

## GRANO DE MAÍZ COMERCIALIZADO EN MÉXICO COMO POTENCIAL DISPERSOR DE EVENTOS TRANSGÉNICOS

### CORN GRAIN COMMERCIALIZED IN MEXICO AS A POTENTIAL DISPERSER OF TRANSGENIC EVENTS

**Viridiana Trejo-Pastor<sup>1,3</sup>, Alejandro Espinosa-Calderón<sup>2</sup>, Ma. del Carmen Mendoza-Castillo<sup>1</sup>, Takeo Á. Kato-Yamakake<sup>1</sup>, María Luisa Morales-Floriano<sup>1</sup>, Margarita Tadeo-Robledo<sup>3</sup> y Ana Wegier<sup>4\*</sup>**

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México, México. <sup>3</sup>Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México. <sup>4</sup>UNAM, Instituto de Biología, Jardín Botánico, Ciudad Universitaria, CDMX, México.

\*Autor de correspondencia (awegier@ib.unam.mx)

#### RESUMEN

Conservar la diversidad del maíz sin transgenes será posible cuando se entiendan las fuentes de introgresión y dispersión de estos genes modificados. El objetivo de este estudio fue analizar la presencia de transgenes en granos y semillas de maíz comercializados en México, por considerarse como potenciales dispersores de eventos transgénicos. Se recolectaron 40 muestras de granos y semillas de híbridos comercializados en México en parcelas de producción o comercializados de origen nacional e importado. Se sembraron en campo 300 semillas por genotipo y cuando se encontraban en etapa V4-V5 de desarrollo foliar se les asperjó glifosato, evaluando 15 días después su efecto. Con base en la frecuencia de resistencia (FR) y nivel de daño se seleccionaron genotipos para ser evaluados con inmunoensayos ELISA para detección de la proteína recombinante CP4/EPSPS y una prueba basada en ADN para detección de presencia/ausencia de P35S de CaMV y TNOS de *A. tumefaciens* por qPCR. Las muestras que resultaron positivas para P35S y TNOS se enviaron al Centro Nacional de Referencia de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOG) para su validación y detección de eventos específicos, y se estimaron los porcentajes de eventos de secuencias modificadas contenidos en las muestras positivas. Cuatro híbridos mostraron la mayor resistencia a glifosato en campo (FR ≤ 0.26). En los ensayos ELISA y qPCR los granos del híbrido Jabalí y el importado fueron positivos para la introgresión de transgénicos. Se confirmó la presencia de los eventos MON89034, TC1507 y MON810 (< 0.1 % en cada caso) en grano del híbrido Jabalí, así como los eventos MON89034, MON810, MON88017, NK603, TC1507, Bt11, GA21 y MIR162 (26.42, 2.28, 0.16, 18.13, > 10.0, 8.67, 0.78 y 4.78 %, respectivamente) en el grano importado. La presencia de eventos específicos en granos comercializados quedó comprobada como vía potencial de dispersión de transgenes al maíz nativo, resaltando que estos granos nacionales e importados son semillas funcionales, que conservan su capacidad de desarrollo y de expresión de proteínas recombinantes para resistencia a glifosato.

**Palabras clave:** *Zea mays* L., ELISA, maíz genéticamente modificado, maíz híbrido, resistencia a glifosato.

#### SUMMARY

Preserving diversity of maize without transgenes would be possible so long as the sources of introgression and dispersion of modified genes are understood. The objective of this study was to analyze the presence of transgenes in maize grains and seeds marketed in Mexico, as they are

considered potential dispersers of transgenic events. Forty samples of grains and seeds of hybrids commercialized in Mexico were collected from production plots or sold commercially from domestic and imported origin. Three hundred seeds per genotype were sown in the field and when they were in the V4-V5 stage of foliar development glyphosate was sprayed on them evaluating the effect 15 days later. Based on the Resistance Frequency (RF) and damage level, genotypes were selected to be evaluated with ELISA immunoassays for recombinant protein CP4/EPSPS detection and a DNA-based test for presence/absence of P35S of CaMV and TNOS of *A. tumefaciens* by qPCR. The samples that tested positive for the presence of P35S and TNOS were sent to the National Reference Center for Genetically Modified Organisms (CNRDOG) for validation and detection of specific events of modified sequences contained in the positive samples. Four hybrids showed the highest resistance to glyphosate in the field (RF ≤ 0.26). In the ELISA and qPCR tests the grain samples of the Jabalí hybrid and imported were positive for transgenic introgression. The presence of the events MON89034, TC1507 and MON810 (< 0.1 % in each case) was confirmed in grain of the hybrid Jabalí, as well as the events MON89034, MON810, MON88017, NK603, TC1507, Bt11, GA21 and MIR162 (26.42, 2.28, 0.16, 18.13, > 10.0, 8.67, 0.78 and 4.78 %, respectively) in imported grain. The presence of specific events in commercialized grains was confirmed as a potential pathway for dispersal of transgenes to native maize, highlighting that these grains, both national and imported, are functional seeds, which retain their ability to develop and express recombinant proteins for glyphosate resistance.

**Index words:** *Zea mays* L., ELISA, genetically modified maize, glyphosate resistance, hybrid maize.

#### INTRODUCCIÓN

En 2001 se publicó el primer reporte científico sobre la detección de transgenes en maíces nativos de México (Quist y Chapela, 2001), lo que ocasionó el desarrollo de investigaciones para evaluar el flujo génico entre maíz genéticamente modificado (MGM) y poblaciones nativas, confirmándose este hecho en diversos estudios (Carreón-Herrera *et al.*, 2011; Dyer *et al.*, 2009; Landavazo *et al.*, 2006; Mercer y Wainwright, 2007; Serratos, 2009; Turrent *et al.*, 2009). Desde entonces se menciona que la comercialización de granos en el país puede contribuir a la

dispersión de transgenes, siempre que pueda desarrollarse y expresar las proteínas recombinantes que confiere la resistencia a herbicidas (Kato-Yamakake, 2004; Carreón-Herrera *et al.*, 2011; Peña, 2013); además, existen otras posibles vías de dispersión, las cuales no son excluyentes entre ellas.

A nivel nacional, el gobierno federal mantuvo una moratoria para la siembra de MGM que entró en vigor en 1999, hasta que modificaciones hechas a la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (CDHCU, 2005) y su reglamento (CDHCU, 2009) permitieron su siembra. Entre 2005 y 2012 se autorizaron 218 solicitudes de liberación en etapa experimental y piloto en ocho estados del norte de México (CIBIOGEM, 2021), por lo que la dispersión de transgenes pudo ocurrir a través de semillas y de polen en el periodo donde ocurrieron siembras permitidas por la ley.

El maíz ha crecido en importancia a nivel mundial, es usado para la alimentación de animales y en la obtención de productos de uso industrial, principalmente. En México, la mayor parte de la producción se destina al consumo humano, mientras que la importación se utiliza como alimento para ganado e insumos industriales (Wegier *et al.*, 2018). Se han desarrollado más de 238 eventos transgénicos, que en su mayoría están acompañados de la resistencia a los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato (ISAAA, 2021), por lo que con estas características es posible identificar gran cantidad de semillas transgénicas de venta comercial.

En México, centro de origen y diversidad del maíz, los agricultores mantienen la continuidad de los procesos evolutivos que originan diversidad genética, lo cual ocurre en su mayoría en pequeñas y medianas unidades de producción, por lo que la conservación de gran parte del patrimonio genético y cultural depende de su adecuado manejo, producción y aprovechamiento (Bellon *et al.*, 2018). Se estima que en cada ciclo de producción  $1.38 \times 10^{11}$  plantas genéticamente diferentes contribuyen al flujo genético con alelos raros sujetos a selección (Bellon *et al.*, 2018).

Las implicaciones agroecológicas, económicas y culturales de la introgresión de transgenes en las razas nativas de maíz han sido ampliamente discutidas, principalmente en los países para los cuales el maíz es el alimento básico en todas las etapas del desarrollo humano (Álvarez-Buylla y Piñeyro-Nelson, 2009). Las consecuencias más relevantes son que se modifiquen los procesos evolutivos, la pérdida de diversidad genética que los diferencia (Bellon y Berthaud, 2006; Rojas-Barrera *et al.*, 2019), pérdida de especificidad que presentan las

razas nativas, que se presenten posibles afectaciones fisiológicas, metabólicas o cromosómicas producto de la presencia o acumulación de ADN recombinante (rADN), lo que podría causar esterilidad, anomalías fenotípicas en las estructuras florales y en la planta, que comprometerían la capacidad adaptativa, diversidad funcional y plasticidad genética de la especie (Kato-Yamakake, 2004; Vázquez-Barrios *et al.*, 2021); ésto a su vez afectará a la población mundial a medida que los beneficios de la diversidad heredada por cientos de generaciones anteriores se modifiquen de manera irreversible.

Existen varias hipótesis para explicar las vías de dispersión e introgresión de transgenes al maíz nativo, parientes silvestres y variedades mejoradas en México, como: i) la importación de grano (semilla funcional) principalmente de EUA, Brasil y Argentina, países en los cuales más del 90 % del cultivo es MGM (ISAAA, 2021), el cual eventualmente llega a destinarse para la siembra en México debido a su amplia distribución y manejo sin etiquetas, principalmente por las tiendas DICONSA y comercios a zonas rurales cuando hay escasez de semilla o el acceso a semilla certificada es limitado (Carreón-Herrera *et al.*, 2011; Dyer *et al.*, 2009); ii) la derrama de granos en caminos y vías férreas, que de prosperar en esas condiciones podrían participar en el intercambio genético con plantas aledañas o ser introducida su producción en los acervos de semilla, lo que en términos legales se denomina liberación accidental (CDHCU, 2005; 2009), lo cual se ha sugerido en diversas investigaciones (Carreón-Herrera *et al.*, 2011; Chaparro-Giraldo *et al.*, 2015; Dyer *et al.*, 2009; Landavazo *et al.*, 2006; Mercer y Wainwright, 2007; Piñeyro-Nelson *et al.*, 2009; Quist y Chapela, 2001; Turrent *et al.*, 2009); iii) la presencia de transgenes en semillas comercializadas que podrían dispersarse a través del polen al coincidir con otros maíces en su ciclo reproductivo (Peña, 2013) y iv) las siembras legales e ilegales.

Posterior a la introducción de los transgenes en el maíz nativo, la continuidad de su dispersión también se puede explicar por el manejo tradicional de las semillas, que propicia su movimiento a localidades de todo el país (Bellon y Berthaud 2006; Rojas-Barrera *et al.*, 2019; Serratos, 2009) y las características biológicas del maíz que le permiten tener gran cantidad de interacciones bióticas, incluidos sus parientes silvestres.

Con respecto a la primera hipótesis, Carreón-Herrera *et al.* (2011) analizaron 47 muestras de poblaciones nativas y 11 muestras de grano adquirido en tiendas DICONSA en la Mixteca Poblana para detectar el promotor CaMV35S, el cual estuvo presente en 36 % de las poblaciones nativas y de los lotes de grano. La presencia de insertos transgénicos en híbridos comerciales quedó confirmada

con la investigación realizada por Peña (2013), quien evaluó la presencia de CaMV35S y TNOS en híbridos colectados en los estados de México, Hidalgo y Morelos, reportando 44 % de híbridos positivos para ambos insertos transgénicos.

Estudios previos han revelado la presencia de transgenes en maíces nativos, híbridos y granos comercializados, por lo que el objetivo de esta investigación fue confirmar que los híbridos y los granos nacionales e importados son una fuente potencial de dispersión de transgenes a otras plantas a nivel nacional, para lo cual se analizó en plantas desarrolladas a partir de la germinación de híbridos y granos nacionales e importados la presencia de transgenes, proteínas recombinantes y capacidad de desarrollo a los 15 días de asperjar glifosato en la etapa V4-V5 de desarrollo vegetativo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Genético

Para el experimento de campo se utilizaron 40 híbridos comerciales de amplia distribución en México: 36 recolectados como semilla, tres comercializados como grano (recolectados en parcelas para producción de grano), grano importado (Cuadro 1) y un testigo nativo denominado M296.

### Sitio y diseño experimental

La siembra se realizó en el Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en el ciclo primavera-verano de 2013. El diseño experimental utilizado fue bloques completos al azar con tres repeticiones; se establecieron 100 plantas por parcela. Como fuente de glifosato se utilizó sal de potasio

de N-(fosfonometil) glicina, con contenido de glifosato no menor de 81.61 % (Faena Fuerte® con Transorb®) (Monsanto Comercial, 2010), en dosis de 3 L ha<sup>-1</sup>, recomendada para el cultivo de MGM, el cual se asperjó una vez cuando las plantas estaban desarrollando entre cuatro y cinco hojas verdaderas; es decir, en etapa V4-V5 de desarrollo foliar.

### Variables evaluadas

Las variables evaluadas fueron: a) frecuencia de resistencia (FR): dado que el efecto del herbicida se observa 15 días después de su aplicación, se realizó en ese tiempo un conteo de las plantas resistentes al herbicida. La FR se calculó dividiendo el número de plantas resistentes entre el número de plantas establecidas × 100, y b) nivel de daño (ND): se utilizó una escala visual para calificar el nivel de daño promedio en el híbrido debido a la acción del herbicida, con los valores 1: sin daño aparente, 2: daño del 25 % del tejido, 3: daño del 50 % del tejido, 4: daño del 75 % del tejido y 5: planta muerta con un color dorado, característico del efecto del herbicida. Se recolectaron muestras de tejido foliar de las plantas con un ND ≤ 2 y se almacenaron a -80 °C.

### Detección de proteínas recombinantes a través de inmunoensayos ELISA

Los inmunoensayos ELISA se realizaron en el laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales (CENID-COMEF) del INIFAP. Se realizó un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con un kit comercial (RR®, Ref: PSP 74000, Agdia®) para la detección de la proteína recombinante 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, CP4 (CP4/EPSPS), que confiere resistencia a glifosato, siguiendo las indicaciones del fabricante para análisis de hoja de maíz

**Cuadro 1. Procedencia de los híbridos comerciales evaluados en campo y en laboratorio para detección de insertos transgénicos.**

Estado	Año de recolecta	Genotipo
Hidalgo	2012	A7573 (A), Caimán (A), Cimarrón (A), Cobra (A), Faisán (A), Jabalí (A), Tigre (semilla y grano) (A), 33J56 (Pi), 30G40 (Pi), 30A60 (Pi), 30P16 (Pi), Dk357 (Dk), Dk2060 (Dk) y SYN1806 (SYN)
Sinaloa	2013	Dk2045 (Dk), Dk2038 (Dk), Garañón (A), Ocelote (A), P3254W (Pi), P3030 (Pi), P3050W (Pi)
Jalisco	2013	Cimarrón (A), Jabalí (grano) (A), Dk2034 (Dk)
Guanajuato	2013	Hércules (U), Vulcano (U), As823 (As), 3368W (Pi), P1884 (Pi)
México	2013	MJ8092 (A), H-40 (IC), H-48 (IC), H-52 (IC), H-51 (IC), H-57 (IC), Puma1076 (R), Puma1167 (R), Puma1183 (R)

A: Asgrow, As: Aspros, Dk: Dekalb, Pi: Pioneer, SYN: Syngenta, R: Rega, IC: INIFAP-CEVAMEX, U: UNISEM.

(máximo 30 individuos por ensayo, por duplicado). Los resultados se evaluaron con un espectrofotómetro de placas a 450 nm (Thermo Scientific Multiskan®, Waltham, Massachusetts, EUA) con ayuda del software SkanIt 3.1.0.4 RE. Los controles positivos (C<sup>+</sup>) incluidos en el kit se prepararon de acuerdo con las indicaciones del proveedor en las concentraciones para detectar individuos positivos en la muestra, de la siguiente manera: 1:1, 1:15 y 1:30. Como control negativo (C<sup>-</sup>) se utilizó el buffer preparado para las muestras (MEB), incluido en el kit.

#### Detección de ADN recombinante mediante ensayos de presencia/ausencia por PCR

La prueba cualitativa basada en ADN genómico (ADNg) se realizó en el laboratorio de Huella Genética del Colegio de Postgraduados (CP, Montecillo) en muestras representativas de semilla/grano (según correspondía) de cada híbrido seleccionado en la prueba de campo como resistente a glifosato, así como en híbridos tomados al azar, considerados para validar la prueba. Las muestras primarias de un kg de semilla/grano fueron procesadas con el método de doble cuarteo, señalado en las reglas internacionales de análisis de semillas (ISTA, 2014), con las siguientes modificaciones: la muestra se molvió hasta obtener harina muy fina, utilizando licuadoras industriales (Oster®, SKU #70230201, México). La muestra de trabajo se obtuvo colocando la muestra primaria molida distribuida homogéneamente sobre un marco de madera de medidas conocidas (40 × 40 cm), la cual fue dividida en cuadrantes, los cuales nuevamente se dividieron en cuadrantes y se realizaron submuestreos en cada cuadrante tomando una cantidad proporcional de harina de cada esquina y de la parte central, con un volumen de 2 mL por submuestra, hasta obtener la muestra representativa la cual se colocó en un tubo de 50 mL de capacidad (Falcon™, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA); todas las muestras se almacenaron a 4 °C.

La extracción del ADNg se realizó con el kit comercial ChargeSwitch™ gDNA Plant, utilizando el robot KingFisher Flex 96 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) con las siguientes modificaciones: se pesaron 150 mg de harina por muestra representativa, se agregaron 900 µL de solución de lisis y 100 µL de reactivo A (Cloruro de calcio, polivinilpirrolidona 10 %, solución de lisis), se mezcló por vibraciones y se dejó reposar durante 15 h a 4 °C para favorecer la lisis de las membranas celulares; posteriormente, se aplicaron 2 µL de RNAsa (5 mg mL<sup>-1</sup> en 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 10 mM EDTA). Las lecturas de concentración y pureza del ADNg se realizaron con un espectrofotómetro para micro volumen NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) se realizó en un termociclador (StepOne Plus, Applied Biosystems, Foster City, California, EUA). La amplificación de los fragmentos de P35S/CaMV (P35S) y TNOS/A. *tumefaciens* (TNOS) se realizó por triplicado por medio de sondas TaqMan (TaqMan® GMO Screening, Applied Biosystems, Foster City, California, EUA). La presencia del gen zein (gen endógeno presente en las plantas/Control interno) se incluyó con el fin de detectar inhibidores de la qPCR. Como control positivo (C<sup>+</sup>) se utilizó un estándar de referencia certificado por el Instituto de Materiales de Referencia y Mediciones (IRMM, Geel, Bélgica), correspondiente al evento MON863×MON810 con 1 % y como control negativo biológico (C<sup>-</sup>) se utilizó una población no resistente a glifosato previamente evaluada, denominada M296, la cual fue utilizada para todas las pruebas. Posteriormente, se realizó una validación de los resultados enviando las muestras al Centro Nacional de Referencia de Organismos Genéticamente Modificados del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (CNRDOG) para a su vez realizar la detección y cuantificación de eventos transgénicos específicos.

#### Análisis de datos

La prueba para la detección de la proteína recombinante CP4/EPSPS se analizó con base en las densidades ópticas (DO), para lo cual se determinó el punto de corte o umbral (pc), con el cual se interpreta un resultado negativo, y se validó por el método basado en el índice de muestra (IM) de cada híbrido, reportado por Aranís *et al.* (2008), utilizando las siguientes fórmulas:

$$pc = \frac{DO(C^-) + DO(C^+) + 0.150}{2}; \quad IM = \frac{DO(Híbrido)}{pc}$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Fase de campo

La prueba de campo sobre resistencia al herbicida glifosato mostró diferencias con respecto a la frecuencia de resistencia (FR) y nivel de daño (ND). Los híbridos que presentaron la mayor FR ( $\leq 0.26$ ) fueron Caimán, Tigre, Jabalí y Cobra, provenientes del estado de Hidalgo (Cuadro 2).

Los genotipos con mayor FR presentaron clorosis en puntos específicos o en las puntas de las láminas foliares, lo cual permitió observar resistencia mecánica. En cuanto al ND, el grano importado registró el menor nivel a la aplicación de glifosato, pues se observaron plantas sin

daño aparente, por lo que se debe considerar la posibilidad de que se desarrolle hasta la etapa reproductiva y tengan descendencia. Una posibilidad para explicar la resistencia natural es que su expresión fenotípica se presenta más favorablemente en genotipos adaptados a las condiciones ambientales, en este caso a Valles Altos; así mismo, se debe tomar en cuenta que se asperjó una vez el herbicida, por lo que la planta pudo haber expresado mecanismos de resistencia no relacionados con el sitio de acción, generalmente regulados por varios genes de efectos menores, lo cual permitió que se atenuara el efecto del glifosato (Cruz-Hipólito *et al.*, 2010).

#### Fase de laboratorio, detección de ADN recombinante mediante PCR

El ensayo de presencia/ausencia de los insertos por ingeniería genética mostró una lectura correcta de los controles y el gen *zein* (endógeno de la planta). Los resultados indicaron la presencia de P35S y TNOS en el híbrido Jabalí (muestra de grano) y en el grano importado.

#### Detección de proteínas recombinantes a través de inmunoensayos ELISA

La prueba de ELISA para detección de CP4/EPSPS mostró que los controles fueron leídos correctamente con base en ambos métodos de interpretación (Aranís *et al.*, 2008). La mayoría de los híbridos evaluados mostraron ausencia de la proteína recombinante; sin embargo, el híbrido Jabalí (muestra de grano) presentó un resultado indeterminado ( $DO = 0.126$ ) en repetidas ocasiones (Cuadro 3), mientras que el grano importado resultó negativo. Los resultados anteriores pueden deberse a la fenolización por procesos de oxidación, lo cual pudo haber degradado la proteína recombinante, por lo que puede requerirse una verificación formal del evento específico.

Se debe considerar que la prueba basada en proteínas recombinantes tiene la ventaja de confirmar la expresión del rADN, con la restricción de que se analiza menor cantidad de muestras por prueba y cuando los resultados son negativos o indeterminados se requiere confirmar por pruebas basadas en ADN. Las plantas de maíz podrían tener resistencia al glifosato, como ocurre en algunas malezas

**Cuadro 2. Frecuencia de resistencia a glifosato en campo, INIFAP-CEVAMEX ciclo P/V, 2013.**

Híbrido	FR	ND	Híbrido	FR	ND
Caimán	0.26	2	Dk 2034	0.06	3
Tigre	0.25	2	P 3050W	0.05	3
Jabalí	0.23	2	H-52	0.05	3
Cobra	0.21	2	Vulcano	0.05	3
H-48	0.19	3	Faisán	0.05	3
Garañón	0.17	2	MJ 8092	0.05	3
Cimarrón	0.17	2	As 823	0.04	3
P 33J56	0.16	3	H-51	0.04	3
P 30G40	0.15	3	P 30p16	0.04	3
Jabalí <sup>†</sup>	0.15	2	Hércules	0.04	3
A7573	0.13	3	Puma 1076	0.03	3
Cimarrón <sup>†</sup>	0.13	3	Puma 1167	0.03	3
Importado <sup>†</sup>	0.13	1	H-40	0.03	3
Dk 2060	0.12	2	Puma 1183	0.03	3
Dk 2038	0.12	3	Tigre <sup>†</sup>	0.02	3
Ocelote	0.10	3	P 1884	0.02	3
P 3254W	0.09	3	H-57	0.02	4
Dk 2045	0.09	3	30A60	0.01	4
P 3030	0.07	3	SYN 1806	0.01	4
Dk 357	0.07	4	P 3368W	0.01	4

<sup>†</sup>Recolecidos como grano. FR: frecuencia de resistencia de cada híbrido, ND: nivel de daño en escala visual.

que aumentan su frecuencia de sobrevivencia al herbicida por presión de selección, por lo que es necesario confirmar la ausencia de transgenes, ya que otros mecanismos son más complejos de confirmar, como la sobreexpresión de la proteína EPSPS y la pérdida de afinidad del sitio de acción (Cruz-Hipólito et al., 2010).

El híbrido Jabalí provino de la zona de la Ciénega de Chapala, considerada como la de mayor producción de maíz en el estado de Jalisco, por lo que se debe poner especial atención a la semilla utilizada. Resultados similares fueron reportados en la investigación realizada por Peña (2013), demostrando la presencia de proteínas recombinantes en el 44 % de los híbridos recolectados en los estados de Hidalgo y Estado de México. En otro estudio elaborado por Dyer et al. (2009), en el cual realizaron inmunoensayos en una muestra de semillas de agricultores a nivel nacional, se detectó la presencia de las proteínas recombinantes Cry1Ab/Ac y CP4/EPSPS en 3.1 % y 1.8 % de las muestras respectivamente, ubicadas más frecuentemente en el sureste (SE) y la región centro-oeste (CO) del país. Los autores mencionaron que la difusión de semillas y granos importados podría explicar la frecuencia y distribución de transgenes en la región CO de México.

#### Validación de los resultados por el CNROGM-SENASICA

El informe emitido por el CNROGM (SMEC-IN-IROGM01 #IR-15/2015) validó los resultados obtenidos en los ensayos de presencia/ausencia por qPCR, además de detectar y cuantificar eventos específicos en los genotipos que resultaron positivos (Cuadro 4).

**Cuadro 3. Prueba cualitativa de ELISA con base en la densidad óptica (DO) e índice de muestra (IM) en híbridos con resistencia a glifosato evaluados en campo.**

Híbrido	DO	IM	Híbrido	DO	IM	Híbrido	DO	IM			
Buffer	0.046	0.240	-	Cobra	0.064	0.333	-	Jabalí <sup>†</sup>	0.126	0.656	(+/-)
C- M296	0.038	0.198	-	DK 2060	0.053	0.276	-	MJ 8092	0.042	0.219	-
C <sup>+</sup> 1:1	0.874	4.552	+	DK 2034	0.043	0.224	-	Ocelote	0.049	0.255	-
C <sup>+</sup> 1:15	0.777	4.047	+	DK 2038	0.049	0.255	-	Tigre	0.047	0.245	-
C <sup>+</sup> 1:30	0.675	3.516	+	DK 2045	0.054	0.281	-	30A60	0.072	0.375	-
As 823	0.041	0.214	-	Garañón	0.081	0.422	-	30G40	0.068	0.354	-
A 7573	0.045	0.234	-	H-48	0.045	0.234	-	33J56	0.059	0.307	-
Caimán	0.049	0.255	-	H-52	0.042	0.219	-	Vulcano	0.048	0.250	-
Cimarrón	0.085	0.443	-	Importado <sup>†</sup>	0.078	0.406	-				
Cimarrón <sup>†</sup>	0.088	0.458	-	Jabalí	0.036	0.188	-				

<sup>†</sup>Recolectados como grano. Interpretación por DO (RR® Agdia®, 2013): Positivo (> 0.3), Negativo (< 0.1), Indeterminado (0.3 a 0.1), Controles: C<sup>+</sup> (> 0.6), C- (< 0.3). Interpretación por IM (Araní et al., 2008): Positivo (> 1.1), Negativo (< 0.9), Indeterminado (1.1 a 0.9), +/-: Resultado indeterminado con base en DO.

Los resultados de la prueba de campo con el umbral mencionado fueron congruentes con las confirmaciones obtenidas en el CNROGM. El híbrido Jabalí (muestra de grano) en campo tuvo una sobrevivencia moderada, un resultado por ELISA indeterminado y por qPCR positivo para los eventos MON89034 (resistencia a lepidópteros, dos genes insertados con *Agrobacterium tumefaciens*), TC1507 (tolerancia a glufosinato y resistencia a lepidópteros, en dos genes insertados por biobalística) y MON810 (tolerancia a glifosato, resistencia a lepidópteros y resistencia a antibióticos, en cuatro transgenes insertados por biobalística) (< 0.1 % en cada caso).

Los porcentajes encontrados representan tres semillas kg<sup>-1</sup> con secuencias repetidas de cada evento o ~ 60 a 75 semillas en un costal de 25 kg o 60,000 unidades, lo que indica la importancia de trabajar sobre los límites de detección o umbrales que podrían ser usados para detectar liberaciones accidentales y realizar monitoreo constante en localidades donde se siembran híbridos comerciales. Es relevante afirmar que en esta investigación ningún resultado fue falso positivo en las pruebas realizadas en campo ni en laboratorio, lo que prueba que las herramientas de campo y detección por ADN podrían ser adaptadas para continuar usándose juntas cuando se considere necesario.

Es importante mencionar que los eventos contenidos en el híbrido Jabalí (muestra de grano) fueron autorizados para siembras experimentales en los años 2005 (MON810 y TC1507), 2009, 2010, 2011 y 2012, en los estados de Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Coahuila, Durango, Chihuahua, Nayarit, Jalisco y Baja California Sur,

Cuadro 4. Detección y cuantificación de eventos transgénicos realizadas en CNRDOG-M-SENASICA, 2015.

Híbrido	P35S <sup>†</sup>	TNOS	Evento específico	%	Genes introducidos	Resistencia/tolerancia
Jabalí	< 0.1 %	+	MON-89034-3 <sup>¶</sup> (MON89034)	< 0.10	<i>Cry2Ab2;</i> <i>Cry1A.105</i>	Lepidópteros
			DAS-01507-1 (TC1507) <sup>¶</sup>	< 0.10	<i>Cry1Fa2; pat</i>	Glufosinato de amonio y lepidópteros
			MON-00810-6 (MON810) <sup>¶</sup>	< 0.10	<i>Cry1Ab; goxv247;</i> <i>epsps (aroA:CP4);</i> <i>nptll</i>	Glifosato y lepidópteros, neomicina, kanamisina.
			MON-89034-3 <sup>¶</sup> (MON89034)	26.42	<i>Cry2Ab2;</i> <i>Cry1A.105</i>	Lepidópteros
			MON-00810-6 (MON810) <sup>¶</sup>	2.28	<i>Cry1Ab; goxv247;</i> <i>epsps (aroA:CP4);</i> <i>nptll</i>	Glifosato, lepidópteros, neomicina, kanamisina.
			MON-88017-3 <sup>¶</sup> (MON88017)	0.16	<i>epsps (aroA:CP4);</i> <i>Cry3Bb1</i>	Glifosato y coleópteros
Importado	78.97 %	+	MON-00603-6 (NK603) <sup>¶</sup>	18.13	<i>epsps (aroA:CP4)</i>	Glifosato
			DAS-01507-1 (TC1507) <sup>††,¶</sup>	> 10.00 <sup>††</sup>	<i>Cry1Fa2; pat</i>	Glufosinato de amonio y lepidópteros
			SYN-BT011-1 (Bt11) <sup>¶</sup>	8.67	<i>pat; Cry1Ab</i>	Glufosinato de amonio y lepidópteros
			MON-00021-9 (GA21) <sup>¶</sup>	0.78	<i>mepsps (epsps modificada)</i>	Glifosato
			SYN-IR162-4 (MIR162) <sup>¶</sup>	4.78	<i>vip3Aa20; pmi</i>	Lepidópteros, metaboliza la manosa

<sup>†</sup>Los porcentajes de P35S/TNOS son independientes del porcentaje de cada evento, debido a que se analizan de manera independiente con material de referencia certificado específico y el resultado es con base en una curva estándar de cuantificación. <sup>††</sup>La muestra contiene un porcentaje >10 % de DAS-01507-1; sin embargo, no se cuenta con un material de referencia de mayor porcentaje para determinar la cantidad exacta. <sup>¶</sup>Permitido en México para consumo. Fuente: ISAAA (2021).

autorizados de manera individual o como eventos apilados los eventos TC1507×MON810 (2010, 2011 y 2012) y TC1507×MON89034×MON603 en el año 2012 (CIBIOGEM, 2021). Cabe resaltar que los eventos encontrados se localizan en un contexto genético (grano) diferente a la semilla aprobada para siembra, en lugares donde nunca se ha aprobado la liberación al ambiente y con alta probabilidad de encontrarse en esta o siguientes generaciones apilados en combinaciones tampoco evaluadas con anterioridad, sobre todo en maíces con manejo tradicional en áreas cercanas. Es necesario continuar este tipo de investigación para diseñar las estrategias de prevención, contención y

mitigación de las consecuencias de estas liberaciones en el entorno para evitar que afecten los procesos evolutivos que mantienen la diversidad del maíz en México.

En los análisis por qPCR realizados en el CNROGM, el grano importado fue positivo para ocho eventos específicos permitidos en México, para consumo alimenticio directo o como aditivo en alimentos (ISAAA, 2021). Algunos eventos fueron detectados en porcentajes altos, como MIR162 (4.78 %), Bt11 (8.67 %), TC1507 (> 10.0 %), NK603 (18.13 %) y MON89034 (26.42 %) (Cuadro 4). La importación de MGM al país, con su posterior distribución

en las condiciones actuales contribuye a la introgresión de transgenes a razas nativas y variedades mejoradas usadas en las zonas rurales del país, lo que confirma la hipótesis sobre la dispersión de transgenes en México por esta vía y valida los hallazgos reportados por Carreón-Herrera *et al.* (2011).

El registro de introgresión por esta vía hacia el maíz nativo está fuera de la cuantificación de liberaciones accidentales que se reportan ante la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM), asociado a que éstos pueden contener eventos para los cuales las técnicas de detección en el CNRDOG estén sin estandarizar. Un ejemplo de posibles omisiones es el evento TC1507, en el cual la notación de la cuantificación fue \* > 10 % (Cuadro 4); es decir, mayor al material de referencia utilizado, pues no se contaba con una referencia de mayor porcentaje para determinar la cantidad exacta de copias de este evento, por lo que la discusión sobre la mejor combinación de herramientas para la detección debe ser abordada según las instituciones, tiempos y circunstancias.

Detectar hasta un individuo transgénico en 3000 (un grano en un kg de semilla/grano) es posible por qPCR, pero se requiere infraestructura costosa y alta especialización para su uso e interpretación de los resultados. Sembrar 300 o hasta 3000 semillas seleccionadas al azar por genotipo es una actividad que pueden realizar los agricultores y agrónomos con facilidad en una gran cantidad de espacios, incluso donde surjan dudas, para eliminar sospechas o seleccionar los materiales mínimos a analizar con biología molecular.

Los procesos que originan y mantienen la diversidad del maíz en México son únicos a nivel mundial, por lo que se debe asegurar su continuidad sin la presencia de transgenes. Las consecuencias fenotípicas, ecológicas y evolutivas de la presencia de transgenes en los maíces nativos y su entorno deben ser también investigadas. En el trabajo de Álvarez-Buylla y Piñeyro-Nelson (2009) se documentaron cambios fenotípicos inesperados en plantas de *Arabidopsis* causados por la transformación con ingeniería genética, y posteriormente, Hernández-Terán *et al.* (2017) demostraron cambios similares en maíz, calabaza, arroz, canola y girasol, por lo que se debe prevenir la dispersión de transgenes, así como detectar, monitorear y mitigar sus consecuencias con el objetivo de mantener la biodiversidad en México. En este trabajo se utilizaron métodos que arrojan resultados confiables y rápidos, por lo que esta información puede contribuir a la toma de decisiones en materia de bioseguridad y conservación del maíz.

## CONCLUSIONES

La presencia de eventos específicos en granos comercializados constituye una vía potencial de dispersión de transgenes al maíz nativo, pues estos granos nacionales e importados son semillas viables, dada su capacidad de desarrollo, expresión de proteínas recombinantes y funcionalidad comprobada de los transgenes de resistencia al glifosato. Los porcentajes de los eventos reportados en el grano híbrido de Jabalí sugieren la liberación accidental de maíz genéticamente modificado al medio ambiente y la capacidad de expresar proteínas recombinantes; es decir, la permanencia de los eventos en este genotipo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de Maestría en Ciencias de la primera autora. Al Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX-INIFAP), por facilitar la realización de la prueba discriminante en campo. Al programa de Recursos Genéticos y Productividad-Genética y al laboratorio de Huella Genética (CP, Montecillo), por facilitar la realización de los ensayos por qPCR. A los laboratorios de Biotecnología del CENID-COMEF y de Genómica Funcional y Sistemas del IBUNAM (CONACYT INFR2016-268109), por facilitar la realización de los inmunoensayos ELISA. Al Dr. Leobigildo Córdova Téllez y Dr. Amilio Santacruz Varela, por el financiamiento para los análisis de qPCR y la validación en el CNRDOG-SENASICA. Al programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica PAPIIT IT201618 e IN214719 de la UNAM.

## BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez-Buylla E. y A. Piñeyro-Nelson (2009) Riesgos y peligros de la dispersión de maíz transgénico en México. *Ciencias* 92-93:82-96.
- Araníz J. C., J. Oporto C., M. Espinoza, I. Riedel K., C. Pérez C. y P. García C. (2008) Utilidad de la determinación de anticuerpos IgG e IgM por ELISA e inmunocaptura en una serie clínica de brucelosis humana. *Revista Chilena de Infectología* 25:116-121, <https://doi.org/10.4067/S0716-10182008000200006>
- Bellon M. R. and J. Berthaud (2006) Traditional Mexican agricultural systems and the potential impacts of transgenic varieties on maize diversity. *Agriculture and Human Values* 23:3-14, <https://doi.org/10.1007/s10460-004-5861-z>
- Bellon M. R., A. Mastretta-Yanes, A. Ponce-Mendoza, D. Ortiz-Santamaría, O. Oliveros-Galindo, H. Perales, ... and J. Sarukhán (2018) Evolutionary and food supply implications of ongoing maize domestication by Mexican campesinos. *Proceedings of Royal Society B* 285:20181049, <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1049>
- Carreón-Herrera N. I., H. López-Sánchez, A. Gil-Muñoz, P. A. López, M. A. Gutiérrez-Espinoza y E. Valadez-Moctezuma (2011) Flujo genético entre maíces comercializados por DICONSA y poblaciones nativas de la Mixteca Poblana. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2:939-953.
- CDHCU, Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión (2005) Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.

- Diario Oficial de la Federación. 18 de marzo de 2005. México, D. F. pp:54-85.
- CDHCU, Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión (2009)** Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Diario Oficial de la Federación. 6 de marzo de 2009. México, D. F. pp:1-30.
- Chaparro-Giraldo A., J. T. Blanco M. and S. A. López-Pazos (2015)** Evidence of gene flow between transgenic and non-transgenic maize in Colombia. *Agronomía Colombiana* 33:297-304, <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v33n3.51501>
- CIBIOGEM, Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (2021)** Inscripción de solicitudes de permisos de liberación al ambiente de organismos genéticamente modificados. Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados. Ciudad de México. <https://www.conacyt.gob.mx/cibiofem/index.php/solicitudes/permisos-de-liberacion> (Marzo, 2021).
- Cruz-Hipólito H., J. A. Domínguez-Valenzuela y R. De Prado (2010)** Mecanismos de resistencia de malezas a herbicidas. In: Resistencia de Plantas a Herbicidas. J. A. Domínguez V. y J. L. Medina P. (eds.). Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México, pp:48-60.
- Dyer G. A., J. A. Serratos-Hernández, H. R. Perales, P. Gepts, A. Piñeyro-Nelson, A. Chávez, ... and E. Alvarez-Buylla (2009)** Dispersal of transgenes through maize seed systems in Mexico. *PLoS ONE* 4:e5734, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005734>
- Hernández-Terán A., A. Wegier, M. Benítez, R. Lira and A. E. Escalante (2017)** Domesticated, genetically engineered, and wild plant relatives exhibit unintended phenotypic differences: a comparative meta-analysis profiling rice, canola, maize, sunflower, and pumpkin. *Frontiers in Plant Science* 8:2030, <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02030>
- ISAAA, International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (2021)** GM approval database in Mexico for food and feed, direct use or additive. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Ithaca, New York, USA. <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp/> (March, 2021).
- ISTA, International Seed Testing Association (2014)** Testing for seeds of genetically modified organisms. In: International Rules for Seed Testing. The International Seed Testing Association. Zurich, Switzerland. pp:19-1-19-8.
- Kato-Yamakake T. A. (2004)** Variedades transgénicas y el maíz nativo en México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo* 1:101-109.
- Landavazo G. D. A., K. G. Calvillo A., E. Espinosa H., L. González M., F. Aragón C., I. Torres P., ... y M. A. Mora A. (2006)** Caracterización molecular y biológica de genes recombinantes en maíz criollo de Oaxaca. *Agricultura Técnica en México* 32:267-279.
- Mercer K. L and J. D Wainwright (2007)** Gene flow from transgenic maize to landraces in Mexico: an analysis. *Agriculture Ecosystems & Environment* 123:109-115, <https://doi.org/10.1016/j.agee.2007.05.007>
- Monsanto Comercial (2010)** Guía técnica para el uso de tecnologías Monsanto Soya Solución Faena®. Monsanto Comercial. México, D. F. 59 p.
- Peña B. S. D (2013)** Presencia de proteína transgénica y su efecto sobre el contenido de taninos y aflatoxinas en maíz comercial. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4:485-490, <https://doi.org/10.29312/remexca.v4i3.1209>
- Piñeyro-Nelson A., J. Van Heerwaarden, H. R. Perales, J. A. Serratos-Hernández, A. Rangel, M. B. Hufford, ... and E. R. Alvarez-Buylla (2009)** Transgenes in mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Molecular Ecology* 18:750-761, <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03993.x>
- Quist D. and I. H. Chapela (2001)** Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature* 414:541-543, <https://doi.org/10.1038/35107068>
- Rojas-Barrera I. C., A. Wegier, J. J. Sánchez G., G. L. Owens, L. H. Rieseberg and D. Piñero (2019)** Contemporary evolution of maize landraces and their wild relatives influenced by gene flow with modern maize varieties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116:21302-21311, <https://doi.org/10.1073/pnas.1817664116>
- Serratos H. J. A. (2009)** Bioseguridad y dispersión de maíz transgénico en México. *Ciencias* 92-93:130-141.
- urrent F. A., J. A. Serratos H., H. Mejía A. y A. Espinosa C. (2009)** Liberación comercial de maíz transgénico y acumulación de transgenes en razas de maíz mexicano. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32:257-263, <https://doi.org/10.35196/fm.2009.4.257>
- Vázquez-Barrios V., K. Boege, T. G. Sosa-Fuentes, P. Rojas and A. Wegier (2021)** Ongoing ecological and evolutionary consequences by the presence of transgenes in a wild cotton population. *Scientific Reports* 11:1959, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81567-z>
- Wegier A., V. Alavez, J. Perez-López, L. Calzada and R. Cerritos (2018)** Beef or grasshopper hamburgers: the ecological implications of choosing one over the other. *Basic and Applied Ecology* 26: 89-100, <https://doi.org/10.1016/j.baae.2017.09.004>