos insertos transgénicos por los métodos biolísticos es alto, implicando el incremento de *loci* transgénicos dispersos en el espacio cromosómico y la acumulación progresiva de transgenes en las RNM, potencialmente incontrolable.

Al interaccionar genéticamente 30 eventos transgénicos independientes con las más de 50 RNM, en los años posteriores a la liberación comercial de

genotipos 0,0; 0,1; 1,0 and 1,1; this last genotype will be transgenic hemizygous. The frequency of genotype 0,0 in the total population of the MML will be very high in the first years after the start of the flow of transgenic DNA to the landrace maize. After sufficient time of this process, the relative frequency of genotype 0,0 will decrease to give place to the other three genotypes. It is theoretically possible to reach the scenario in which the frequency of genotype 0,0 will be $100/2^{2L}$ per cent (25 %), equal to that of the other three genotypes. The introduction of a new GMM that carries a different *locus* occupied by the same transgenic construction or by another, will lead to a new accumulation of transgenic DNA; L will be equal to 2.

The LBGMO is permissive with respect to the genomic space, because it ignores the fact that for commercial and technological reasons, two or more MNC, that possess transgenic maize hybrids, offer the same transgene in different *loci*. There is not a limit of the number of copies of the transgene included in a commercial transgenic hybrid. The MNC that generated more than 30 transgenic events of edible GMM in the U.S. and Canada (Agbios, 2009; OECD, 2009), will introduce them to the Mexican farmlands, according to their corporative interests, in the years after the liberation of the commercial planting of GMM in México.

The irrestrictive freedom over the genomic space of maize conceded by the LBGMO will lead to the following: that the abovementioned case of a transgenic *locus* will represent the lower limit in terms of accumulation of transgenic DNA in the years after its commercial liberation. The infiltration could occur simultaneously in the more than 50 MML.

Additionally, the number of independent transgenic events could increase from at least: a) new objectives of transformation, b) new transgenic maize materials developed by the collaboration among national public institutions, and c) substitution of transgenes that are overcome by the genetic resistance of the maize pests and pathogens. The potential of the appearance of new transgenic inserts by the biolistic methods is high, implying the increase of transgenic *loci* dispersed in the chromosomal space and the progressive accumulation of transgenes in the MML, potentially uncontrollable.

When 30 independent transgenic events interact genetically with the more than 50 MML, in the years after the commercial liberation of transgenic maize, $2^{2 \times 30}$ genotypes ($L=30$) will be generated. The transformed plants of each MML could include from one to 30 inserts of transgenic DNA in their genome. As was previously mentioned, L (number of independent transgenic events) could increase.

maíz transgénico se generarían $2^{2 \times 30}$ genotipos ($L=30$). Las plantas transformadas de cada RNM podrían incluir desde uno hasta 30 insertos de ADN transgénico en su genoma. Como se mencionó L (número de eventos transgénicos independientes) podría crecer.

Una parte de la comunidad académica de México se inclina por el uso irrestricto de MGM en el campo mexicano. Su argumento es que evolutivamente las especies han aprendido a prosperar con acumulaciones de ADN adventicio, por lo que la nueva acumulación de ADN transgénico podría ser inofensiva. La fracción académica opuesta al uso de MGM en su etapa comercial actual (Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad. UCCS, 2009), indica que esa acumulación puede ser causa de diferentes niveles de esterilidad, de pérdida de vigor, de producción de granos defectuosos entre otros, Kato (2006), lo que sería desastroso para la diversidad genética del maíz nativo. Además, se debe reconocer en este escenario de liberación comercial de MGM, que la conservación de RNM *in situ* llegaría a su fin, así como la recolección de maíces nativos para programas de mejoramiento genético clásico.

Para conocer el efecto del proceso de transformación de los materiales nativos de maíz, es necesario disponer de los 2^{2L} genotipos posibles, estudiar su comportamiento agronómico en las condiciones ecológicas nativas y analizar su ADN. Este estudio tendría que comprender a las más de 50 RNM mexicano.

INVESTIGACIÓN DE LA INTERACCIÓN GENÉTICA ENTRE EL MAÍZ NATIVO Y EL MAÍZ TRANSGÉNICO

El Proyecto Maestro de Maíz (PMM)

Para cumplir la fase experimental de liberación del cultivo de maíz transgénico en México, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGARPA) Mexicana cuenta con el Proyecto Maestro de Maíz (PMM) (SENASICA, 2006) propuesto por Centro de Investigaciones Avanzadas, Unidad Irapuato. Este proyecto se conduciría en cuatro Campos Experimentales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP): Campo Experimental Valle del Yaqui, Campo Experimental Valle de Culiacán, Campo Experimental Río Bravo y Campo Experimental Sur de Tamaulipas, previa aprobación de la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera de SAGARPA. El protocolo 2 del Experimento 1 de este PMM, incluye el estudio de la Equivalencia agronómica funcional de razas de maíz criollo que integran el evento TC 1507 (Hércules-CryIF). Este estudio busca evaluar si la modificación genética de variedades criollas de maíz

Part of the academic community of México favors the unrestricted use of GMM in Mexican farmlands. They argue that evolutionarily the species have learned to prosper with accumulations of adventitious DNA, therefore the new accumulation of transgenic DNA could be inoffensive. The academic fraction opposed to the use of GMM in its present commercial stage (Union de Científicos Comprometidos con la Sociedad. UCCS, 2009), points out that this accumulation can be the cause of different levels of sterility, loss of vigor, production of defective grains, among others, which would be disastrous for the genetic diversity of maize landraces (Kato, 2006). Furthermore, it must be recognized in this scenario of commercial liberation of GMM, that the conservation of MML *in situ* would come to an end, as well as the collection of landraces for classical maize breeding programs.

To know the effect of this process of transformation of the landrace maize materials, it is necessary to have the 2^{2L} possible genotypes, study their agronomic behavior under the native ecological conditions and analyze their DNA. This study would have to include more than 50 MML.

INVESTIGATION OF THE GENETIC INTERACTION BETWEEN THE MEXICAN LANDRACES AND THE TRANSGENIC MAIZE

The Master Maize Project

To complete the experimental phase of liberation of transgenic maize in México, the Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGARPA) has the Master Maize Project (MMP) (Senasica, 2006) proposed by the Centro de Investigaciones Avanzadas, Unidad Irapuato. This project would be carried out in four Experimental Fields of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP): Campo Experimental Valle del Yaqui, Campo Experimental Valle de Culiacán, Campo Experimental Río Bravo and Campo Experimental Sur de Tamaulipas, with the approval of the Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera of SAGARPA. Protocol 2 of Experiment 1 of this MMP, includes the study "Functional agronomical equivalency of landraces that integrate the event TC 1507 (Hércules-CryIF). The objective of the study is to evaluate if the genetic modification of landrace maize varieties causes any alteration in growth, flowering, seed production, etc." (SENASICA, 2006).

This experiment may or may not refute the hypothesis of the alteration of a transgenic construction in the landraces involved. However, it should be considered that the maize landraces transformed by the

causa alguna alteración en el crecimiento, floración y producción de semillas, etc. (SENASICA, 2006).

Este experimento refutará o no la hipótesis de la alteración de una construcción transgénica sobre los maíces nativos involucrados. Debe tomarse en cuenta que los maíces nativos transformados por los CMN, son monotransformados; por tanto, el cotejo será pertinente sólo en el escenario improbable de que los campesinos mexicanos compraran todos los años semilla de maíz monotransformada, en sustitución de la semilla nativa propia. Las pruebas propuestas en el PMM son irrelevantes y también engañosas si se las ubica en el escenario de manejo de las más de 50 RNM bajo MGAM y los más de 30 eventos transgénicos independientes. Los MGM liberados serían cruzados por los productores con sus maíces nativos y sus progenies serían circuladas dentro de las comunidades. Es precisamente en este escenario de interacción genética RNM $\times$ MGM en el que se tendría que cotejar la hipótesis de las alteraciones inesperadas en las RNM; esto es, después de la acumulación contingente-múltiple de eventos de ADN transgénico en las progenies.

Plan de cruzamientos para acumular ADN transgénico en maíces nativos

A continuación se discute un proceso de cruzamientos de campo MGM $\times$ RNM, aplicable a 32 híbridos, cada uno con un *locus* transgénico diferente, al que nos referiremos como donantes transgénicos (DT) y a una población de una RNM. En este ejercicio se presupone: 1) La condición de hemicigosis en el DT, con inserto único y estable, con herencia Mendeliana; 2) la disponibilidad de procedimientos de detección de proteína transgénica de los 32 DT; 3) disponibilidad de dos localidades, una en un Altiplano y otra ubicada a unos 1500 m de altitud dentro del Trópico de Cáncer, donde se puedan cultivar dos ciclos de maíz al año; ambas localidades con infraestructura de riego.

En el ciclo 1 se poliniza 10 individuos de una RNM con un donante transgénico, repitiéndolo con los 31 DT restantes; la mitad de cada progenie habría sido monotransformada y contendría 50 % del germoplasma de la RNM; en el ciclo 2 se siembran 50 semillas de cada una de las 32 progenies F1 y se identifica a las plantas transformadas durante la etapa vegetativa. Los individuos transformados son retrocruzados con polen colectado de 50 individuos de la RNM original en el mismo ciclo; las 32 progenies tendrán 50 % de plantas monotransformadas, con 75 % de germoplasma de la RNM; en los ciclos 3 y 4 se seleccionan los individuos transformados y se hace una segunda y tercera retrocruza con la RNM; la cuarta progenie de cada una de las 32 poblaciones alcanzará 93.75 % de

MNC are monotransformed; therefore, the test will be pertinent only in the unlikely scenario that the Mexican farmers buy monotransformed landrace maize seed every year, in substitution of their own seed. The tests proposed in the PMM are irrelevant and also deceptive, if it they are placed in the management scenario of more than 50 MML under AMB and more than 30 independent transgenic events. The liberated GMM would be crossed by the producers with their landrace maize and their progeny would be circulated within the communities. It is precisely in this scenario of genetic interaction MML $\times$ GMM in which the hypothesis of the unexpected alterations in the MML should be tested; that is, after the multiple-contingent accumulation of transgenic DNA events in the progenies.

Plan of crosses to accumulate transgenic DNA in landrace maize

Next it is discussed a process of field crosses GMM $\times$ MML, applicable to 32 hybrids, each one with a different transgenic *locus*, which we refer to as transgenic donors (TD) and to a population of MML. In this exercise it is assumed that: 1) The condition of hemizygosis in the TD, with single and stable insert, with Mendelian heredity; 2) the availability of procedures to detect transgenic protein of the 32 TD; 3) availability of two localities, one in the Central Highlands and the other located at approximately 1500 m altitude within the Tropic of Cancer, in which two growing cycles a year of maize can be carried out; both localities must have an infrastructure of irrigation.

In cycle 1 ten individuals of a MML are pollinated with a transgenic donor, repeating this procedure with the other 31 TD; half of each progeny will have been monotransformed and will contain 50 % of the germplasm of the MML; in cycle 2 fifty seeds of each one of the 32 F1 progeny are sown and the plants transformed during the vegetative stage are identified. The transformed individuals are retrocrossed with pollen collected from 50 individuals of the original MML in the same cycle; the 32 progenies will have 50 % monotransformed plants, with 75 % of germplasm of the MML; in cycles 3 and 4 the transformed individuals are selected and a second and third retrocross is made with the MML; the fourth progeny of each of the 32 populations will reach 93.75 % of germplasm of the MML with 50 % of it monotransformed. Then 50 seeds of each of the 32 populations are sown, the monotransformed plants are identified and harvested; leftover seed of monotransformed and untransformed material will be conserved. In the vegetative cycle 5 (first cycle of the third year), the monotransformed plants are identified and are crossed among populations

germoplasma de la RNM con 50 % de monotransformación. Se siembra 50 semillas de cada una de las 32 poblaciones, se identifica a las plantas monotransformadas y son cosechadas; se conservará semilla remanente de material monotransformado y no transformado. En etapa vegetativa del ciclo 5 (primer ciclo del tercer año) se identifica a las plantas monotransformadas y se las cruza entre poblaciones por pares diferentes (16 cruzamientos de las 32 poblaciones monotransformadas); cada *locus* transgénico aparece una sola vez. En el ciclo 6 (fin del tercer año) se siembra las progenies, se identifica a los individuos bitransformados y se hace ocho cruza entre pares de poblaciones diferentes. Las ocho progenies resultantes contienen de cero a cuatro transgenes diferentes cada una. En el ciclo 7 (inicio del cuarto año) se hace cuatro cruzamientos posibles entre individuos tetratransformados y sus tres progenies tendrán de cero a ocho transgenes. En el ciclo 8 se hace dos cruzamientos de las cuatro progenies para obtener dos progenies que contiene hasta 16 transgenes acumulados. En el ciclo 9, se cruza las dos progenies hexa-décimo transformadas para alcanzar una progenie que acumula desde cero hasta 32 transgenes. Durante el segundo ciclo del año 5, se tiene una población con 93.75 % de germoplasma de la RNM y con cargas genéticas desde cero hasta 32 transgenes con frecuencias relativas no especificadas. La duplicación en paralelo de este proceso lograría una población con cargas genéticas desde cero hasta 64 transgenes. Si fallara el supuesto del inserto único en los 32 eventos transgénicos independientes y hubiera desde cero hasta dos o tres duplicados, la carga transgénica de la población multitransformada tendría límites mayores a 32 o a 64 transgenes.

Finalmente, estos experimentos tendrían que repetirse con cada RNM.

Plan de evaluación de maíz nativo acumulante de ADN transgénico

Desde el ciclo 7 en que se tenga ocho poblaciones con cargas genéticas de cero a cuatro transgenes se iniciará la observación, teniendo como referencia parcelas apareadas establecidas con semilla remanente de la RNM, para detectar desviaciones del comportamiento agronómico-biológico de los individuos. Los testigos serían una población que contenga 93.75% de germoplasma nativo y la RNM original. En esta etapa, se requerirán sondas para correlacionar el comportamiento agronómico con el genotipo transgénico. En el ciclo 10 se observarían individuos que hubieran acumulado 32 o hasta 64 insertos transgénicos.

Este proceso debiera realizarse con las razas nativas de mayor cobertura en el país y que, son las más

by different pairs (16 crosses of the 32 monotransformed populations); each transgenic *locus* appears only once. In cycle 6 (end of the third year) the progenies are sown, the bitransformed individuals are identified and eight crosses are made among pairs of different populations. The eight resulting progenies contain from zero to four different transgenes each. In cycle 7 (beginning of the fourth year) four possible crosses are made among tetratransformed individuals and their three progenies will have from zero to eight transgenes. In cycle 8 two crosses are made of the four progenies to obtain two progenies that contain up to 16 accumulated transgenes. In cycle 9, the two transformed sixteenth progenies are crossed to obtain a progeny that accumulates from zero to 32 transgenes. During the second cycle of year 5, there is a population with 93.75 % germplasm of the MML and with genetic loads from zero to 32 transgenes with unspecified relative frequencies. The parallel duplication of this process will achieve a population with genetic loads from zero to 64 transgenes. Should the assumption fail of the single insert in the 32 independent transgenic events and if there were from zero to two or three duplicates, the transgenic load of the multitransformed population would have upper limits greater than 32 or as many as 64 transgenes.

These experiment would have to be repeated for every MML.

Evaluation plan of accumulant landrace maize of transgenic DNA

The observation will begin with cycle 7, in which there are eight populations with genetic loads of zero to four transgenes, having as reference paired plots established with leftover seed of the MML, to detect deviations from the agronomic-biological behavior of the individuals. The controls would be a population that contains 93.75 % of native germplasm and the original MML. In this phase, probes will be required to correlate the agronomic behavior with the transgenic genotype. In cycle 10 individuals are observed that have accumulated as many as 32 to 64 transgenic inserts.

This process should be carried out with the landraces of highest impact in the country and which are the most highly exposed to the accumulation of transgenic DNA. There are 14 viable candidates: Cónico and Chalqueño from High Valleys, Celaya del Bajío; Tuxpeño, Comiteco, Zapalote chico and Zapalote grande from the Humid Tropic; Tamauilpeco, Nal Tel and Conejo from the Subhumid Tropic; Bolita, Cónico Norteño, Perla and Chapalote of the Semiarid Subtropic. This experiments could be carried out in a quarentenary station such as Isla María Madre or under

propensas a acumular ADN transgénico. Hay 14 candidatos posibles: Cónico y Chalqueño de Valles Altos; Celaya del Bajío; Tuxpeño, Comiteco, Zapalote chico y Zapalote grande del Trópico Húmedo; Tamaulipeco, Nal Tel y Conejo del Trópico Subhúmedo; Bolita, Cónico Norteño, Perla y Chapalote del Subtrópico Semiárido. Estos experimentos podrían realizarse en una estación cuarentenaria como la Isla María Madre o bajo convenio en un país vecino donde el cultivo comercial de maíz transgénico ha sido desregulado, aunque en ambos casos se tendría que prescindir de las RNM de los Valles Altos, dado a la desadaptación con las condiciones climáticas.

Análisis de crecimiento y desarrollo

En la fase de campo se observarán las variables de desempeño agronómico, con énfasis en las desviaciones respecto al material RNM original, usado como testigo. Serán motivo especial de observación: la fase de germinación y emergencia de plantas en el campo; la fase de desarrollo vegetativo (V1 a V18) (Ritchie y Hanway, 1984), morfología, vigor, índice de área foliar, síntomas de deficiencias nutricionales, síntomas de enfermedades respuestas a agobios abióticos; fase reproductiva (R1 a R5) (Ritchie y Hanway, 1984), morfología de órganos reproductivos, sincronía, vigor, síntomas de deficiencias nutricionales, síntomas de enfermedades foliares, de la mazorca y del sistema radical, respuesta a agobios abióticos, y la fase de madurez fisiológica, producción de biomasa, índice de cosecha, características del grano.

Análisis de ADN

La fase de análisis de ADN procedería en paralelo con el plan de acumulación de ADN transgénico, a partir del ciclo 1, con la caracterización molecular de las poblaciones progenitoras. Se necesitaría diseñar *primers* y sondas específicas para los transgenes que estén integrados en cada uno de los MGM. La información en el identificador único de la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD) de cada MGM y en las evaluaciones de bioseguridad efectuadas en los países donde se han liberado los mismos maíces transgénicos, permitiría diseñar los protocolos de análisis moleculares. En particular, se recabaría información sobre el *locus* de inserción de cada transgene.

CONCLUSIONES

Como producto de la liberación del maíz transgénico para el cultivo comercial en México, las interacciones

agreement in a neighboring country where the commercial cultivation of transgenic maize has been deregulated, although in both cases it would be necessary to dispense with the MML of the High Valleys, due to their disadaptation to these climatic conditions.

Analysis of growth and development

In the field phase the variables of agronomic performance will be observed, with emphasis on the deviations with respect to the original MML material, used as control. The following aspects will be a special motive of observation: the phase of germination and emergence of plants in the field; the phase of vegetative development (V1 to V18) (Ritchie and Hanway, 1984), morphology, vigor, leaf area index, symptoms of nutritional deficiencies, symptoms of diseases that are a response to abiotic exhaustion; reproductive phase (R1 to R5) (Ritchie and Hanway, 1984), morphology of reproductive organs, synchrony, vigor, symptoms of nutritional deficiencies, symptoms of foliar diseases, of the ear and of the root system, response to abiotic stress, and the phase of physiological maturity, biomass production, harvest index, and grain characteristics.

DNA analysis

The phase of DNA analysis would proceed with the accumulation plan of transgenic DNA, starting with cycle 1 with the molecular characterization of the parent populations. It would be necessary to design primers and specific probes for the transgenes that are integrated in each of the GMM. The information in the single identifier of the Organization for the Economic Cooperation and Development (OECD) of each GMM and in the biosecurity evaluations made in the countries where the same transgenic maizes have been liberated, will allowed to design the protocols of molecular analyses. In particular, information would be gathered of the *locus* of insertion of each transgene.

CONCLUSIONS

As product of the liberation for the commercial cultivation in México, the genetic interactions among more than 50 mexican maize landraces and more than 30 transgenic hybrid maizes available in the transgenic seed markets of the USA. and Canada, could lead to the progressive and irreversible accumulation of transgenic DNA in the successive progenies of the maize landraces. Only a multigenerational investigation of the microcosm of these genetic interactions would know *a priori* if the accumulation of transgenic DNA endangers the biodiversity of maize in México.

genéticas entre las más de 50 razas mexicanas nativas de maíz y los más de 30 maíces híbridos transgénicos disponibles en los mercados de semillas transgénicas de EE.UU. y Canadá, podrían conducir a la acumulación progresiva e irreversible de ADN transgénico en las progenies sucesivas de las razas nativas de maíz. Sólo una investigación multigeneracional del microcosmos de esas interacciones genéticas permitiría conocer *a priori* si la acumulación de ADN transgénico pone en riesgo la biodiversidad del maíz en México.

LITERATURA CITADA

- Agbios. 2009. <http://www.agbios.com/dbase.php> (consultado el 8 de enero de 2009).
- Anónimo. 2005. Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Diario Oficial de la Federación, publicado el 18 de marzo de 2005. Presidencia de la República. México, D.F.
- Anónimo. 2008. Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Diario Oficial de la Federación, publicado el 19 de marzo de 2008. Presidencia de la República. México, D.F.
- Bellon M. C., and J. Berthaud. 2004. Transgenic maize and the evolution of landrace diversity in Mexico. The importance of farmer's behavior. *Plant Physiol.* 134: 883-888.
- Goggi A. S., H. López-Sánchez, P. Caragea, M. Westgate, R. Arritt, and C. A. Clark. 2007. Gene flow in maize fields with different local pollen densities. *Int. J. Biometeorol.* 51:493-503.
- Goodman, M. M. and W. L. Brown. 1988. Races of corn. In: G.F. Sprague and J.W. Dudley (eds). *Corn and Corn Improvement*. Agronomy Monographs No.18. American Society of Agronomy: Madison, WI. pp: 33-79.
- Jarosz N., B. Lubert, B. Durand, H. A. McCartney, X. Foucillassar, and L. Huber. 2003. Field measurement of airborne concentrations and deposition rate of maize pollen (*Zea mays* L.) downwind of an experimental field plot. *Agric. For. Meteorol.* 119:37-51.
- Kato T. A. 2006. Variedades transgénicas y el maíz nativo en México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo* 1(2):101-109.
- Luna V. S., M. J. Figueroa, M. B. Baltasar, L. R. Gómez, R. Townsend, and J. B. Schoper. 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. *Crop Sci.* 41: 1551-1557.
- Matsuoka Y., Y. Vigouroux, M.M. Goodman, J. Sánchez, E. Buckler, and J. Doebley. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:6080-6084.
- Mercer, K. L., and J. D. Wainright. 2008. Gene flow from transgenic maize to landraces in Mexico: An analysis. *Agric. Ecosyst. Environ.* 123: 109-115.
- Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD). 2009. Bio Track Product Database. <http://www2.oecd.org/biotech/byIdentifier.aspx> (consultado el 20 de enero de 2009).
- Ortiz J., R. Ortega P., J. Molina G., M. Mendoza R., M. C. Mendoza C., F. Castillo G., A. Muñoz O., A. Turrent F. and T. A. Kato Yamakake. 2007. Análisis de la problemática sobre la producción de maíz y propuestas de acción. Grupo Xilonen, Universidad Autónoma Chapingo-Colegio de Postgraduados-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Primera edición. Chapingo, México. 30 p.
- Piñeyro-Nelson A., J. V. Heerwarden, H. R. Perales, J. A. Serratos-Hernández, A. Rangel, M. B. Hufford, P. Gepts, A. Garay-Arroyo, R. Rivera-Bustamante and E. R. Álvarez-Buylla. 2008. Transgenes in Mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Molecular Ecology*. http://www.plantsciences.edu/gepts/mec_3993_LOW.pdf (consultado el 12 de enero de 2009).
- Piperno, D. R., and K. V. Flannery. 2001. The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland México: New accelerator mass spectrometry dates and their implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(4) 2101-2103.
- Quist D., and I. Chapela. 2001. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, México. *Nature* 414: 541-543.
- Ritchie S. W., and J. Hanway. 1984. How a corn plant develops. Special Report Number 48. Iowa State University of Science and Technology, Ames, Iowa. 21 p.
- Serratos-Hernández J. A., J. L. Gómez-Olivares, N. Salinas-Arreortua, E. Buendía-Rodríguez, F. Islas Gutiérrez, and A. de Ita. 2007. Transgenic proteins in maize in the soil conservation area of Federal District, México. *Front Ecol. Environ.* 5(5): 247-252.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, SENASICA. 2006. Oficio No. BOO.126 del 2 de febrero del 2006. Respuesta del Dr. Javier Trujillo Arriaga, Director en Jefe de SENASICA, a Gustavo Ampugnani Coordinador de Campaña de Ingeniería Genética, Greenpeace, México A.C.
- Turrent, A., R. Avelaño y R. Moreno. 1996. Análisis de las posibilidades técnicas de la autosuficiencia sostenible de maíz en México. *Terra*, 14(4): 445-468.
- Turrent A., J. A. Serratos, H. Mejía, y A. Espinosa. 2009. Liberación comercial de maíz transgénico y acumulación de transgenes en las razas de Maíz Mexicano. *Rev. Fitotec. Mex.* En prensa.
- Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad (UCCS, AC). Grupo de Maíz Transgénico. 2009. <http://www.unionccs.net> (consultado el 23 de enero de 2009).