



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GENÉTICA**

## **RESISTENCIA A GLIFOSATO EN MAÍCES NATIVOS DE VERACRUZ E HÍBRIDOS COMERCIALIZADOS EN MÉXICO**

**VIRIDIANA TREJO PASTOR**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

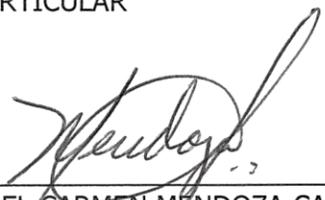
2014

La presente tesis titulada: "**RESISTENCIA A GLIFOSATO EN MAÍCES NATIVOS DE VERACRUZ E HÍBRIDOS COMERCIALIZADOS EN MÉXICO**" realizada por la alumna: VIRIDIANA TREJO PASTOR bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

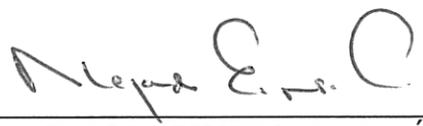
MAESTRA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GENÉTICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:

  
\_\_\_\_\_  
DRA. MA. DEL CARMEN MENDOZA CASTILLO

DIRECTOR DE TESIS:

  
\_\_\_\_\_  
DR. ALEJANDRO ESPINOSA CALDERÓN

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
DR. TAKEO ÁNGEL KATO YAMAKAKE

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Septiembre de 2014

---

## *AGRADECIMIENTOS*

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Colegio de Postgraduados, por haber financiado parte de mi formación; gracias a los millones de mexicanos (as) que pagan impuestos.

Al Comité de Becas del Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por la beca otorgada para la culminación de mi tesis.

A mi Consejo Particular: Dra. Ma. del Carmen Mendoza Castillo, Dr. Takeo Ángel Kato Yamakake y Dr. Alejandro Espinosa Calderón; por el esfuerzo, dedicación, tiempo y apoyo que me han brindado, pero sobre todo por la infinita paciencia para conmigo.

A la Dra. Ana Wegier, y su equipo de trabajo por su apoyo en la fase de laboratorio en el CENID-COMEF (INIFAP) y por brindarme su confianza.

A la M.C. Margarita Tadeo Robledo y al equipo de semillas de la carrera de Ingeniería Agrícola de la FESC-UNAM, por su apoyo en el primer ensayo en campo de este proyecto

A la Dra. Micaela de la O Olán y su equipo de trabajo por su apoyo en la fase de campo y por su amistad.

Al Dr. Amalio Santacruz Varela y su equipo de trabajo por su apoyo en lo que promete ser otro capítulo de esta investigación y por su amistad.

Al Dr. Jesus García Zavala por su apoyo en la revisión de los Abstracts.

Al Ing. Victor Trinidad Morales, Ing. Luis Antonio López y a mis amigos de la carrera de Ingeniería Agrícola de la FESC-UNAM. A Quique, Israel, Ana, Shavi y Chucho (Procoros), a Braulio, Anny, Edgardo, Toño, Bere y demás amigos que me regalaron muy buenos momentos en esta etapa de mi vida.

## *DEDICATORIA*

A mi padre José Guadalupe Trejo Moreno, por enseñarme los valores con los que me conduzco, gracias a ti he llegado hasta este punto. Sé que darme lo que necesitaba muchas veces representó para ti y mamá muchos sacrificios y quiero que sepan que haré honor a lo que eso representa. Hoy te digo que este camino que elegí me ha traído grandes satisfacciones y que este logro es gracias a tu apoyo y confianza.

A mi madre N. Ruth Pastor Cortés, por heredarme esa sangre revolucionaria que me hace tener empatía para la situación del agro mexicano, por la dedicación y el amor con los que todos los días nos cobijas y por sacrificar muchos sueños y oportunidades para estar con nosotros. Gracias por ser la hermosa persona que eres y por tus sabios consejos.

Quiero que sepan que el logro mío es gracias a ustedes y que son mi único ideal.

A mis hermanos, Ing. Ruth, José Alberto y Jorge Eduardo Trejo Pastor, por su ejemplo, amor y apoyo en todo momento. Saben que siempre contarán conmigo, estoy orgullosa de sus logros personales y profesionales y del coraje con el que todos los días se levantan para darle con todo a la vida. Los amo

Al Ing. Juan Arias Urbán por su apoyo incondicional en esta etapa de mi vida, gracias por tu paciencia, entusiasmo y alegría que te caracterizan. Hoy se cierra un capítulo en mi vida del que formaste una parte importante. Gracias

## RESISTENCIA A GLIFOSATO EN MAÍCES NATIVOS DE VERACRUZ E HÍBRIDOS COMERCIALIZADOS EN MÉXICO

Viridiana Trejo Pastor, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014

A nivel mundial, el evento transgénico para resistencia a herbicida es el más usado; es por ello que el presente trabajo tuvo como objetivo definir la frecuencia de resistencia a la aplicación de glifosato en campo en poblaciones nativas de maíz e híbridos con mejoramiento genético convencional, para detectar una posible introgresión transgénica. Se establecieron en campo 45 registros de maíz nativo de Veracruz; seis registros donados por el CIMMYT y 40 híbridos comerciales; fueron asperjados con glifosato una ocasión, utilizando la dosis recomendada ( $3\text{L ha}^{-1}$ ), en etapa V4-5. Siete registros de Veracruz; dos registros del CIMMYT y 15 híbridos comerciales, tuvieron la mayor frecuencia de resistencia a glifosato en campo (0.10 a 0.33). En total 42 materiales se analizaron en laboratorio con una prueba específica (ELISA) para detección de la proteína recombinante CP4/EPSPS. Los C<sup>+</sup> resultaron positivos con base en el índice de muestra (*IM*) con valores de 3.6 a 4.7 y densidad óptica (*DO*) de 0.68 a 0.87 y el C<sup>-</sup> biológico resultó negativo a la prueba con valores de *DO* entre 0.03 a 0.04 e *IM* de 0.20, donde el punto de corte fue de 0.188. El registro 290 de la raza Tuxpeño, reaccionó a la proteína transgénica por ambos métodos de interpretación (*DO* = 0.77 e *IM* = 4.09) a 450 nm, lo que coincidió con la prueba en campo; en tanto el híbrido Jabalí F<sub>2</sub> (Asgrow®) mostró un resultado indeterminado por *DO* (0.13), lo que podría tratarse de un híbrido reactivo a la proteína recombinante enmascarada. Dada la clara resistencia a glifosato es necesario elucidar los resultados mediante RT-PCR.

Palabras clave: *Zea mays*, L., glifosato, semillas nativas, híbridos comerciales, ELISA, CP4/EPSPS.

## GLYPHOSATE RESISTANCE SCREENING IN MAIZE LANDRACES FROM VERACRUZ AND HYBRID COMMERCIALIZED IN MEXICO

Viridiana Trejo Pastor, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014

Worldwide, the transgenic event for herbicide resistance is the most used; that is why the present study aimed to define the frequency of resistance to glyphosate application on field corn in native populations and hybrids with conventional breeding, in order to detect a possible transgenic introgression. Thus, 45 native landraces from Veracruz; six accessions donated by CIMMYT incremented in COLPOS and 40 commercial hybrids were established in field and sprayed with glyphosate with a recommended dose (3L ha<sup>1</sup>) in the phenological step V4-5. Seven native landraces from Veracruz; two accessions from CIMMYT increased in COLPOS and 15 commercial hybrids in particular from Hidalgo, had the highest frequency of glyphosate resistance in field (0.10 to 0.33). In total 42 materials were tested in the laboratory with a specific test (ELISA) for detection of the recombinant protein CP4/EPSPS. The C<sup>+</sup> were positive based on the sample index (*SI*) with values of 3.6 to 4.7 and Optical Density (*OD*) of 0.68 to 0.87 and biological C<sup>-</sup> was negative to the test with *OD* values between 0.03 to 0.04 and *SI* of 0.20, where the *cut off* was 0.188 at 450 nm. The native landrace 290 belonging to the Tuxpeño race reacted to the protein by both methods of interpretation (*OD*= 0.77 and the *SI*= 4.09) at 450 nm; while the hybrid Jabalí F<sub>2</sub> (Asgrow<sup>®</sup>) showed an indeterminate result according to *OD* (0.13), which could be a hybrid reactive masked to the recombinant protein. Given the clear resistance to glyphosate, it is necessary to elucidate the results by RT-PCR.

Key words: *Zea mays*, L., glyphosate, native seeds, commercial hybrids, ELISA, CP4/EPSPS.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	ix
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	x
<b>RESUMEN GENERAL</b>	v
<b>GENERAL ABSTRACT</b>	vi
<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	
1.1. Importancia del maíz en México	1
1.2. Reseña de los cultivos genéticamente modificados a nivel mundial	2
1.3. Modo de acción del Glifosato	3
1.4. Organismos genéticamente modificados resistentes a herbicidas (RH)	4
1.5. Cómo funciona la tecnología RoundUp Ready (RR) en cultivos transgénicos	5
1.6. Efectos adyacentes del uso de OGM-RH	6
1.6.1. Incremento de plantas resistentes a herbicidas	6
1.6.2. Daños a la salud	7
1.6.3. Daños toxicológicos y ambientales	8
1.7. Siembra de Organismos Genéticamente Modificados en México	10
1.8. Principales fuentes de introgresión transgénica al maíz nativo en México	12
1.9. Detección de Organismos Genéticamente Modificados	16
<b>1.10. OBJETIVOS</b>	18
<b>1.11. HIPÓTESIS</b>	19
<b>1.12. LITERATURA CITADA</b>	20
<b>II. CAPÍTULO 1: RESISTENCIA A GLIFOSATO EN MAÍCES NATIVOS DE VERACRUZ</b>	
<b>2.1. RESUMEN</b>	22
<b>2.2. ABSTRACT</b>	23
<b>2.3. INTRODUCCIÓN</b>	24
2.3.1. Objetivo	28
2.3.2. Hipótesis	28
<b>2.4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
2.4.1. Material genético	29
2.4.2. Localidad	33
2.4.3. Diseño experimental	33
2.4.4. Variables evaluadas	34
2.4.5. Detección de proteínas recombinantes	35
2.4.6. Análisis estadístico	36

---

	Pág.
<b>2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
2.5.1. Prueba de campo	38
2.5.1.1. Nivel de daño en la planta	41
2.5.2. Detección de proteínas recombinantes	43
<b>2.6. CONCLUSIONES</b>	49
<b>2.7. LITERATURA CITADA</b>	50
<b>III. CAPITULO 2: RESISTENCIA A GLIFOSATO EN HÍBRIDOS COMERCIALES DE MAÍZ DISTRIBUIDOS EN MÉXICO</b>	
<b>3.1. RESUMEN</b>	53
<b>3.2. ABSTRACT</b>	54
<b>3.3. INTRODUCCIÓN</b>	55
3.3.1. Objetivo	59
3.3.2. Hipótesis	59
<b>3.4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.4.1. Material genético	60
3.4.2. Localidad	61
3.4.3. Diseño experimental	61
3.4.4. Variables evaluadas	62
3.4.5. Detección de proteínas recombinantes	63
3.4.6. Análisis estadístico	63
<b>3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	65
3.5.1. Prueba de campo	65
3.5.2. Detección de proteínas recombinantes	68
<b>3.6. CONCLUSIONES</b>	72
<b>3.7. LITERATURA CITADA</b>	73
<b>IV. DISCUSIÓN GENERAL</b>	78
<b>V. CONCLUSIONES GENERALES</b>	80
<b>VI. APÉNDICE</b>	82

## ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1A. Pruebas de campo por cultivo GM (1988 a 2005).....	11
Cuadro 2A. Permisos de liberación al ambiente por cultivo GM.....	11
Cuadro 3A. Permisos de liberación al ambiente de OGM.....	11
Cuadro 1B. Registros de maíz nativo de Veracruz evaluados para resistencia a glifosato en campo.....	30
Cuadro 2B. Interpretación de resultados del ensayo de inmunodetección.....	36
Cuadro 3B. Análisis de varianza de maíces nativos para FR a glifosato.....	37
Cuadro 4B. Comparación de medias en 53 materiales evaluados para resistencia a glifosato en campo.....	39
Cuadro 5B. Prueba cualitativa de ELISA con base en la Densidad Óptica ( <i>DO</i> ) de poblaciones nativas de maíz.....	43
Cuadro 1C. Híbridos comerciales evaluados en campo para resistencia a glifosato.....	60
Cuadro 2C. Interpretación de los resultados de la prueba cualitativa de ELISA por el método de interpretación de <i>DO</i> e <i>IM</i> .....	64
Cuadro 3C. Análisis de varianza para frecuencia de resistencia en híbridos comerciales.....	65
Cuadro 4C. Comparación de medias por el método de diferencias mínimas LSD de 40 híbridos evaluados en campo para FR.....	66
Cuadro 5C. Comparación de tres híbridos obtenidos en dos localidades evaluados para resistencia a glifosato en campo.....	68
Cuadro 6C. Prueba cualitativa de ELISA con base en la Densidad Óptica ( <i>DO</i> ), en híbridos resistentes a glifosato probados en campo.....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1A: Absorción y translocación del herbicida glifosato.....	4
Figura 1B. Sitios de recolecta del proyecto FZ016.....	29
Figura 2B. Escala visual de los niveles de daño 15 dda., en las poblaciones de maíz nativas probadas en campo.....	41
Figura 3B. Prueba cualitativa (ELISA) con genotipos resistentes a glifosato en campo con base en el Índice de muestra ( <i>IM</i> ).....	45
Figura 4B. Localidades de los 45 registros de maíces nativos de Veracruz, evaluados en la prueba de campo.....	46
Figura 1C. Prueba cualitativa ELISA con base en el Índice de muestra ( <i>IM</i> ) en híbridos resistentes a glifosato probados en campo.....	71

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1. Importancia del maíz en México

El maíz (*Zea mays*, L.) es un cultivo con unos ocho mil años de antigüedad, su centro de origen es México y se considera que en su territorio es donde existe la máxima diversidad genética de esta especie (Kato *et al.*, 2009). A nivel nacional, es el cultivo más importante, alrededor de 3.8 millones de agricultores producen anualmente más de 23 millones de toneladas de maíz, que equivalen a 60 % del total de granos producidos en el país, en 8.5 millones de hectáreas. El 85 % de los productores tienen parcelas menores a cinco hectáreas y el 75 % de éstos siembran variedades de maíz nativas, lo cual es fundamental en la alimentación y economía del país (Serratos, 2009; Turrent, 2010). El consumo *per cápita* es de 123 kg, cifra muy superior al promedio mundial (16.8 kg) (AgroDer, 2012). Desde el punto de vista alimenticio, industrial, político y social, el maíz es el cultivo más importante, tanto que para los antiguos mexicanos era la materia misma con la que el género humano fue creado, lo cual le otorga un valor cosmogónico. Representa 55 % de la ingesta calórica y 22 % de la proteína diaria de los mexicanos (AgroDer, 2013). Los principales Estados productores son: Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Chiapas, Guerrero, Veracruz, Guanajuato, Chihuahua, Puebla, Oaxaca e Hidalgo (SIAP-SAGARPA, 2013).

Dada la importancia de este cultivo en México y en el mundo es pertinente el estudio de la interacción genética entre las más de 63 razas nativas, los híbridos comerciales y los maíces genéticamente modificados (MGM). En años recientes se han realizado pocas investigaciones, sin embargo estas investigaciones han servido para dar una idea de lo que está ocurriendo en torno al intercambio genético entre el maíz nativo y el MGM.

## 1.2. Reseña de los cultivos genéticamente modificados a nivel mundial

El Servicio para la Adquisición de Aplicaciones Agro-biotecnológicas (ISAAA) señala que, según los datos de adopción de cultivos transgénicos en el mundo, el cultivo con el mayor número de eventos aprobados para siembra es el maíz (60), seguido del algodón (35), colza (15), papa y soya (14 cada uno). El evento que ha recibido autorización en mayor número de países es la soya tolerante a herbicidas GTS- 40-3-2, con 23 autorizaciones (los 27 países que integran la Unión Europea se consideran como una sola autorización), seguido del maíz tolerante a herbicidas NK603 y del maíz resistente a insectos MON-810, con 20 autorizaciones cada uno, y el algodón resistente a insectos MON531/757/1076, con 16 autorizaciones en todo el mundo (James, 2010).

En la actualidad se tienen registrados 59 eventos para el cultivo de maíz de las transnacionales: Monsanto Company; Syngenta Seeds, Inc; Pioneer Hi-Bred International Inc.; Dekalb Genetics Corporation; Aventis CropScience; DOW AgroSciences LLC; BASF Inc.; DuPont Pioneer y asociaciones de Monsanto Company and Mycogen Seeds c/o Dow AgroSciences LLC; Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo)); Mycogen (c/o Dow AgroSciences); Pioneer (c/o Dupont); DOW AgroSciences LLC and Pioneer Hi-Bred International Inc (CERA, 2014).

A nivel mundial, el área de cultivos transgénicos aumentó 100 veces en 16 años, pasando de 1.7 millones de hectáreas en 1996, a 170.3 millones de hectáreas en 2012, con una tasa anual de crecimiento de 6 %. En la actualidad destacan los cultivos con eventos acumulados; 13 países sembraron cultivos con dos o más eventos en 2012. EE.UU. continúa siendo el país líder, con 69.5 millones de hectáreas y una adopción promedio de 90 %, principalmente para los cultivos de maíz, soya, algodón, colza, remolacha azucarera, alfalfa, papaya y calabaza. Brasil tuvo un incremento mayor a cualquier otro país, pasando de 6.3 a 36.6 millones de hectáreas con los cultivos de soya, maíz y algodón. India cultivó 10.8 millones de hectáreas de algodón *Bt.* con una tasa de adopción de 93 % (James, 2012).

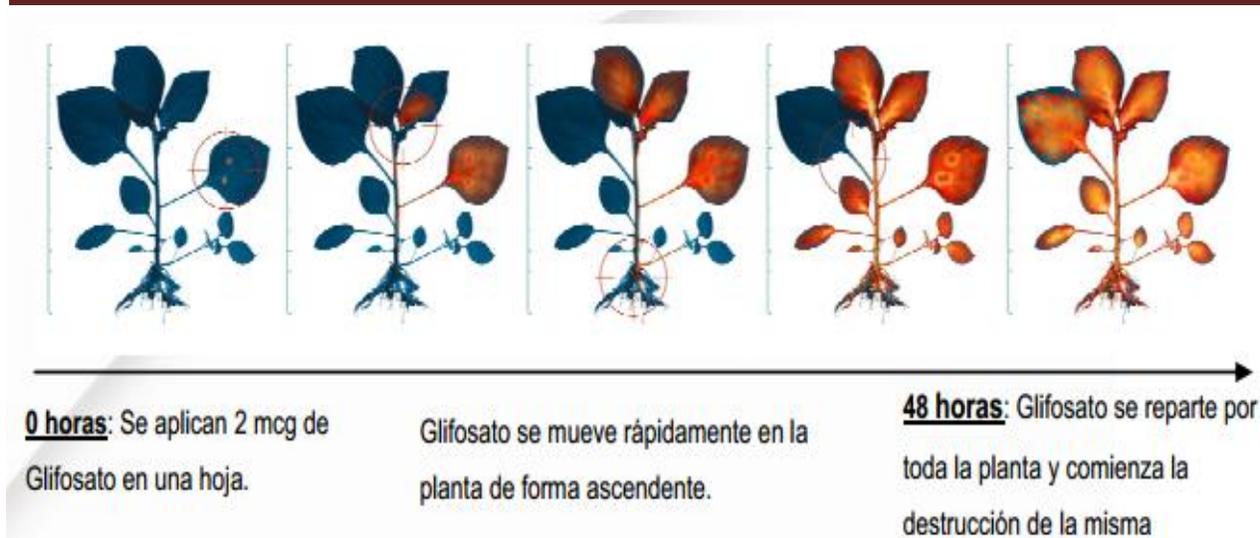
### **1.3. Modo de acción del Glifosato**

El glifosato fue descrito como herbicida en 1971, y actualmente es el herbicida más utilizado en el mundo. El herbicida comercial Roundup® de Monsanto, cuyo ingrediente activo es el glifosato, fue introducido comercialmente como herbicida desde 1974. Actualmente existen presentaciones con diferentes nombres como: WeatherMax, Roundup Ready, PowerMAX™: UltraMax, Full II, Faena y otros herbicidas producidos por Monsanto, se encuentran entre los más utilizados a nivel mundial. Es un herbicida no selectivo, sistémico de acción foliar, es decir, ingresa a la planta a través de las hojas para migrar a otras partes del tejido vegetal donde será metabolizado.

El modo de acción del glifosato es por medio de la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas (triptófano, fenilalanina y tirosina) mediante la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil- shikimato-3-fosfato-sintetasa (EPSPS), con lo que se reduce la producción y el desarrollo de la enzima ya que es un competidor por los mismos sitios que la enzima, bloqueando de esa forma la biosíntesis de los aminoácidos y algunos otros, esenciales todos ellos para la vida de la planta.. El descontrol en la catálisis por la enzima EPSPS en el penúltimo paso en la vía del shikimato, reduce también la biosíntesis de otros compuestos tales como: tetrahidrofolato, ubiquinona y vitamina K (COFEPRIS, 2009).

#### **Sintomatología:**

Se detiene el crecimiento de la planta, seguido de una clorosis en los brotes nuevos, luego aparece un color bronceado y finalmente, la planta muere dentro de los 10 o 15 días después de la aplicación pero dependerá de diversos factores ambientales, así como propios de la planta, como el grosor de la cutícula de las hojas (Figura 1A).



**Figura 1A. Absorción y translocación del herbicida glifosato después de la aplicación. Fuente: CHEMINOVA-AGRODAN, 2005.**

#### 1.4. Organismos genéticamente modificados resistentes a herbicidas (RH)

Desde que comenzó la comercialización de OGM en 1996, el evento dominante ha sido siempre la tolerancia a herbicidas como el glifosato (Roundup Ready®) y el glufosinato (Liberty Link®) (James, 2010). Desde 1996, los cultivos RH fueron adoptados rápidamente porque proporcionaron a los agricultores un sistema simple para el manejo de malezas. Estos cultivos prometen reducciones netas en el uso de herbicidas, pues poseen características introducidas mediante ingeniería genética (biobalística o *Agrobacterium tumefaciens*), que les permiten tolerar herbicidas con sitios de acción específicos (Benbrook, 2012). Esto se logró con el descubrimiento de biotipos de maleza que resistían un amplio espectro de herbicidas, se estudiaron los mecanismos de resistencia ya sea a) por el sitio de acción del herbicida (pérdida de afinidad por la proteína enlace o bien por la sobreexpresión de la misma, también se conocen como TSR (resistencia del sitio de acción) o b) por exclusión del herbicida (degradación metabólica del herbicida a compuestos no tóxicos, falta de absorción o penetración del herbicida y posterior pérdida de transporte ya sea vía Xilema o Floema a la proteína de enlace, estos mecanismos son conocidos como NTSR (Resistencia Fuera del Sitio de Acción) (Cruz *et al.*, 2010).

### **1.5. Cómo funciona la tecnología RoundUp Ready (RR) en cultivos transgénicos resistentes a glifosato (RG)**

Se observó, tanto en bacterias como en cultivos celulares de plantas, que el incremento en el número de copias del gen codificante para la EPSPS confiere tolerancia al herbicida glifosato. Se obtuvieron plantas transgénicas de petunia (*Petunia spp.* Juss.) que expresaban un ADNc codificante para la pre-proteína completa EPSPS de esa misma especie bajo control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Aunque la enzima sobrepresada era sensible al glifosato, estas plantas eran resistentes al herbicida.

Otra estrategia explorada fue la búsqueda de formas variantes de la EPSPS que tuvieran simultáneamente baja afinidad por el glifosato y buena actividad catalítica. Se demostró que las plantas GM que expresaban una EPSPS heteróloga con estas características, tenían muy buena respuesta frente al herbicida. Así fue como se aisló el gen que codifica una EPSPS tolerante a glifosato de la cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens* (CP4/EPSPS). Se clonó el gen *gox*, que codifica la enzima glifosato oxidoreductasa (responsable del proceso de degradación del glifosato por la ruta del ácido aminometilfosfónico) a partir de la cepa LBAA de *Achromobacter sp.* Algunas mutaciones en la EPSPS pueden tornar a la enzima insensible al glifosato. La unión de este herbicida a la enzima nativa bloquea su actividad e impide el transporte del complejo EPSPS-shikimato 3-fosfato al cloroplasto. La enzima producida por el gen mutado (*epsps\**) tiene una menor afinidad por el glifosato y es catalíticamente activa en presencia del herbicida.

Existen tres estrategias principales para lograr esta tecnología.

- 1) Alterar el sitio de acción del herbicida
- 2) Introducir genes que permitan la detoxificación del herbicida
- 3) Incrementar la expresión de la proteína *target* del herbicida

## 1.6. Efectos adyacentes del uso de OGM-RH

Los principales riesgos a evaluar con el uso de esta tecnología son los efectos no contemplados al elegir un cultivo GM, entre los cuales se encuentran:

### 1.6.1. Incremento de plantas resistentes al herbicida:

El uso masivo de glifosato ha ocasionado la aparición y propagación de las llamadas “supermaleza”. Antes de la introducción de los cultivos RH en 1996, las especies de maleza RG eran prácticamente desconocidas. La primer maleza reportada RG (*Lolium rigidum*, L.) surgió en Australia en 1996 en el cultivo de canola RH. Es sabido que el uso de esta tecnología ha traído consecuencias graves, como la reducción de la diversidad biológica dentro de las áreas de siembra de estos cultivos, facilitando la coevolución de biotipos de maleza RH (Benbrook, 2012). Según la WeedScience (2014) desde 1996, se han reportado 25 especies de maleza resistentes a glifosato, encontrándose 12 dicotiledóneas y 13 monocotiledóneas, se confirma que la primer especie reportada fue *Lolium rigidum*, L., en Australia. Paralelamente a estos reportes de maleza RH, a mediados de la década de los 90’s, científicos de Monsanto escribieron o fueron coautores de varios documentos, argumentando que la evolución de maleza RG era poco probable, citando la larga historia de los herbicidas de uso y su relativa ausencia de malezas resistentes. Sin embargo, Benbrook (2012), comparó las tasas de uso de herbicidas por hectárea en cultivos no GM y cultivos RH encontrando un incremento del uso de herbicidas en estos últimos, estimándose en unos 239 millones de kilogramos en el período de 1996-2011. El aumento del uso del herbicida glifosato ha representado la mayor parte de este incremento. El cultivo de soya RG ha sido objeto de estudio desde el año 2006, cuando la propagación de maleza RG comenzó a aumentar significativamente en áreas donde se sembraba soya RR<sup>®</sup> por el uso excesivo de este herbicida (incremento del 70 %). México ocupa el 38º lugar a nivel mundial en cuanto a especies de maleza resistentes a herbicidas, reportadas hasta 2010; la primer especie reportada con resistencia a glicinas (glifosato) en el 2010 fue una gramínea perenne tropical llamada *Leptochloa virgata*, (L.) Beauv. (WeedScience, 2014).

### **1.6.2. Daños a la salud:**

Un estudio sobre los efectos de la utilización de glifosato en vertebrados, realizado por el equipo del Dr. Andrés Carrasco, de la Facultad de Medicina de Buenos Aires, Argentina, quienes evaluaron los efectos del herbicida glifosato utilizado en el cultivo de soya RG, demostraron que este herbicida es un potente teratógeno (causante de malformaciones) y posible cancerígeno en humanos. Evidenció experimentalmente, los efectos del glifosato en el desarrollo de varios vertebrados, principalmente una rana africana, usada como modelo experimental en biología del desarrollo (*Xenopus laevis*), evidenciando el potencial teratogénico y su mecanismo de acción de este herbicida en todos los vertebrados.

El efecto directo sobre los mecanismos iniciales de la morfogénesis en embriones de vertebrados genera preocupación, por los hallazgos clínicos observados en la descendencia humana de poblaciones expuestas en los campos agrícolas. Encontró que la frecuencia de las teratogénias aumentó conforme las concentraciones de glifosato. Las concentraciones que se usaron en la investigación son mucho menores a las usadas en los cultivos GM-RG o las que se han encontrado acumuladas en agua o suelos, y probablemente a las que se encuentran en el aire y son aspiradas por las personas que viven cerca de estos cultivos, o incluso son menores que se están registrando en fluidos y tejidos humanos y particularmente fetales (Paganelli *et al.*, 2010).

### **1.6.3. Daños toxicológicos y ambientales:**

En los sistemas acuáticos pueden provocar retardo en el crecimiento de organismos como algas y peces, cambios histopatológicos, alteraciones de parámetros enzimáticos, disminución de la actividad sexual y cambios bioquímicos. En el organismo humano puede causar toxicidad en células placentarias y del hígado, actuar como un disruptor endocrino, generar afecciones respiratorias, gastrointestinales, dermatológicas y neurológicas, así como fragmentación del material genético (Salazar y Aldana, 2011). Estos resultados se suman a los riesgos y peligros implicados en la liberación de OGM, sobre todo en centros de origen y diversidad biológica, como México en el cual se tienen liberando o considerando para su liberación cultivos GM como: maíz, algodón, soya, alfalfa, canola, clavel y otros. Sin embargo, en México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) autoriza el uso de glifosato en acciones urbanas de jardinería y agrícola. En este último, para la destrucción de maleza de los cultivos de maíz, frijol, trigo, cítricos, tomate, vid, sorgo y papa, entre otros. Es comercializado bajo los nombres de Aquamaster<sup>®</sup>, Faena<sup>®</sup>, Mamba<sup>®</sup>, Sankill<sup>®</sup>, Glyfos<sup>®</sup>, Roundup<sup>®</sup> y Ramrod<sup>®</sup>, en presentaciones de concentrado soluble, gránulo soluble, líquido soluble, polvo soluble, solución concentrada y solución acuosa las cuales se expenden en concentraciones de 350 a 720 g. de ingrediente activo (i.a.) por litro o por kilogramo (COFEPRIS, 2009).

Para la EPA (Environmental Protection Agency) el glifosato está clasificado en la categoría E; es decir, evidentemente no carcinogénico para humanos, basados en estudios crónicos hechos en ratas a las cuales el glifosato fue suministrado continuamente, en dosis muy altas por dos generaciones sucesivas. Se reportó toxicidad en las crías a dosis altas, las cuales produjeron efectos adversos en las madres. En un estudio de 3 generaciones utilizando dosis bajas, no se observaron efectos adversos en la capacidad de los machos o hembras para reproducirse. El glifosato no ha producido cambios genéticos en una variedad de pruebas estándar usando animales o células de animales o bacterias (Monsanto, 1999).

Empero, Séralini *et al.* (2014) evaluaron por dos años los efectos en la salud de 200 ratas, al consumir maíz transgénico tolerante a Roundup (11 % en la dieta) cultivado con o sin Roundup, y de Roundup en el agua que bebían (0.1 ppb), dividiendo a las ratas en grupos de machos y hembras, encontrando que en las hembras todos los grupos tratados murieron en una proporción 2-3 veces superior que los del grupo control y en forma más rápida. Esta diferencia fue visible comparada con 3 grupos de machos alimentados con transgénicos. Las hembras desarrollaron tumores mamarios grandes más a menudo y antes que el grupo control, y la glándula pituitaria fue el segundo órgano más dañado; el equilibrio de las hormonas sexuales fue modificado por los tratamientos de transgénicos y de RoundUp.

En los machos tratados, las inflamaciones del hígado y la necrosis fueron entre 2.5 a 5.5 veces más frecuentes. Las nefropatías graves del riñón también fueron generalmente 1.3 a 2.3 veces más frecuentes que en el grupo control. Los machos presentaron tumores palpables cuatro veces más grandes que los controles, lo cual ocurrió hasta 600 días antes que a los controles. La estadística bioquímica confirmó importante insuficiencias crónicas de riñón; el 76% de todos los parámetros que mostraban alteraciones estaban relacionados con el riñón, para todos los tratamientos y para ambos sexos. Estos resultados pueden ser explicados por los efectos no lineales de la alteración endocrina generados por RoundUp, pero también por la sobre expresión del transgen en el organismo modificado genéticamente y las consecuencias metabólicas de ello.

### **1.7. Siembra de Organismos Genéticamente Modificados en México**

El primer antecedente para que en México se hablara de bioseguridad fue la solicitud realizada en 1988, por parte de los productores de Sinaloa a la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) de la Secretaría de Agricultura (SAGARPA), se trataba de un permiso para hacer pruebas en campo con un tomate GM. El gobierno federal tenía que responder a esa novedosa solicitud fitosanitaria y para ello inició un proceso de consulta entre la comunidad científica, en particular del sector agrícola, y con las autoridades gubernamentales responsables de la bioseguridad en EE. UU. y Canadá, principalmente ante la Organización de la Protección Vegetal de América del Norte (NAPPO por sus siglas en inglés). A partir de ese año, el tema de bioseguridad de los OGM se empezó a discutir en pequeños círculos de especialistas y productores, particularmente del norte del país (Serratos, 2009).

En cuanto a MGM, desde 1993 el grupo que antecedió al Comité Nacional de Bioseguridad Agrícola (CNBA) recibió una solicitud de permiso para experimentación con maíz transgénico por parte de investigadores del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV). A partir de esa primera solicitud, y hasta mediados de 1995, todos los ensayos fueron experimentos de escala mínima. En febrero de 1996 se le concedió al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) el primer permiso oficial para llevar a cabo una prueba propiamente de campo en Tlaltizapán, Morelos.

En todos los casos se tomaron medidas de control para el manejo del material transgénico, principalmente: 1) no permitir la madurez sexual de la planta o desespigar; 2) establecer barreras físicas y biológicas; 3) personal calificado y autorizado para el manejo del ensayo; 4) destrucción del material transgénico remanente y de las barreras biológicas en el caso de que se hubiera utilizado maíz. (Serratos, 2009). Los cultivos GM de los que se ha realizado algún tipo de solicitud en México son:

**Cuadro 1A. Pruebas de campo por cultivo GM (1988 a 2005) aprobadas conforme la LFSV y NOM FITO 056.**

OGM	PRUEBAS DE CAMPO	OGM	PRUEBAS DE CAMPO
Alfalfa	3	Lino	1
Algodón	113	Maíz	34
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	Melón	7
Arroz	1	<i>Pseudomonas</i> sp.	1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1	Papa	6
Calabacita	47	Papaya	5
Canola	1	Piña	1
Cártamo	2	Plátano	7
Chile	1	<i>Rhizobium etli</i>	1
Clavel	1	Soya	53
Jitomate	3	Tabaco	6
Colza	1	Tomate	26
Limón	1	Trigo	6

Fuente: CIBIOGEM, 2014

**Cuadro 2A. Permisos de liberación al ambiente por cultivo GM (2005 a 2011), aprobadas conforme a la LBOGM.**

OGM	PERMISOS
Alfalfa	1
Algodón	224
Maíz	169
Soya	39
Trigo	22
TOTAL	455

Fuente: CIBIOGEM, 2014

**Cuadro 3A. Permisos de liberación al ambiente de OGM por tipo de solicitud (2005 a 2011), conforme la LBOGM.**

AÑO	EXPERIMENTAL	PILOTO	COMERCIAL
2005	42	0	0
2006	26	0	0
2007	49	0	0
2008	44	6	0
2009	50	14	0
2010	86	23	1
2011	90	20	4
TOTAL	387	63	5

Fuente: CIBIOGEM, 2014

En 2012, se sembró algodón y soya GM en una superficie de 200,000 hectáreas (James, 2012). En cuanto a MGM, en la actualidad no están autorizadas las siembras bajo ningún tipo de solicitud.

### **1.8. Principales fuentes de introgresión transgénica al maíz nativo en México**

En 1996, dos años después que entrará en vigor el Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN) se incrementaron las importaciones de grano de maíz, proveniente de EE.UU. el cual podría ser GM, ya que a la par la siembra de maíz transgénico se implementaba en ese país (Serratos, 2009). A la fecha se han planteado hipótesis sobre posibles fuentes de introgresión transgénica al maíz nativo de México ya reportado en algunos estados.

La interacción genética puede propiciarse de diversas formas, tales como la importación de “grano” todavía viable, proveniente de países donde está permitida la siembra de MGM como: EE UU., Brasil y Sudáfrica; el intercambio de semillas entre productores y el acarreo de material genético foráneo por los migrantes y por la distribución de semillas de maíz sin etiquetar, a lo largo de las zonas rurales por las tiendas Diconsa (Quist y Chapela, 2001; Mercer y Wainwright 2007; Dyer *et al.*, 2009, Rivera, 2009; Serratos 2009; Turrent *et al.*, 2009; Carreón *et al.*, 2011).

Por otra parte, se ha demostrado el riesgo que representa para la diversidad genética del maíz, que en su centro de origen se siembre a cielo abierto maíces transgénicos ya que el maíz es una planta de polinización abierta (alógama) propensa al cruzamiento, la gran mayoría de los granos de polen viajan de 100 a más de 1000 m de distancia, dependiendo de las condiciones ambientales su viabilidad puede mantenerse estable (Kato *et al.*, 2009).

Diversos investigadores han advertido sobre las consecuencias que traería la siembra de MGM en México como: Kato (2004), quién indicó las posibles aberraciones cromosómicas producto de la acumulación de rADN; menciona que esto podría causar esterilidad y anomalías fenotípicas como malformaciones en los individuos. Esto concuerda con lo estudiado por Álvarez y Piñeyro (2009) quienes realizaron experimentos con *Arabidopsis thaliana*, transformándolas vía *Agrobacterium tumefaciens* y encontraron individuos con distintas aberraciones fenotípicas, con ello quedó documentada la imposibilidad de controlar el sitio de inserción de un transgén y el efecto sobre el mismo en un individuo.

En un estudio realizado por Luna *et al.* (2001) examinaron la dispersión de polen de maíz a distancias largas en México, llevaron a cabo su investigación, teniendo en cuenta las condiciones ambientales de la región, determinaron que la distancia máxima lateral que puede recorrer el polen es de 32 km, a partir de una fuente de polen de 4.000 m<sup>2</sup>, midieron la presencia de genes previamente marcados, en parcelas de maíz de 12.8 m<sup>2</sup> a varias distancias y detectaron polinización cruzada a 200 m. En otro trabajo similar llevado a cabo por Weeks *et al.* (2003) detectaron polinización cruzada a 63 m de la fuente de polen. Estos trabajos muestran resultados diferentes, sin embargo, comprueban que el flujo de transgenes es un hecho inminente (Galeano *et al.*, 2009).

En tanto, en el año 2000 se firmó el Protocolo de Cartagena sobre seguridad en biotecnología, que promueve la bioseguridad al regular el movimiento, manipulación y utilización de todos los OGM que puedan tener efectos adversos para la conservación de la diversidad biológica o la inocuidad alimentaria y adicionalmente se implementó el *principio precautorio* (SCDB, 2000; Gobierno Federal en LBOGM, 2005; Mercer *et al.*, 2007). A pesar de estos conocimientos sobre riesgos y precaución en México, se otorgaron autorizaciones para el establecimiento de siembras experimentales y piloto del año 2002 al 2013, y se sometieron solicitudes de siembras comerciales en 2012 y 2013, incluyendo el evento NK603 recientemente probado por Seralini *et al.*, (2014).

Para el año 2012, la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM) registró 33 resoluciones con permiso de liberación para maíz, la mayoría fueron eventos acumulados de resistencia a plagas y tolerancia a un herbicida, en la categoría de liberación experimental al ambiente y liberación al ambiente en programa piloto de cuatro empresas promoventes: 14 solicitudes de Pioneer de México (PHI México, S.A. de C.V.); 12 solicitudes de Semillas y Agroproductos Monsanto, S.A. de C.V. y Monsanto Comercial, S.A. de C.V.; cuatro solicitudes de Syngenta Agro, S.A. de C.V. y tres solicitudes de Dow AgroSciences de México S.A. de C.V., respectivamente.

Hasta la fecha no se han autorizado solicitudes para siembras de liberación al ambiente a nivel comercial y actualmente están suspendidas ya que en octubre de 2013 se interpuso ante el Tribunal Superior de Justicia del Distrito Federal a través del Juzgado 2° de lo civil, una medida cautelar de suspensión para la emisión de permisos para la liberación al ambiente de maíz GM en México en cualquiera de sus modalidades: experimental, piloto y comercial (LBOGM, 2005), invocando algunos de los derechos humanos como: el derecho a la alimentación inocua y variada, la protección del medio ambiente y el derecho a la diversidad biológica de los maíces, deteniéndose con ello las solicitudes emitidas por los promoventes. La demanda colectiva mantiene detenidas 79 solicitudes para sembrar en forma masiva semillas de MGM en el campo mexicano (<sup>1</sup>Com. pers.).

El estado de Veracruz es estratégico para la regulación de la entrada de los MGM, pues existen las condiciones que facilitan la introducción de maíz (grano funcional como semilla) del exterior a través de los principales puertos ubicados estratégicamente, en el norte, centro y en sur. En conjunto estos tres puertos operan el 40% del total nacional de las importaciones de materia prima, esto representa una fuerte entrada de maíz a México, principalmente de EE.UU. (SCT, 2013).

---

<sup>1</sup>René Sánchez Galindo: Licenciado en Derecho por la Universidad Iberoamericana Puebla. Director de Asociación Colectivas A.C. <http://www.semillasdevida.org.mx/> Actualmente es director de colectivas A.C.

En este contexto, el estado de Veracruz es estratégico para la regulación de la entrada de MGM, pues existen las vías de transporte terrestre, marítimo y aéreo, que facilitan la introducción de maíz (grano o semilla) del exterior a través de los principales puertos ubicados en: el Norte (Puerto de Tuxpan), el centro (Puerto de Veracruz) y en el Sur (Puerto de Coatzacoalcos). En conjunto estos tres puertos operan el 40 % del total nacional de los contenedores, lo que representa una importante entrada de maíz que podría ser GM, además de contar con conexiones ferroviarias y diversos enlaces carreteros y aeropuertos que comunican al estado prácticamente con todo el país (SCT, 2013).

En cuanto a la legislación en México, contemplando el riesgo latente de la interacción de maíces nativos con materiales introducidos por diversas vías, y los riesgos de flujo génico entre variedades nativas, parientes silvestres (teocintles) y MGM, que pudiera afectar la biodiversidad y la riqueza genética del maíz, científicos especialistas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y el Comité Nacional de Bioseguridad Agrícola (CNBA) se reunieron en el Foro: “Flujo génico entre maíz criollo, maíz mejorado y teocintle: implicaciones para el maíz transgénico”.

En este foro se discutieron y evaluaron los impactos que traería para las variedades silvestres de maíz o teocintle, la presencia de MGM en su centro de origen. Fruto de estas consideraciones se decidió decretar en 1999 una moratoria de *facto* a la siembra, tanto comercial como experimental de MGM en México, pero no restringió la importación para fines de consumo. Ante esta situación, en el año 2000, se firmó el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica, implicando la adhesión del *principio precautorio* (Rivera 2009; Serratos, 2009).

Sin embargo, ante un creciente aumento del área cultivada con MGM a nivel mundial y el aumento de las importaciones provenientes en su mayoría de EE. UU., Brasil y Sudáfrica y los problemas deficitarios en la producción nacional, desde hace varios años empresas transnacionales como: PHI México, S.A. de C.V.; Semillas y Agroproductos Monsanto, S.A. de C.V. y Monsanto Comercial, S.A. de C.V.; Syngenta Agro, S.A. de C.V.; Dow AgroSciences de México S.A. de C.V. principalmente, han intentado que se autorice la siembra comercial de MGM en México, con la justificación de incrementar la producción, lo que no se ha demostrado aún, ni en los países que más promueven su siembra, pues la respuesta en rendimiento es un factor multigénico que no quedaría cubierto con la inserción de uno o pocos genes al azar insertados en el genoma del maíz.

El estudio del flujo génico entre híbridos convencionales y MGM, no se ha explorado tanto, sin embargo adquiere importancia ya que estos híbridos se mueven por todo el país y de tener introgresión transgénica podrían contaminar los maíces nativos.

### **1.9. Detección de Organismos Genéticamente Modificados**

En la actualidad se emplean tres métodos para la detección y cuantificación de elementos constituyentes de un transgen en semillas y productos derivados de un OGM, los cuales emplean técnicas inmunológicas basadas en proteínas (ELISA y tiras reactivas) y técnicas basadas en ADN empleando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (tiempo real y punto final), con estas técnicas es posible detectar y cuantificar un elemento en semillas, plantas, alimentos y derivados de los anteriores. La PCR permite la amplificación selectiva de segmentos de ADN presentes en una muestra, es una técnica cuya realización exige personal capacitado y equipo especializado. Permite detectar la presencia de una sola secuencia de ADN presente en una muestra por lo que se deben extremar medidas de bioseguridad en la manipulación de las muestras, evitando la contaminación cruzada y por lo tanto emitir falsos positivos.

Por su parte el método basado en proteínas o “Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay” o ELISA; utiliza anticuerpos específicos de la proteína recombinante de interés y manifiesta la cantidad presente de la proteína en una muestra que puede contener otras proteínas. Utiliza un anticuerpo para ligar la proteína específica, un segundo anticuerpo para amplificar la detección (fase optativa) y un conjugado de anticuerpo con una enzima, cuyo producto genera una reacción colorimétrica, fácil de observar y cuantificar comparando con una curva patrón de la proteína de interés; esta técnica es menos sensible que la PCR; tiene elevados costos iniciales para la obtención de anticuerpos y patrones de proteínas, su costo se reduce cuando se elaboran los reactivos; no discrimina entre diferentes modos y modelos de expresión de diferentes productos transgénicos que expresan características proteínicas similares. En la detección de OGM se tiene claro que la PCR y el ELISA deben considerarse métodos de detección complementarios y no se excluyen entre sí (SENASICA-CNROGM, 2014).

Hasta el momento todas las técnicas utilizadas para detección de OGM implican altos costos y la necesidad de contar con laboratorios especializados para la realización de las pruebas de confirmación, de hecho, tratando de cubrir este aspecto en política pública para establecer un escenario hacia la probable autorización de permisos de siembras de maíz transgénico a cielo abierto, se estableció una Red de Monitoreo y análisis de muestras para detectar la presencia de OGM en semillas de maíces nativos, en el Proyecto de Colectas de maíz apoyado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO) y el Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la alimentación y la agricultura (SINAREFI).

Lo anterior justifica la necesidad de continuar realizando investigaciones para precisar con mayor detalle la frecuencia del intercambio genético entre híbridos con mejoramiento convencional y MGM, en regiones estratégicas del país, como el estado de Veracruz. Ante la eventual movilización de semilla  $F_1$  y grano importado y nacional de una región a otra ( $F_2$ ), así como la limitada información sobre la genealogía de la semilla mejorada y nativa que se utiliza para siembra, es muy importante conocer y tener certidumbre si este material genético posee introgresión transgénica debido a las

implicaciones que tiene para México con respecto a la riqueza biológica en cuanto a maíz y recordando que el país es signatario del Protocolo de Cartagena. Debido a esta condición la detección de transgenes en materiales nativos e híbridos convencionales adquiere relevancia.

Por ello, en el presente trabajo se propone utilizar la aplicación de glifosato a plantas de maíz en primeras etapas de crecimiento (V4-5), como una metodología de campo, fácil, práctica y eficiente para detectar presencia de plantas con resistencia a este herbicida y con ello presumir la posible presencia de transgénicos en variedades nativas y mejoradas de maíz; así el productor tendrá la capacidad de discriminar este tipo de materiales de su parcela de una manera fácil y económica. Bajo estas consideraciones se plantearon los siguientes objetivos:

#### **1.10. OBJETIVOS GENERALES**

- a) Definir si la aplicación de glifosato en plantas de maíz de variedades nativas e híbridos comerciales, en primeras etapas de crecimiento, permite discriminar y determinar en pruebas rápidas de campo la presencia de transgenes relacionados con la resistencia a este herbicida.
- b) Detectar la presencia de transgenes en colectas de maíces nativos de Veracruz y de híbridos comerciales, a través de pruebas moleculares específicas que permitan la presencia o ausencia de transgenes, en caso de existir plantas sobrevivientes.
- c) Establecer en caso que así ocurra, la frecuencia de las plantas con resistencia a glifosato en campo y determinar si existe una correlación entre la sobrevivencia en campo y la presencia de una proteína recombinante en la muestra determinada a través de una prueba específica de ELISA.

### **1.11. HIPÓTESIS**

Existen maíces nativos e híbridos comerciales, utilizados en algunos estados de México que portan el transgén de resistencia al herbicida glifosato y en ese caso, a través de la aplicación de este herbicida, a plantas en etapa fenológica V4-V5 de muestras de maíces nativos procedentes de Veracruz y de algunos híbridos comerciales, es posible detectar de manera rápida dicha resistencia.

Para cumplir los objetivos y corroborar la hipótesis planteada el presente trabajo se dividió en dos capítulos: 1) RESISTENCIA A GLIFOSATO EN MAÍCES NATIVOS DE VERACRUZ; 2) RESISTENCIA A GLIFOSATO EN HÍBRIDOS COMERCIALES DE MAÍZ DISTRIBUIDOS EN MÉXICO.

## 1.12. LITERATURA CITADA

**AgroDer (2013)** Producción de maíz en México: Comparativo regional y estatal de diversos indicadores de producción de maíz en México. Enlace: <http://www.agroder.com/>

**Benbrook C M (2012)** Impacts of genetically engineered crops on pesticide use in the U.S. – the first sixteen years. Environmental Sciences Europe. Centre for Sustaining Agriculture and Natural Resources, Washington State University, Hulbert 421, PO Box 646242, Pullman, WA 99164-6242, USA. 24(1) 24: 1-13

**Center for Environmental Risk Assessment (CERA, 2014).** GM Crop data base: <http://cera-gmc.org/index>.

**CHEMINOVA – AGRODAN (2005)** Manual técnico: GLYFOS®: Glifosato, herbicida no selectivo de Cheminova. España. Enlace: <http://www.cheminova.es/> (Consultada mayo de 2014)

**Cruz Hipólito H E, J A Domínguez Valenzuela, R De Prado (2010)** Capítulo 4: Mecanismos de resistencia de malezas a herbicidas. *In*: Resistencia de plantas a herbicidas. J A Domínguez Valenzuela y J L Medina Pitalúa (eds). Universidad Autónoma Chapingo México. 1ra. Ed. Pp: 48-60.

**Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS, 2009)** Lista de evaluación de inocuidad caso por caso de los organismos genéticamente modificados (OGM). Secretaría de Salud. Enlace: <http://www.cofepris.gob.mx/cofepris/Paginas/QueEsCofepris.aspx>

**Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS, 2014),** consultada en 2014: <http://www.cofepris.gob.mx/>

**Gobierno Federal (2005)** Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Diario Oficial de la Federación, publicado el 18 de marzo de 2008. Presidencia de la República. México, D.F.

**Internacional Life Sciences Institute do Brasil (ILSI, 2012)** Guía para la Evaluación de Riesgo Ambiental de Organismos Genéticamente Modificados. De Andrade Paulo P, W Parrot, M Mercedes Roca (eds). Sao Paulo, Brasil. 140 p.

**Instituto Nacional de Ecología (INE, 2014)** Folleto: Organismos Genéticamente Modificados. Disponible en: <http://www.ine.gob.mx/aromma/> ; página consultada en enero de 2014.

**James C (2010)** Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. ISAAA Brief No. 42. ISAA, Ithaca, NY.

**James C (2012)** Situación global de los cultivos transgénicos/GM comercializados. ISAAA sumario 44., extraído de: <http://www.isaaa.org/resources/publications/>

**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, Mexico. *Frontiers of Ecology and the Environment*. 5(5): 247–252

**Serratos Hernández J A (2009)** Bioseguridad y dispersión de maíz transgénico en México. *Ciencias* 92-93: 130-141.

**Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP-SAGARPA, 2013)** Producción anual de maíz grano por Estado, extraído del anuario estadístico de la producción agrícola.: [http://www.siap.gob.mx/aagricola\\_siap/icultivo/index.jsp](http://www.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp) (Consultada en noviembre de 2013)

**Turrent Fernández A (2010)** Variedades de maíz nativo, maíz transgénico, seguridad alimentaria y conflictos culturales en México. Red por una América Latina libre de transgénicos (RALLT). *Boletín Octubre*. No. 437.

**WeedScience (2014)** Internacional Survey of Herbicide Resistant Weeds: Weeds Resistant to Glycines: Glyphosate (G/9) by species and country: <http://www.weedscience.org/Summary/MOA.aspx?MOAID=12> (Consultada mayo de 2014)

## CAPÍTULO 1: RESISTENCIA A GLIFOSATO EN MAÍCES NATIVOS DE VERACRUZ

### 2.1. RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo definir si la aplicación de glifosato podría utilizarse como una prueba económica, fácil y práctica en campo, para detectar plantas con resistencia a este herbicida, por ello se estableció un ensayo en campo, en el CEVAMEX-INIFAP, con 53 genotipos: 45 registros de maíces nativos de Veracruz y seis registros antiguos de maíces donados por el CIMMYT e incrementados en el COLPOS, el híbrido H-48 del INIFAP como testigo local y una muestra de grano importado de Brasil. De cada material genético se establecieron tres repeticiones, con 100 semillas por parcela. Se asperjó glifosato en una ocasión con la dosis recomendada ( $3\text{L. ha}^{-1}$ ), en etapa V4-5. Se registraron variables en la sintomatología y se colectaron los materiales resistentes (15 dda.): en total fueron siete registros nativos y dos del CIMMYT con la mayor frecuencia de resistencia (0.10 a 0.33); estas y otras poblaciones se analizaron con una prueba específica basada en proteínas (ELISA) para rastrear la proteína recombinante CP4/EPSPS. Se encontró que el registro 290 perteneciente a la raza Tuxpeño, originario de Sehaulaca, Santiago Tuxtla, con una densidad óptica ( $DO$ ) de 0.77 a 450 nm fue reactiva; confirmándose por la metodología basada en el índice de muestra ( $IM = 4.086$ ) con un *cut off* de 0.188. Esto coincidió con la prueba de campo por lo que la aplicación de glifosato en campo, es una alternativa accesible y rápida para definir la presencia de plantas resistentes a este herbicida y funcionaría como un filtro para la discriminación de plantas a evaluar en pruebas específicas en laboratorio, las cuales por su propia naturaleza son más costosas, así como para la identificación de genotipos con una resistencia natural al herbicida que podría ser utilizados en un programa de mejoramiento genético clásico.

Palabras clave: *Zea mays*, L., glifosato, semillas nativas de Veracruz, ELISA, CP4/EPSPS.

## CHAPTER 1: GLYPHOSATE RESISTANCE IN MAIZE LANDRACES OF VERACRUZ

### 2.2. ABSTRACT

This study was carried out in order to determine if the application of glyphosate could be used as an economical and easy field practice to detect plants with resistance to this herbicide, so a field trial was established in CEVAMEX-INIFAP with 53 maize genotypes: 45 accessions of landraces of Veracruz, six old accessions of maize donated by CIMMYT and increased in COLPOS, the hybrid H-48 as local control, and seed for consumption imported from Brazil. Each one was planted in three replicates, with 100 seeds per plot. The plants were sprayed with glyphosate after the recommended dose ( $3\text{L ha}^{-1}$ ) in the phenological stage V4-5. Variables were recorded and the resistant materials were collected (15 dda.): in total, it was seven native landraces and two CIMMYT accessions with the highest frequency of resistance (0.10 to 0.33); these and other populations were analyzed using a specific test (ELISA) to screen the recombinant protein CP4 / EPSPS. It was found that the native landrace 290 belonging to the Tuxpeño race from Sehaulaca, Santiago Tuxtla, with an optical density (*OD*) of 0.77 at 450 nm showed a positive response; these fact was confirm by the sample index (*SI* = 4.09) with a *cut off* of 0.188. The previous result coincided with the field test, so the application of glyphosate in field trials is an affordable alternative to define the presence of resistant to this herbicide in plants, and that this also serves as a filter for the discrimination of plants to evaluate specific laboratory tests, which by their nature are more expensive, as well as to identify genotypes with natural resistance to this herbicide, which could be used in a breeding program.

Keywords: *Zea mays*, L., glyphosate, native landraces from Veracruz, ELISA, CP4/EPSPS.

### 2.3. INTRODUCCIÓN

México es el centro de origen del maíz (*Zea mays*, L.) y se considera que en su territorio es donde se encuentra la máxima diversidad genética de esta especie (Kato *et al.*, 2009), con más de 63 razas hasta la fecha documentadas. Además de la superficie dedicada a su producción, desde el punto de vista alimenticio, industrial, económico, político y social, el maíz es el cultivo más importante, al grado que para los antiguos mexicanos poseía un valor cosmogónico por lo que trasciende su importancia. Su consumo representa 55 % de la ingesta calórica y 22 % de la proteína diaria de los mexicanos. La Ley Federal de Variedades Vegetales (Gobierno Federal, 1996) establece que una de las funciones de la SAGARPA es proteger la biodiversidad de las variedades vegetales que son de dominio público, y que las comunidades tendrán el derecho de explotarlas racionalmente como tradicionalmente lo vienen haciendo; derecho que se expresa en el reglamento de dicha Ley (Gobierno Federal, 1998).

En 2001 Quist y Chapela publicaron el primer reporte de detección de transgénos en Oaxaca, en el que dan a conocer a la comunidad científica a través de la revista *Nature*, la contaminación de los maíces nativos mexicanos, con ello se sientan las bases para investigar la posible coexistencia entre MGM y poblaciones nativas. Ese mismo año, el Secretario de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) confirmó que “una muestra de grano de maíz tomada en los almacenes de Diconsa, en el pueblo de Ixtlán de Juárez, demostró que aproximadamente un tercio del grano estaba contaminado (37 %)” (Greenpeace, 2003; Rivera, 2009) e impuso una moratoria *de facto* al cultivo de maíz transgénico a campo abierto. Esta moratoria fue sostenida hasta marzo de 2009 cuando las modificaciones hechas a la Ley de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) y a su Reglamento (Gobierno Federal, 2005 y 2008) permitieron la ejecución de la siembra de MGM en etapas experimental y piloto, estableciendo que la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y SEMARNAT, promoverían la conservación de razas y variedades de maíces nativos y sus parientes silvestres, además de que se impulsaría el desarrollo de laboratorios para detectar y cuantificar el grano contaminado.

Ortiz *et al.* (2005), indagaron sobre los resultados reportados por Quist y Chapela (2001), para ello examinaron 870 plantas en 125 campos y 18 localidades en el estado de Oaxaca durante 2003 y 2004. Buscaron elementos presentes en la constitución de un OGM (CaMV 35S y tNOS) por medio de marcadores basados en PCR. En su estudio no encontraron secuencias transgénicas, en los campos incluidos en la muestra. Señalaron que los transgénos encontrados por Quist y Chapela habían sido “suprimidos” o “borrados” del genoma de las variedades nativas.

Empero siguieron realizándose investigaciones como la de Serratos *et al.* (2007), quienes encontraron presencia de proteínas recombinantes a través de pruebas de inmunoensayo sobre 208 muestras de maíz de 25 comunidades de las delegaciones: Milpa Alta, Tláhuac, Tlalpan y Magdalena Contreras, revelaron la presencia de dos proteínas recombinantes: CP4/EPSPS, que produce tolerancia al herbicida glifosato, y Cry1Ab/c, que confiere resistencia a insectos lepidópteros en maíz.

Dyer *et al.* (2009), en un estudio a nivel nacional reportaron haber encontrado las proteínas recombinantes Cry1Ab/Ac, en 10 de las 321 muestras analizadas (3.1 %) y CP4/EPSPS en seis de las 327 muestras analizadas (1.8 %) para esta proteína, siendo más frecuente en el sureste de México encontrándose los estados de Oaxaca y Yucatán entre las muestras reactivas a estas proteínas, también estuvieron presentes en la región centro-oeste, atribuyendo la contaminación de esta región a la difusión de grano importado de EE.UU., que podría utilizarse como semilla; lo que contrasta con lo reportado en el informe final del estudio: “Detección de secuencias transgénicas en colectas de maíz nativo destinadas para su conservación en bancos de germoplasma”, provenientes del proyecto FZ014: “Colecta de maíces nativos en regiones estratégicas de la península de Yucatán”. En él se analizaron 156 muestras de registros de maíz nativo de Yucatán, cuyo destino final fueron los bancos de germoplasma del INIFAP y el Banco Nacional de Germoplasma Vegetal (BANGEV) de la Universidad Autónoma de Chapingo, en este informe no se encontraron elementos constituyentes de un OGM en las muestras analizadas (INE-CENICA-UAM, 2009).

Rivera (2009), realizó ensayos tipo ELISA en recolectas de milpas tradicionales de 15 estados en México. Confirmándose la contaminación en la Sierra Juárez en Oaxaca (11.92 %). Las regiones que reportaron mayor frecuencia de proteínas recombinantes fueron la Sierra Tarahumara de Chihuahua con 33 %; Istmo de Tehuantepec con 13 %; Valles Centrales de Oaxaca con 12 % y la Sierra Norte de Puebla con 7.3 %. Los eventos analizados fueron CP4/EPSPS; Bt y Starlink (Cry9c), esta última proteína no es apta para el consumo humano, pero era frecuentemente distribuida como apoyo a las zonas de alta marginación en México y otros países; siendo esta la proteína más frecuentemente encontrada en el maíz analizado seguida de la CP4/EPSPS.

Diversos investigadores han advertido sobre las consecuencias que traería la siembra de MGM en México (Kato, 2004; Álvarez y Piñeyro, 2009). A pesar de estos conocimientos sobre riesgos y precaución en México, se otorgaron autorizaciones para el establecimiento de siembras experimentales y siembras piloto del año 2009 a 2013, y se sometieron solicitudes de siembras comerciales en 2012 y 2013, incluyendo el evento NK603 evaluado por Séralini *et al.*, (2014).

Para el año 2012, la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM) registró 33 resoluciones con permiso de liberación para maíz, la mayoría fueron eventos acumulados de resistencia a plagas y tolerancia a glifosato, en la categoría de liberación experimental al ambiente y liberación al ambiente en programa piloto de cuatro empresas promoventes: 14 solicitudes de Pioneer de México (PHI México, S.A. de C.V.); 12 solicitudes de Semillas y Agroproductos Monsanto, S.A. de C.V. y Monsanto Comercial, S.A. de C.V.; cuatro solicitudes de Syngenta Agro, S.A. de C.V. y tres solicitudes de Dow AgroSciences de México S.A. de C.V. Hasta la fecha no se han autorizado solicitudes para siembras de liberación al ambiente a nivel comercial pues están suspendidas, debido al dictamen de un Juez Federal, quien atendió y resolvió favorablemente una demanda colectiva, que restringe todos los permisos de siembras de MGM (¶¶Com. pers.).

---

¶¶René Sánchez Galindo: Licenciado en Derecho por la Universidad Iberoamericana Puebla. Director de Asociación Colectivas A.C. <http://www.semillasdevida.org.mx/>

El Estado de Veracruz es estratégico para la regulación de la entrada de MGM, pues cuenta con conexiones ferroviarias y diversos enlaces carreteros, portuarios y aeroportuarios que lo comunican prácticamente con todas las regiones del país y facilitan la introducción de maíz principalmente de EE.UU. (grano para uso alimenticio pero funcional como semilla) del exterior a través de los principales puertos ubicados estratégicamente (SCT, 2013).

Rojas (2010) realizó una investigación, en la cual dividió estratégicamente al estado de Veracruz en tres regiones: norte, centro y sur y seleccionó seis municipios y seis localidades por municipio, muestreó variedades nativas y mejoradas y encontró que 40 % del maíz recolectado fue positivo para OGM, por ensayos tipo ELISA y PCR. En otra investigación realizada en la Mixteca Poblana, se analizaron 47 muestras de poblaciones nativas y 11 muestras de grano de tiendas Diconsa, se evidenció que el promotor CaMV-35S estuvo presente en 36 % de las poblaciones nativas en porcentajes entre 0.31 y 0.01% y en 36 % de los lotes de grano obtenidos en las tiendas Diconsa (Carreón *et al.*, 2011).

Ante la eventual movilización de semilla de una región a otra, es relevante conocer y tener certidumbre de que este material genético no posea insertos transgénicos. Lo anterior justifica la necesidad de continuar realizando investigaciones para precisar con mayor detalle el flujo génico entre razas nativas, sus parientes silvestres y los MGM, en regiones estratégicas del país como el estado de Veracruz. El objetivo del presente estudio fue:

### **2.3.1. Objetivo:**

Detectar resistencia al herbicida glifosato en muestras de maíces nativos de Veracruz en las primeras etapas de crecimiento; así mismo establecer en caso de que así ocurra, la frecuencia de resistencia de las plantas por genotipo (posible resistencia transgénica) para realizar en las plantas resistentes a glifosato, una prueba específica para detectar presencia/ausencia de la proteína recombinante CP4/EPSPS.

### **2.3.2. Hipótesis:**

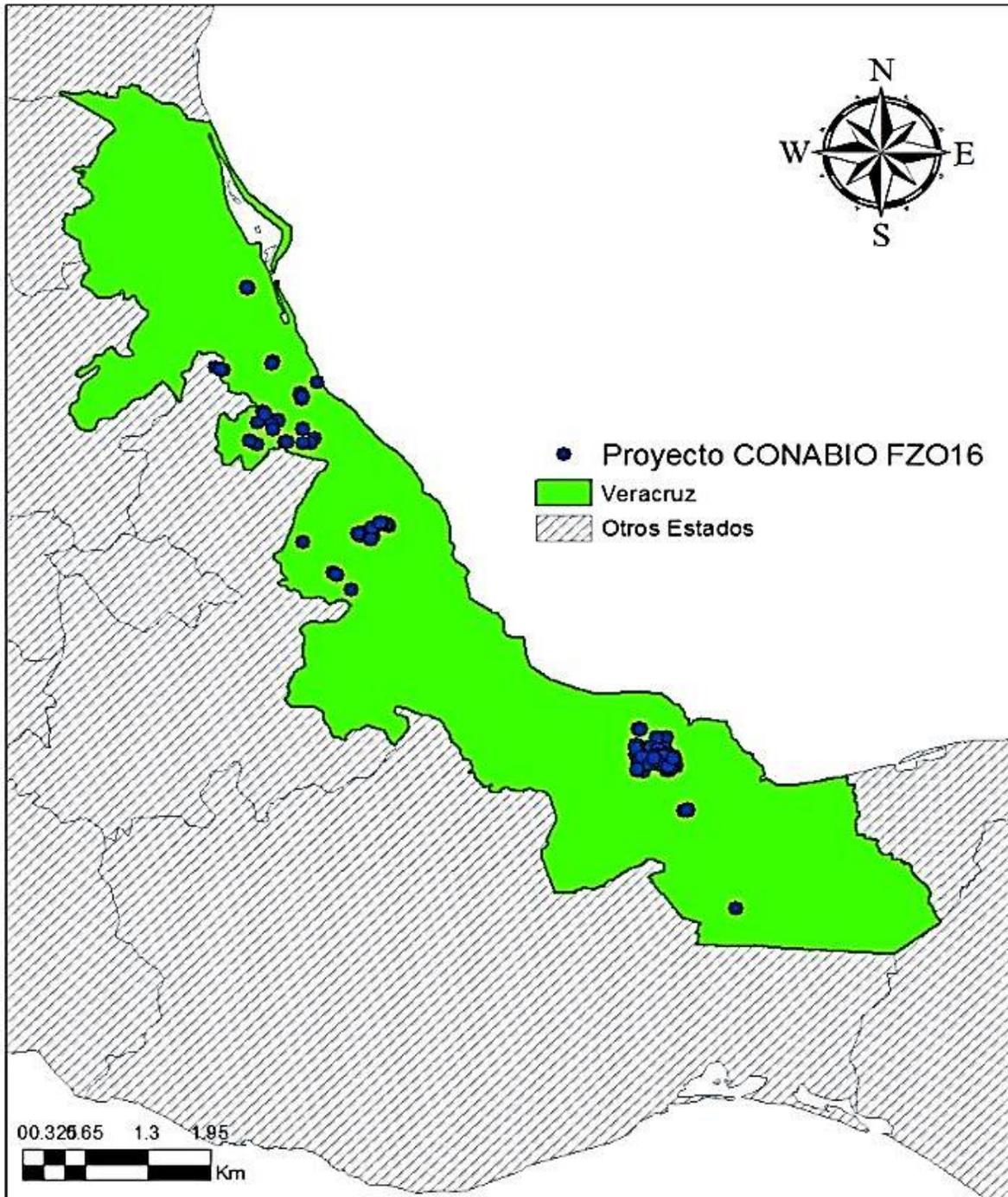
Algunos registros de maíces nativos que provienen de muestras de recolectas de una región estratégica para el acceso de granos con insertos transgénicos como Veracruz, por contaminación de maíces importados portan el transgén de resistencia al herbicida glifosato.

## 2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.4.1. Material Genético

Se utilizaron 45 muestras de registros de maíz provenientes del estado de Veracruz, facilitadas por el Dr. Mauro Sierra Macías, obtenidas a través del proyecto FZ016: “Conocimiento de la diversidad y distribución actual del maíz nativo y sus parientes silvestres en México”, en su segunda etapa 2008-2009/ Diversidad y distribución actual de los maíces nativos de Veracruz, de la Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO), en el cual se realizaron 471 recolectas en diferentes puntos del Estado (Figura 1B). En las 45 muestras están incluidas siete razas: Tuxpeño, Olotillo, Ratón, Tepecintle, Celaya, Arrocillo, Zapalote Grande y cruza entre ellas (Cuadro 1B).

También, como referencias de maíces nativos sin contaminantes transgénicos se utilizaron incrementos de semilla (#) realizados en el Colegio de Postgraduados (COLPOS) en 2011, de recolectas antiguas donadas por el banco de germoplasma del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) provenientes de: San Luis Potosí (SLP 77; SLP 87), Tamaulipas (TAM 4; TAM 21) y Nayarit (NAY 173; NAY 178). Se utilizó un testigo local, el híbrido H-48 del INIFAP-CEVAMEX y grano importado en 2012 de Brasil (F<sub>2</sub>) destinado a la industria alimentaria.



**Figura 1B. Sitios de recolecta del proyecto FZO16: “Conocimiento de la diversidad y distribución actual del maíz nativo y sus parientes silvestres en México”. Etapa II - 2008/2009.**

**Cuadro 1B. Registros de maíz nativo de Veracruz evaluados para resistencia a glifosato en campo durante el Ciclo P-V, 2013. Santa Lucía de Prías, INIFAP-CEVAMEX.**

REG	ID.	C. REGISTRO	RAZA	REG	ID.	C. REGISTRO	RAZA
108	18394	Popoctepetl, S.T.	Tuxpeño	235	18529	La Candelaria, Catemaco	Olotillo Tuxpeño rojo
163	18461	La Redonda, S.A.T.	Olotillo Ratón	243	18536	La Candelaria, Catemaco	Tuxpeño Olotillo
172	18470	Apixita, S.A.T.	Tuxpeño Olotillo	244	18537	La Candelaria, Catemaco	Ratón Olotillo
173	18471	Apixita, S.A.T.	Tepecintle rojo	245	18538	La Candelaria, Catemaco	Tuxpeño
189	18483	Vista Hermosa, Jesús Carranza	Olotillo Tuxpeño	248	18541	San Juan Seco, Catemaco	Olotillo Tuxpeño rojo negro crema
206	18500	Ohuilapan, S.A.T.	Tuxpeño Olotillo	249	18542	San Juan Seco, Catemaco	Tuxpeño Ratón rojo
208	18502	Apixita, S.A.T.	Tuxpeño	250	18543	San Juan Seco, Catemaco	Olotillo
209	18503	Apixita, S.A.T.	Tuxpeño	252	18545	La Candelaria, Catemaco	Tuxpeño Olotillo
216	18510	El Laurel, S.A.T.	Tuxpeño	253	18546	San Juan Seco, Catemaco	Olotillo Tuxpeño
219	18513	Huidero, S.A.T.	Tuxpeño	254	18323	La Candelaria, Catemaco	Olotillo
220	18514	Huidero, S.A.T.	Tuxpeño	255	18324	Santa Rosa Cintepec, Hueyapan de Ocampo	Olotillo Tuxpeño
231	18525	El Laurel, S.A.T.	Tuxpeño Olotillo	260	18565	Santa Rosa Cintepec, Hueyapan de Ocampo	Tuxpeño rojo y negro

REG= Comunidad de origen del registro de maíz nativo (proyecto CONABIO: FZ016 / 2009); ID. = Registro en el banco de germoplasma del INIFAP; S.T. = Santiago Tuxtla; S.A.T. = San Andrés Tuxtla, Ver.

**Cuadro 1B... continuación. Registros de maíz nativo de Veracruz evaluados para resistencia a glifosato en campo durante el Ciclo P-V, 2013. Santa Lucía de Prías, INIFAP-CEVAMEX.**

REG	ID.	C. REGISTRO	RAZA	REG	ID.	C. REGISTRO	RAZA
266	18571	Quimixchoxtaya, Catemaco	Ratón Tuxpeño	288	18549	Sehualaca, S.T.	Olotillo Tuxpeño morado
268	18573	Chuniapan de Abajo, S.A.T.	Tuxpeño rojo	289	18550	Sehualaca, S.T.	Tuxpeño
270	18575	Chuniapan de Abajo, S.A.T.	Tuxpeño rojo	290	18551	Sehualaca, S.T.	Tuxpeño morado
271	18576	Chuniapan de Abajo, S.A.T.	Olotillo Tuxpeño amarillo	291	18552	Sehualaca, S.T.	Tuxpeño Ratón
272	18577	Chuniapan de Abajo, S.A.T.	Tuxpeño Ratón	292	18585	Chiguihilincan, S.T.	Tuxpeño
275	18580	Cuesta Amarilla, S.A.T.	Tuxpeño	295	18588	Chuniapan de Arriba, S.A.T.	Tuxpeño
278	18583	Cuesta Amarilla, S.A.T.	Tuxpeño Olotillo	296	18589	Chuniapan de Arriba, S.A.T	Tuxpeño
279	18584	Cuesta Amarilla, S.A.T.	Tuxpeño	302	18595	El Naranjalito, Mpio. de Tamiahua	Olotillo Ratón
284	18442	Popoctepetl, S.T.	Tuxpeño	408	18694	Miahuatlán, Miahuatlán	Celaya Olotillo
285	18443	Popoctepetl, S.T.	Tuxpeño Zapalote Grande	413	18699	La Guacamaya, Chiconquiaco.	Celaya Arrocillo
287	18548	Sehualaca, S.T.	Tuxpeño Olotillo				

REG= Comunidad de origen del registro de maíz nativo (proyecto CONABIO: FZ016 / 2009); ID. = Registro en el banco de germoplasma del INIFAP; S.T. = Santiago Tuxtla; S.A.T. = San Andrés Tuxtla, Ver.

### 2.4.2 Localidad

El experimento se estableció en el Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en el municipio de Texcoco, Estado de México, ubicado geográficamente a 19° 23' 40" latitud N y 99° 39' 28" longitud O, a una altitud de 2252 msnm. El experimento se sembró el 15 de abril de 2013.

### 2.4.3. Diseño experimental

El ensayo se desarrolló en un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA), divididos en 3 lotes de 19 tratamientos con tres repeticiones, incluyendo el testigo H-48 y el grano importado de Brasil en cada uno de los lotes. Cada unidad experimental tuvo un área de 1.6 m<sup>2</sup>, sembrando 100 semillas por parcela.

#### Manejo agronómico

- a) Preparación del terreno: Consistió en un paso de arado, dos rastreos, nivelación y surcado; los surcos se hicieron con separación de 0.8 m.
- b) Siembra: Se realizó a tapa pie depositando una semilla cada 0.01 m.
- c) Control de maleza: No se realizó un control de maleza químico debido a la naturaleza del experimento, ya que algún otro ingrediente activo podría alterar los resultados de la prueba.

Como fuente de glifosato se utilizó el herbicida sistémico Faena Fuerte® de Monsanto Comercial S.A. de C.V., cuya constitución química es: Sal de potasio de N-(fosfonometil) glicina, con un contenido de ácido glifosato no menor de 81.61 % (equivalente a 540 g de i.a. L<sup>-1</sup> a 20 °C) con Transorb® como agente que potencializa la velocidad de penetración. La dosis que se utilizó en la aplicación fue la recomendada para el cultivo de maíz; es decir 3 L ha<sup>-1</sup> y se asperjó una ocasión, cuando las plantas estaban en estado vegetativo hasta con cinco hojas desarrolladas (V4-5: un mes después de la siembra).

#### 2.4.4. Variables evaluadas

Se registraron variables antes y después de la aplicación del herbicida, las que permitieron determinar la respuesta de cada uno de las poblaciones en estudio:

- a) Plantas establecidas: El número total de plantas establecidas se tomó a los 20 días después de la siembra en cada población y en cada repetición.
- b) Plantas sobrevivientes: 15 días después de la aplicación del glifosato (15 dda.) se realizó un conteo de las plantas sobrevivientes por cada material probado, en cada una de sus repeticiones.
- c) Frecuencia de resistencia (FR): Ésta se calculó dividiendo el número de plantas sobrevivientes por parcela, entre el número de plantas establecidas por parcela.
- d) Nivel de daño: Se estableció una escala visual para calificar el nivel de daño presente por la acción del herbicida (clorosis en hojas nuevas; cambio de color de verde a bronceado; muerte del tejido) en las plantas (15 dda.). En cada población se tomó el nivel de daño más frecuente en sus repeticiones. La escala quedó como se indica a continuación (Figura 2B):

Nivel 1 (N1): Sin daño aparente en la planta completa

Nivel 2 (N2): Sin daño aparente en 75 % del tejido de la planta

Nivel 3 (N3): Sin daño aparente en 50 % del tejido de la planta

Nivel 4 (N4): Sin daño aparente en 25 % del tejido de la planta

Nivel 5 (N5): Planta totalmente seca

Se colectaron muestras de los tejidos de hoja menos afectados de las plantas sobrevivientes (15 dda.) con niveles de daño entre N1 y N4 de cada población, en cada una de sus repeticiones. Se etiquetaron y se almacenaron a -20 °C en un congelador horizontal (Torrey® modelo CH15, México).

#### 2.4.5. Detección de proteínas recombinantes

En las plantas que resultaron resistentes a glifosato en campo (N1-N4), se realizó una prueba basada en proteínas (ELISA) para la inmunodetección de la proteína recombinante CP4/EPSPS (protein 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, enzima procedente de *Agrobacterium sp.*, cepa cuatro) con el kit RR<sup>®</sup> de la marca Agdia<sup>®</sup> (sin modificaciones al protocolo: <https://orders.agdia.com/Documents/m167.pdf>), a través de una muestra compuesta analizada por duplicado (se obtuvieron discos homogéneos de las hojas colectadas presionando el tejido sobre un tubo Eppendorf). Los datos se tomaron con un lector de placas Multiskan FC con incubadora, con un filtro de 450 nm y los resultados se evaluaron con el software Skanlt 3.1.0.4 RE (Thermo Scientific Multiskan<sup>®</sup>, EE.UU.).

Se realizó una curva estándar con los controles positivos (C<sup>+</sup>) incluidos en el kit, se prepararon con base en el mayor número de muestras de tejido foliar de las plantas en estudio, quedando de la siguiente manera: 1:1; 1:15 y 1:30; así mismo se incluyó un control negativo biológico (C<sup>-</sup>), el cual fue el registro 296 de la raza Tuxpeño, que en la prueba en campo no mostró alguna tolerancia al herbicida. Para esta prueba también se utilizó tejido de plántulas de maíz de semilla híbrida F<sub>2</sub> importada como grano de EE.UU. Los resultados de una prueba tipo ELISA se consideran confiables en 95 % de los casos sometidos (Ausubel *et al.*, 1995). Esta evaluación se realizó en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales (CENID-COMEF, INIFAP), con la asesoría de la Dra. Ana Laura Wegier Briuolo.

#### 2.4.6. Análisis estadístico

Debido a la naturaleza de los datos se realizó una prueba de normalidad (Anderson-Darling y Shapiro-Wilk) y de homogeneidad de varianzas (Bartlett) y se comprobó que los datos carecían de los postulados para hacer un análisis paramétrico (González y Ramírez, 2009), por lo que se realizó una transformación de los datos por el método de raíz cuadrada, siguiendo los pasos:

a) Se aplicó la ecuación  $YT = \sqrt{y + 1}$  donde;

YT = Dato transformado;

y = Dato original

b) Se efectuó el análisis estadístico usando YT

Se retransformaron los datos de los promedios despejando “Y” de la transformación usada, empleando la siguiente ecuación:

a)  $YT = \sqrt{y + 1}$  se despeja;

$$(YT)^2 = (\sqrt{y + 1})^2$$

$$(YT)^2 = y + 1$$

$$y = YT^2 - 1$$

b) Estos datos finales se presentan en el cuadro de comparación de medias (Cuadro 4B).

Los datos de campo se sometieron a un análisis de varianza (ANAVA) utilizando el programa SAS (Statistical Analysis System versión 9.0) conforme al modelo estadístico de bloques completos al azar. Se realizó una prueba de comparación de medias por el método de diferencias mínimas significativas LSD ( $P \leq 0.05$ ).

Para la prueba basada en proteínas (ELISA) de laboratorio, se realizó una prueba cuantitativa de los datos (Cuadro 2B), con base en las densidades ópticas (*DO*) e Índice de Muestra (*IM*) determinando el punto de corte (*cut off*) de los C<sup>-</sup> (nativo de Veracruz: 296) con el cual se interpreta un resultado negativo, utilizando las siguientes fórmulas:

$$Cut\ off = \frac{DO\ (C^-) + DO\ (C^-)}{2} + 0.150$$

Se determinó el índice de muestra de cada población con la siguiente ecuación:

$$IM = \frac{DO\ (Población)}{Cutt\ off}$$

Donde;

*Cut off*= punto de corte;

*DO*= Densidad óptica;

C<sup>-</sup>= Lectura de la densidad óptica del control negativo.

**Cuadro 2B. Interpretación de los resultados del ensayo de inmunodetección (ELISA) ligada a enzimas, por el valor de *DO* y por el método *IM*.**

Método			
Densidad Óptica ( <i>DO</i> )		Índice de muestra ( <i>IM</i> )	
Interpretación			
> 0.3	Positivo (+)	> 1.1	Positivo (+)
< 0.1	Negativo (-)	< 0.9	Negativo (-)
0.3 a 0.1	Indeterminado (+/-)	1.1.a 0.9	Indeterminado (+/-)
Controles Valor esperado			
< 0.6	Positivo (+)		
> 0.3	Negativo (-)		
Fuente	RR <sup>®</sup> Agdia <sup>®</sup> (2013)	Fuente	Aranís <i>et al.</i> (2008)

## 2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.5.1. Prueba de campo

Se obtuvo el número de plantas sobrevivientes a la aplicación de glifosato, por genotipo y se definieron los niveles de resistencia en cada caso. En colectas de maíces nativos, la presencia de plantas sobrevivientes, podría tener una manera particular de revisarse, ya que las poblaciones, al proceder de diferentes plantas en polinización libre, cada semilla y en general la muestra analizada de cada genotipo, podría tener una presencia de transgenes variable. En cuanto al análisis estadístico, los resultados proyectaron que:

1. No se rechaza la  $H_0$ = Los datos se ajustan a la normalidad
2. No se rechaza la  $H_0$ = Las varianzas son homogéneas

El análisis de varianza mostró que por lo menos un tratamiento fue diferente en alguna de sus repeticiones, por lo que se procedió a realizar la prueba de comparación de medias (Cuadro 3B).

**Cuadro 3B. Análisis de varianza de maíces nativos para FR a glifosato en campo en la localidad de Santa Lucía de Prías, INIFAP-CEVAMEX. P/V, 2013.**

F.V.	GL	SC	CM	Sig.
Tratamientos	52	0.1404	0.0027	*
Bloques	2	0.0305	0.0153	**
Error	104	0.3689	0.0036	
Total	158	0.5398		
C.V.	5.76			

\*; \*\*= significancia al 0.05 y al 0.01, respectivamente.

Al realizar la comparación de medias por el método LSD con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ , se obtuvieron diferencias entre genotipos teniendo que los genotipos que presentaron una mayor resistencia en campo fueron los registros 290 y 172 (0.33).

En cuanto a los registros del CIMMYT, el registro SLP 87 (0.22) fue superior a los demás registros, seguido por el SLP 77 (0.15), lo cual infiere que los materiales antiguos del Estado de San Luis Potosí probados manifiestan resistencia a glifosato en campo, por lo que se debe evaluar con mayor detalle ya que podrían tener introgresión transgénica por el manejo en su incremento o bien haber generado alguna resistencia por transferencia vertical (teocintle) lo que podría ser aprovechado en el mejoramiento genético clásico (Cuadro 4B). El nivel de daño de estos registros fue N2 y N3 respectivamente, por lo que puede tratarse de una tolerancia paulatina que podría desencadenar la muerte de la planta por daños secundarios a los fotosistemas I y II; sin embargo, en otro caso la planta podría recuperarse y hacer más eficientes las zonas fotosintéticamente activas que no hayan sufrido daños, pues se sabe que a bajas dosis de herbicida se puede favorecer la resistencia fuera del sitio de acción en la planta del mismo herbicida (Cruz *et al.*, 2010). Se esperaba que todas las plantas murieran, pues se trata de recolectas realizadas desde antes del primer reporte de contaminación transgénica en el país, el nivel de daño varió probablemente por factores ambientales que contribuyen a un engrosamiento de la epidermis de las hojas lo que las hace menos permeables y más tolerantes al herbicida (CHEMINOVA–AGRODAN, 2005).

En algunos casos se enmascara la resistencia al glifosato de los genotipos debido a que las FR están directamente influenciadas por el tamaño de la muestra, por lo tanto se debe tomar en cuenta además de la FR el nivel de daño de cada genotipo. De los 45 registros de maíz nativo, provenientes de diversas localidades del estado de Veracruz, se encontró que siete de éstas se encontraron entre las que presentaron alta FR a glifosato en campo (0.33 a 0.10). Los registros que resultaron con mayor FR provienen de Municipios colindantes, por lo que valdría la pena estudiar más profundamente las poblaciones de estas localidades y las razas involucradas, en cuanto a resistencias naturales o inducidas por la infiltración de un OGM; así mismo realizar monitoreos en las parcelas de recolecta y platicar con sus propietarios, para saber si han observado anomalías en el comportamiento del maíz que siembran como aberraciones o algunos mutantes.

Cabe destacar, que la mayoría de los propietarios de las parcelas son personas mayores de 50 años de edad, por lo que se deben dar asesorías asimilables para todo público (Figura 4B).

**Cuadro 4B. Comparación de medias en 53 materiales evaluados para resistencia a glifosato en campo durante el Ciclo primavera-verano, 2013. Santa Lucía de Prías, INIFAP-CEVAMEX.**

Registro	P. E.	P.S.	FR	N.D		Registro	P. E.	P.S.	FR	N.D	
290	10	3	0.33	1	a	216	57	3	0.05	2	bc
172	9	3	0.33	3	a	TAM 21	193	8	0.04	3	bc
SLP 87	171	37	0.22	2	ab	248	42	2	0.04	3	bc
H48	289	54	0.19	3	a-c	255	110	5	0.04	3	bc
250	127	22	0.17	3	a-c	209	65	3	0.04	3	bc
SLP 77	197	30	0.15	3	a-c	208	73	3	0.04	3	bc
291	34	6	0.14	2	a-c	271	119	4	0.04	3	bc
BRASIL	238	30	0.13	1	a-c	220	57	2	0.04	3	bc
173	16	3	0.13	3	a-c	219	193	7	0.04	3	bc
253	118	12	0.11	3	a-c	292	87	3	0.04	3	bc
254	145	14	0.10	3	a-c	163	62	2	0.04	3	bc
108	8	1	0.08	3	bc	235	94	3	0.04	3	bc
408	36	3	0.08	3	bc	243	76	2	0.04	3	bc
413	40	4	0.08	3	bc	279	34	1	0.03	3	bc
NAY 173	233	18	0.07	3	bc	275	80	3	0.03	3	bc
270	48	3	0.07	3	bc	302	35	1	0.03	3	bc
244	151	10	0.06	3	bc	285	70	2	0.03	3	bc
TAM 4	229	14	0.06	3	bc	268	43	1	0.03	3	bc
278	81	5	0.06	2	bc	284	94	3	0.03	3	bc
206	39	3	0.06	3	bc	288	55	1	0.02	3	bc
289	54	3	0.06	3	bc	266	130	2	0.02	3	bc
272	58	3	0.05	3	bc	189	48	1	0.02	3	bc
295	87	5	0.05	2	bc	NAY 178	190	3	0.02	3	bc
231	117	6	0.05	3	bc	249	209	3	0.01	3	bc
260	118	6	0.05	3	bc	245	76	1	0.01	3	bc
287	61	3	0.05	3	bc	296	104	2	0.00	5	c
252	41	2	0.05	3	bc	DMS			(0.05)		0.10

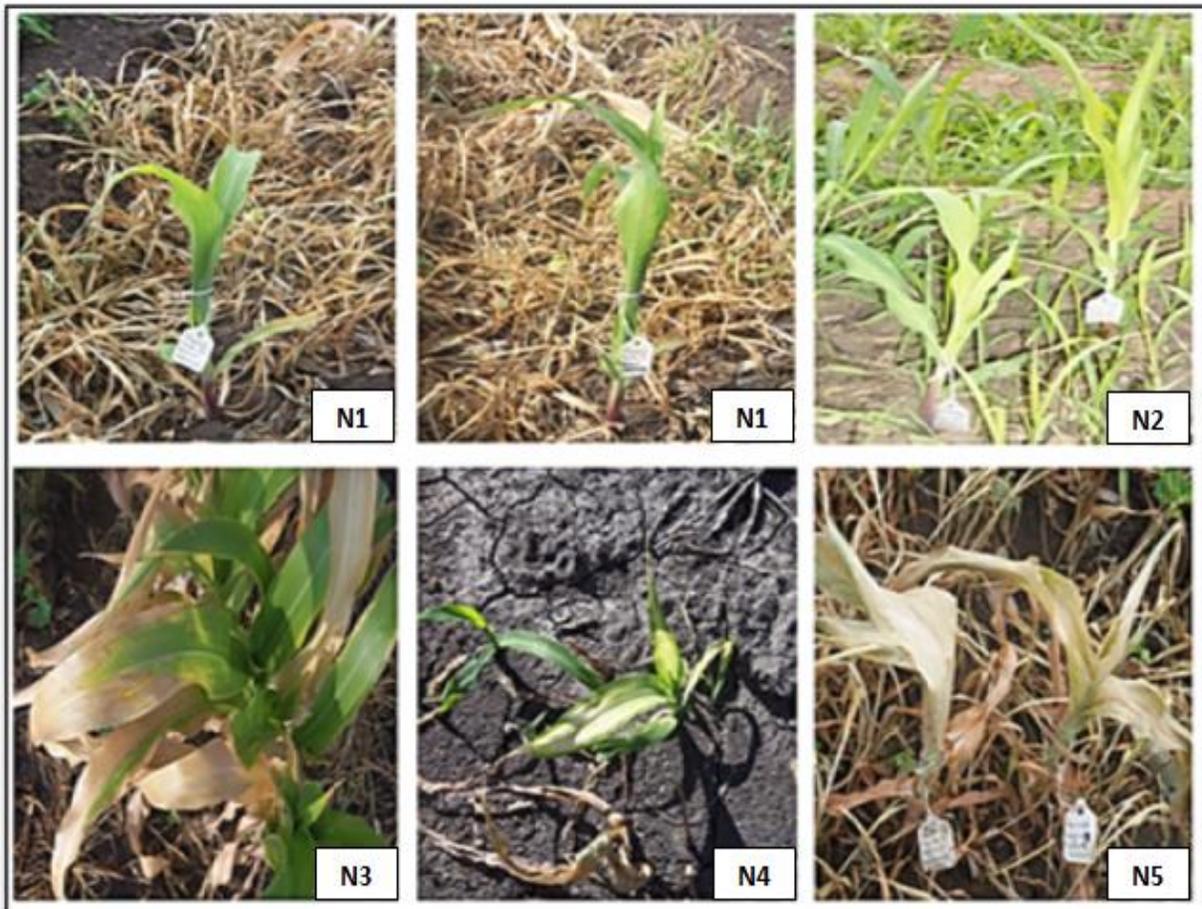
\*Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSD, 0.05).

P.E.= Plantas Establecidas; P.S.= Plantas Sobrevivientes; N.D.: Nivel de daño, FR= Frecuencia de resistencia promedio de las repeticiones.

### **2.5.1.1. Nivel de daño en planta:**

En los siete registros que presentaron la mayor FR y los materiales donados por el CIMMYT e incrementados en el COLPOS, los niveles de daño variaron de N1 a N3, esto puede deberse a diversos factores ya que depende de la absorción y translocación del herbicida, que a su vez depende de la interacción entre las características morfológicas de la planta, principalmente de su cutícula y de las condiciones ambientales como: a) Humedad relativa y humedad del suelo: Las condiciones de humedad elevada incrementan la absorción foliar de glifosato. Las aplicaciones se realizaron por la mañana, cuando las hojas todavía tenían el rocío matutino; b) Temperatura: Las condiciones de temperatura afectan la transpiración, al desarrollo de la planta e incluso en aspectos morfológicos como el desarrollo de la cutícula (CHEMINOVA-ADRODAN, 2005).

La dosis del herbicida no fue suficiente para causar la muerte a los 15 dda, en los genotipos probados. Quizás en la mayoría de los casos no se llegó al umbral de daño con una sola aplicación del herbicida, pero ello se realizó con el fin de evaluar qué genotipos tenían la capacidad de tolerar su aplicación. Se sabe que la aplicación repetida del herbicida en dosis bajas, puede favorecer la resistencia fuera del sitio activo. Las plantas que tuvieron un menor nivel de daño en campo fueron: 290 y grano F<sub>2</sub> de Brasil con N1 (100 % de la planta sin daño aparente); SLP 87, los registros de Veracruz 216, 271, 278, 291 y 295 con N2 (75 % de la planta sin daño aparente), los demás registros tuvieron un nivel de daño de N3 (50 % del tejido dañado). El registro de Veracruz 296 presentó cero tolerancia al herbicida (N5) (Figura 2B).



**Figura 2B. Escala visual de los niveles de daño 15 dda., en las poblaciones nativas de maíz probadas en campo. Ciclo Primavera-Verano, 2013. Santa Lucía de Prías, INIFAP-CEVAMEX.**

Los resultados obtenidos podrían denotar que la metodología usada en campo representa un buen acercamiento para identificar plantas de las poblaciones que pudieran tener una resistencia de tipo transgénica específica para resistencia a glifosato, ya que de las muestras a evaluar en laboratorio para una prueba más específica, se pueden descartar los genotipos que mueran en campo, en el caso de contar con bajos recursos económicos. Cabe señalar que esta prueba es más confiable entre más individuos se utilicen por población.

La muestra de grano importado de Brasil fue la segunda muestra que registró el menor nivel de daño a la aplicación de glifosato en campo; pues tuvo plantas completas sin daño aparente (N1), con FR de 0.13 (Cuadro 4B). Esto concuerda con lo reportado por Mercer y Wainwright (2007) y Acatzi (†Com. pers.), quienes evaluaron muestras de maíz que arribó a diversas aduanas nacionales con fines de uso industrial y piensos para ganado, encontrando en todas las muestras presencia de eventos para resistencia a glifosato. En Brasil aproximadamente 87 % del maíz producido es GM (ILSI, 2012). Estos resultados evidencian que es posible se dé el flujo génico entre el maíz introducido como grano que algunos campesinos compran y utilizan como semilla y los cultivos sembrados en México, lo cual representa un riesgo grave y un medio efectivo para diseminar transgenes, en caso de que los materiales importados sean GM, tal como lo menciona Carreón *et al.* (2011) en su investigación sobre maíces nativos de la Mixteca Poblana y materiales introducidos y distribuidos por las tiendas Diconsa, así como el estudio de Dyer *et al.* (2009).

En el presente estudio, la siembra de maíz importado para uso industrial (Brasil F<sub>2</sub>) se realizó para evidenciar el riesgo latente de contaminación que existe, ya que las plantas adultas con capacidad reproductora pueden tener intercambio genético con los maíces aledaños que se encuentren en producción.

### **2.5.2. Detección de proteínas recombinantes**

Con la metodología aplicada (ELISA) se obtuvieron valores de Densidad Óptica (*DO*) entre 0.033 y 0.875 a 450 nm. Los controles positivos resultaron positivos, con valores de *DO* que fluctuaron entre 0.675 y 0.874; así mismo, el grupo control negativo resultó negativo a la prueba, con valores de *DO* entre 0.033 y 0.046 de acuerdo al cuadro de interpretación (Cuadro 5). Se detectó presencia de la proteína recombinante CP4/EPSPS en el registro 290, ya que el valor de *DO* de 0.767 así lo indica. De las muestras analizadas sólo este registro resultó reactivo para esta proteína recombinante (Cuadro 5B).

†Abraham Itzcoatl Acatzi Silva: Encargado de la unidad de secuenciación y análisis informático del SENASICA. Contacto: +52 (55) 59051000 ext. 53040 e-mail: Abraham.acatzi@senasica.gob.mx

**Cuadro 5B. Prueba cualitativa de ELISA con base en la Densidad Óptica (DO) de poblaciones nativas de maíz resistentes a glifosato en campo.**

Reg	DO	Res	Reg	DO	Res	Reg	DO	Res
<i>BUFFER</i>	0.046	-	M 254	0.072	-	M 231	0.039	-
C <sup>-</sup> M296	0.038	-	M 408	0.055	-	M 248	0.036	-
C <sup>+</sup> 1:1	0.874	+	M 206	0.053	-	Brasil F <sub>2</sub>	0.051	-
C <sup>+</sup> 1:15	0.777	+	M 244	0.043	-	H-48	0.045	-
C <sup>+</sup> 1:30	0.675	+	M 270	0.049	-	EE.UU.	0.078	-
M 290	0.767	+	M278	0.054	-	SLP 87	0.053	-
M 291	0.071	-	M 295	0.078	-	SLP 77	0.051	-
M 250	0.044	-	M 216	0.074	-	NAY 173	0.049	-
M 253	0.039	-	M 272	0.045	-	TAM 4	0.047	-

Reg= Registro del material nativo de Veracruz de acuerdo al proyecto FZ016 o registro del CIMMYT; Res= Resultado con base a la interpretación de lecturas del kit RR<sup>®</sup> Agdia<sup>®</sup> (2013).

En cuanto al método de interpretación de la prueba cualitativa con base en el *IM* calculado se obtuvo la misma respuesta para el registro 290 (4.086) con un *cut off* de 0.188 a 450 nm (Figura 3B). Se encontró que la muestra del registro 290 perteneciente a la raza Tuxpeño, originario de Sehaulaca, Santiago Tuxtla, fue reactivo a la proteína recombinante CP4/EPSPS que confiere resistencia a glifosato (Figura 3B), lo cual coincide la respuesta obtenida en la prueba realizada en campo, donde las plantas tuvieron la FR más alta (0.33), esto podría servir como referencia para estudiar en laboratorio los genotipos que llegaran a presentar niveles altos de resistencia a glifosato. Dyer *et al.* (2009) y Rivera (2009), reportaron la presencia de la proteína recombinante CP4/EPSPS en la zona sureste del país, así también Rojas (2010) encontró proteínas recombinantes en accesiones de la zona sur de Veracruz, que coincide con el resultado positivo de unas de las muestras analizadas en este estudio, específicamente de la zona de Santiago Tuxtla, Veracruz.

En los demás registros evaluados, con los tamaños de muestra probados por población, la respuesta a la presencia de la proteína recombinante fue negativa, esto concuerda con lo reportado por Ortiz *et al.* (2005); INE-CENICA-UAM (2009), así como por Guzmán *et al.* (2011). No se descarta la posibilidad de que las demás poblaciones evaluadas reacciones a alguna otra proteína constituyente de un OGM como: Cry2a, Cry9C, Cry1Ab/1Ac, Cry3Bb, Cry1F, Cry34Ab1 y PAT/BAR, lo cual habría que corroborar en futuros estudios por pruebas ya sea basadas en proteínas o en ADN.

Los resultados reportados en el presente estudio podrían indicar la presencia de resistencia natural al herbicida glifosato producto de alguna transferencia vertical de resistencia de los parientes silvestres del maíz (teocintle), por lo que valdría la pena enfocar un estudio para evaluar resistencia natural al herbicida probado en las razas que resultaron con la mayor FR en este estudio. También cabe la posibilidad de que estas plantas hayan sobrevivido al glifosato por presión de selección, como ocurre en las plantas llamadas maleza que han generado diversos mecanismos de resistencia ante la sobreexpresión de la proteína EPSPS, también por la pérdida de afinidad del sitio de acción o cualquier otra resistencia independiente del sitio de acción de este herbicida (Cruz *et al.*, 2010).

La raza de maíz con más registros que mostró resistencia a la aplicación de glifosato fue la raza Tuxpeño. Tanto por sus atributos como por su empleo en el mejoramiento genético, dicha raza está ampliamente distribuida en el país, ya sea como raza pura, en combinación con otras razas o como híbrido acriollado, generalmente en altitudes menores a 1500 msnm; también se relaciona con muchas razas, formando un continuo (CONABIO, 2014). Las razas que le siguieron en FR fueron: Olotillo, Tepecintle y Ratón (Figura 4B)

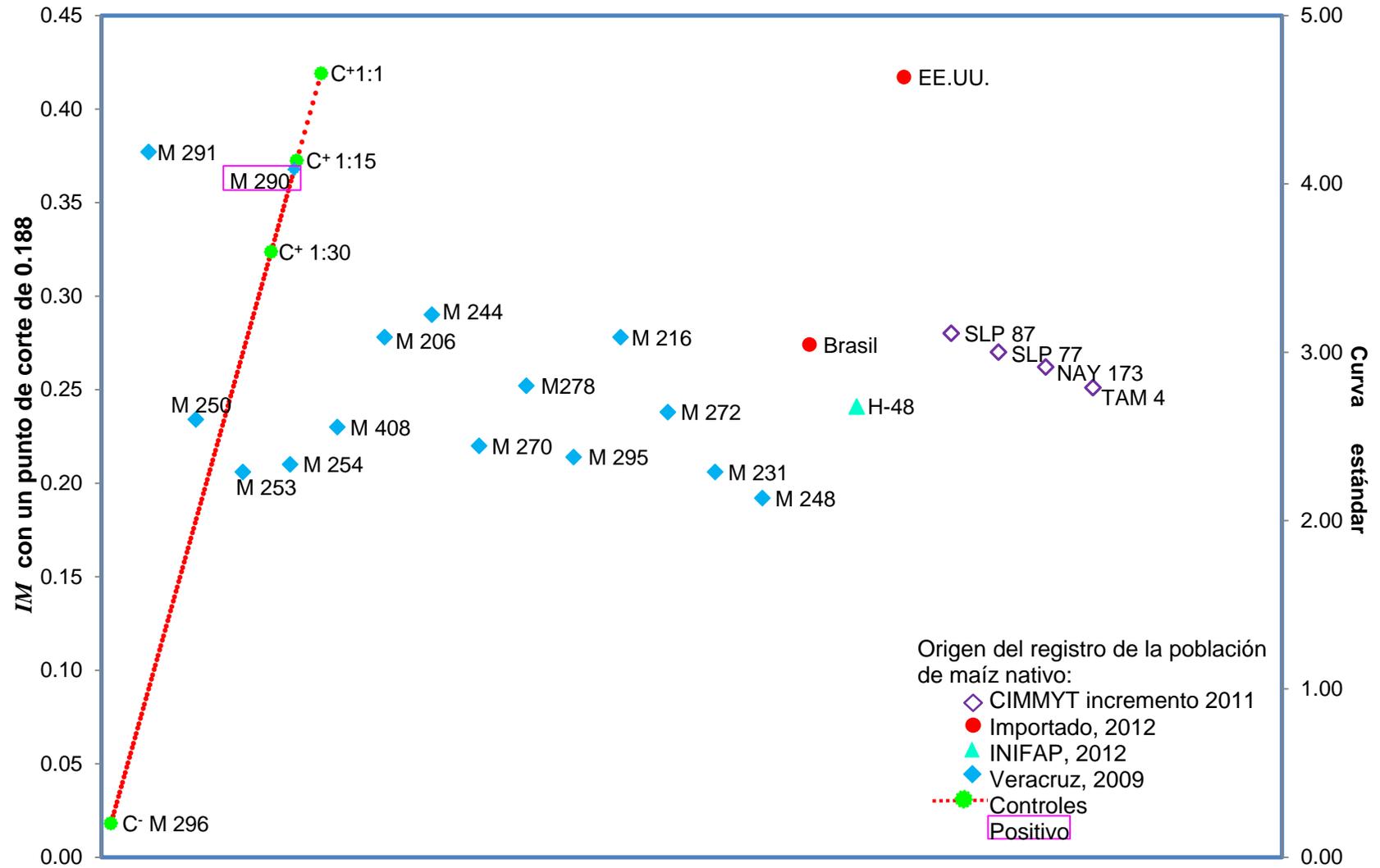


Figura 3B. Prueba cualitativa (ELISA) con genotipos resistentes a glifosato en campo con base en el Índice de muestra (IM), comparados con una curva estándar.

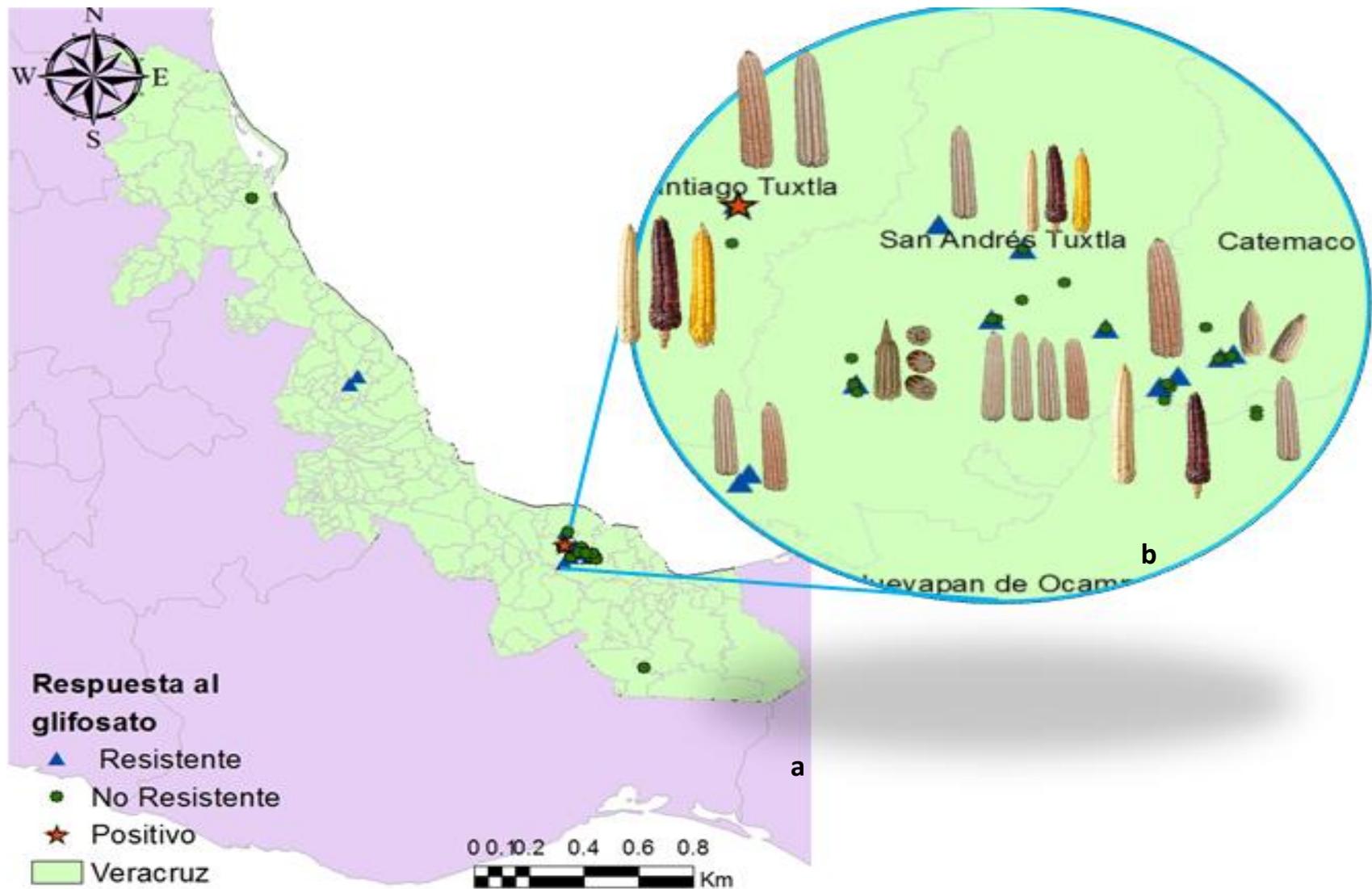


Figura 4B: a) Localidades de los 45 registros de maíces nativos de Veracruz, evaluados en la prueba de campo. b) Localidades correspondientes a la zona con mayor resistencia a la aplicación de glifosato y las razas involucradas. Ciclo Primavera-Verano, 2013. Santa Lucía de Prías, INIFAP-CEVAMEX.

Wellhausen *et al.* (1951) clasifican a la raza Tuxpeño como una raza prehistórica y figura “entre las antecesoras de las razas más productivas y agronómicamente satisfactorias de México, tales como Celaya, Chalqueño y Cónico Norteño” (razas modernas incipientes). Es muy importante a nivel nacional y la más utilizada para mejoramiento genético. Por sus características agronómicas sobresalientes ha sido una de las principales fuentes de germoplasma en el mejoramiento, público y privado, de maíces para zonas tropicales y subtropicales de varias regiones del mundo y como fuente de germoplasma en la ampliación de la base genética de híbridos de la faja maicera en EE.UU. también como fuente de germoplasma de los maíces dentados del sur.

La raza Tuxpeño es intermedia entre las razas: Tepecintle y Olotillo, que se postulan como sus probables progenitores (Wellhausen *et al.*, 1951), por ello es importante resaltar que los registros que resultaron con las FR más altas, son precisamente pertenecientes a las razas: Tuxpeño, Olotillo y Tepecintle (Figura 4b). Probablemente la introgresión transgénica se haya dado en esta región y en estas razas (de acuerdo a las colectas probadas y los hallazgos de otros autores), debido a que la fuente de germoplasma para mejoramiento genético en el sur de EE.UU. sea la raza Tuxpeño y sus probables progenitores por ende, comparten una mayor compatibilidad con los MGM de la franja maicera de los EE.UU (Iowa e Illinois). Por ello se debe poner especial atención a lo que suceda con esta raza, en el estado de Veracruz y se deben hacer más estudios para conocer hasta qué grado están infiltrados los materiales GM en esta raza tan importante.

Es recomendable que se analicen con mayor profundidad las recolectas almacenadas del proyecto FZ060 ya que más poblaciones podrían estar contaminadas y se estaría incrementando un material contaminado en los bancos de germoplasma del INIFAP y de otras instituciones. En México no se tiene un programa de monitoreo de OGM en los bancos de germoplasma, por lo que trabajos como éste podrían servir para desarrollar métodos más eficientes para monitoreo de OGM en bancos de germoplasma de maíz, dada su relevante importancia en el caso de México como centro de origen y diversidad de maíz.

## 2.6. CONCLUSIONES

Se registró la frecuencia de resistencia a glifosato en plantas de muestras de poblaciones de maíz nativo de Veracruz establecidas en campo; en total fueron siete registros de Veracruz y dos del CIMMYT con la mayor frecuencia de resistencia (0.10 a 0.33).

El registro 290 de maíz nativo originario de Sehaulaca, Santiago Tuxtla, Veracruz, de la raza Tuxpeño, fue reactiva a la proteína CP4/EPSPS, lo que coincide con la prueba en campo mostrando la mayor FR (0.33), también otros registros de esta raza resultaron con alta FR, por lo que se debe poner especial atención a su estudio, ya que esta raza representa la base genética para el mejoramiento de híbridos en la franja maicera de los EE. UU., principalmente para MGM y podría representar una fuente importante de contaminación para maíces nativos.

En la actualidad no hay un programa gubernamental de monitoreo para la detección de organismos genéticamente modificados en los bancos de germoplasma. Es recomendable que se analicen los registros del banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, pues en este trabajo se detectó la presencia de la proteína recombinante CP4/EPSPS y no se descarta la posibilidad de que otras proteínas recombinantes estén presentes en los registros de su banco de germoplasma.

En el registro de maíz nativo 290, la prueba de campo fue confirmada con la prueba de laboratorio y la hipótesis se cumple; sin embargo, es recomendable para próximos trabajos ampliar el número de individuos de cada registro, a fin de aumentar la precisión de las estimaciones que se realicen y la probabilidad de detección de frecuencias más bajas de contaminación en laboratorio.

## 2.7. LITERATURA CITADA

- Álvarez-Buylla R E y A Piñeyro Nelson (2009)** Riesgos y peligros de la dispersión de maíz transgénico en México. *Ciencias* 92-93: 82-96.
- Aranís 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. *Clinical Microbiology* 2008; 25 (2): 116-121.
- Ausubel F, R Brent, R Kingston, D Moore, J Seidman, J Smith, K Struhl (1995)** *Current Protocols in Molecular Biology*. Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School. Jhohn Wiley & Sons, Inc. ed. Supplement. Pp. 18-30.
- Carreón-Herrera N I, H López Sánchez, A Gil Muñoz, P A López, M A Gutiérrez Espinosa, E Valadez Moctezuma (2011)** Flujo genético entre maíces comercializados por Diconsa y poblaciones nativas de la Mixteca Poblana. *Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(6): 939-953.
- CHEMINOVA – AGRODAN (2005)** Manual técnico: GLYFOS®: Glifosato, herbicida no selectivo de Cheminova. España. Enlace: <http://www.cheminova.es/> (Consultada mayo de 2014)
- Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM, 2012)** Permisos de liberación al ambiente de Organismos genéticamente modificados por cultivo, consultada en 2014: <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad - Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias - Instituto Nacional de Ecología (CONABIO-INIFAP-INE, 2009)** Proyecto Global de maíces nativos. Base de datos maíces nativos, proyecto FZ016. Enlace: <http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/proyectoMaices.html>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO, 2014)** Base de datos del proyecto global “Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México”.
- Cruz Hipólito H E, J A Domínguez Valenzuela, R De Prado (2010)** Capítulo 4: Mecanismos de resistencia de malezas a herbicidas. *In: Resistencia de plantas a herbicidas*. J A Domínguez Valenzuela y J L Medina Pitalúa (eds). Universidad Autónoma Chapingo México. 1ra. Ed. Pp: 48-60.

**Dyer A G, J A Serratos Hernández, H R Perales, P Gepts, A Piñeyro Nelson, A Chávez, N Salinas Arreortua, A Yúnez Naude, J E Taylor, E R Álvarez Buylla (2009)** Dispersal of transgenes through maize seed systems in Mexico. PLoS ONE 4(5): e5734.

**Gobierno Federal (1996)** Ley Federal de Variedades Vegetales. Diario Oficial de la Federación, publicado el 25 de octubre de 1996. Presidencia de la República. México, D.F.

**Gobierno Federal (1998)** Reglamento de la Ley Federal de Variedades Vegetales. Diario Oficial de la Federación, publicado el 24 de septiembre de 1998. Presidencia de la República. México, D.F.

**Gobierno Federal (2005)** Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Diario Oficial de la Federación, publicado el 18 de marzo de 2008. Presidencia de la República. México, D.F.

**Gobierno Federal (2008)** Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. 2008. Diario Oficial de la Federación, publicado el 19 de marzo de 2008. Presidencia de la República. México, D.F.

**González Estrada E y C Ramírez Figueroa (2009)** Capítulo 5: ¿Cuándo y cómo hacer transformaciones de datos? In: Tópicos selectos de estadística aplicados a la Fitosanidad. Bautista Martínez N, L Soto Rojas y R Pérez Pacheco (eds.). Programa de Estadística, Colegio de Postgraduados-Montecillos. COLPOS-IPN. 1ra. Ed. México. Pp: 65-77

**Instituto Nacional de Ecología (INE) -Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental (CENICA) y Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-Xochimilco, 2009)** Informe final del estudio: detección de secuencias transgénicas en colectas de maíz nativo destinadas para su conservación en bancos de germoplasma. Pp. 13. México.

**Internacional Life Sciences Institute do Brasil (ILSI, 2012)** Guía para la Evaluación de Riesgo Ambiental de Organismos Genéticamente Modificados. De Andrade Paulo P, W Parrot, M Mercedes Roca (eds). Sao Paulo, Brasil. 140 p.

**Kato Yamakake T A (2004)** Variedades transgénicas y el maíz nativo en México. Agricultura, Sociedad y Desarrollo 1(2): 101-109.

**Kato Yamakake T A, C Mapes Sánchez., L M Mera Ovando, J A Serratos Hernández, R A Bye Boettler (2009)** Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 116 pp. México, D.F.

- Mercer K L y J D Wainwright (2007)** Gene flow from transgenic maize to landraces in Mexico: An analysis. *Agriculture Ecosystems & Environment*. United States of America. doi:10.1016/j.agee.2007.05.007.
- Monsanto Comercial (2010)** Guía Técnica para el uso de Tecnologías Monsanto Soya Solución Faena®. Pp. 59. México, D.F. extraído de: [www.monsanto.com](http://www.monsanto.com)
- Ortiz García S, E Ezcurra, B Schoel, F Acevedo, J Soberon and A A Snow (2005)** Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca. México. *S. PNAS Early Edition*. August 102 (35): 12338–12343
- Quist D and I H Chapela (2001)** Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature* 414:541-543.
- Rivera López F (2009)** Reporte de trabajo profesional: Análisis de la presencia de proteínas de maíces genéticamente modificados en variedades de maíz nativo en México. Universidad Nacional Autónoma de México-Facultad de Ciencias. Pp. 36.
- Rojas C A. (2010)** Posible presencia de maíz transgénico en Veracruz, México: marco regulatorio y conocimiento de productores y consumidores. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Pp. 194.
- Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica (SCDB, 2000)** Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica: texto y anexos. Montreal, Canadá: Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica.
- Secretaría de Comunicaciones y Transportes (SCT, 2014)** Principales puertos en Veracruz de Ignacio de la Llave. Enlace: <http://www.sct.gob.mx/puertos-y-marina/>
- Séralini Gilles E, E Clair, R Mesnage, S Gress, N Defarge, M Malatesta, D Hennequin, J Spiroux de Vendômois (2014)**. Republished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Environmental Sciences Europe* 2014:14, enlace: <http://www.enveurope.com/content/26/1/14>
- Wellhausen E J, L M Roberts y E Hernández Xolocotzi (1951)** Razas de maíz en México, su origen, características y distribución. Oficina de Estudios Especiales, Secretaría de Agricultura y Ganadería, México, D.F. Folleto técnico No. 5: 237 p.

## CAPITULO 2: RESISTENCIA A GLIFOSATO EN HÍBRIDOS COMERCIALES DE MAÍZ DISTRIBUIDOS EN MÉXICO

### 3.1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue definir la frecuencia de resistencia a la aplicación de glifosato en híbridos comerciales de maíz distribuidos en México, para detectar un posible flujo transgénico. Para ello se establecieron en campo 40 híbridos comerciales, 300 semillas por cada material y se asperjó glifosato una vez, con la dosis recomendada ( $3\text{L. ha}^{-1}$ ) en etapa V4-5. Después de 15 días de la aplicación, el resultado fue que 15 híbridos tuvieron la mayor frecuencia de resistencia (0.12 a 0.26), en especial materiales provenientes de Hidalgo. Los híbridos resistentes se analizaron con una prueba específica (ELISA) para la detección de la proteína recombinante CP4/EPSPS. Los controles positivos reaccionaron a la proteína y resultaron positivos con base en el índice de muestra (*IM*) con valores de 3.6 a 4.7 y densidad óptica (*DO*) de 0.68 a 0.87 y el control negativo resultó negativo a la prueba con valores de *DO* entre 0.033 a 0.042 e *IM* de 0.20, donde el punto de corte fue de 0.188. Ningún híbrido dio positivo a la proteína CP4/EPSPS; sin embargo, las lecturas de respuesta fueron variables. El híbrido Jabalí F<sub>2</sub> mostro un resultado indeterminado por *DO*, lo que podría indicar un híbrido reactivo a la proteína recombinante enmascarado. Dada la evidente resistencia a glifosato, es necesario elucidar los resultados mediante RT-PCR.

Palabras clave: *Zea mays*, L., glifosato, híbridos comerciales, ELISA, CP4/EPSPS, monitoreo de OGM.

## CHAPTER 2: GLYPHOSATE RESISTANCE FREQUENCY TRADE IN HYBRID CORN DISTRIBUTED IN MEXICO

### 3.2. ABSTRACT

The aim of this study was to define the frequency resistance to glyphosate application in commercial hybrids of maize (*Zea mays* L.) distributed in Mexico in order to detect a possible transgene flow. Thus, in this study 40 commercial hybrids were established in the field. 300 seeds per hybrid were sown and glyphosate was sprayed only one time at the recommended dose (3L ha<sup>-1</sup>) in the stage V4-5. After 15 days of the glyphosate application, the result was that 15 hybrids had higher resistance frequency (0.12 to 0.26), mainly those from Hidalgo. The resistant hybrids were analyzed in laboratory with a specific test (ELISA) for detection of the recombinant protein CP4/EPSPS. The positive control group was respond to the protein and was positive to the test based on the sample index (*SI*) with values of 3.6 to 4.7 and the optical density (*OD*) with values of 0.68 to 0.87. The negative control group was negative to the test with an *OD* value from 0.033 to 0.042 and with an *SI* value of 0.20, where the *Cut off* point was 0.188. None of the hybrids tested positive for the CP4/EPSP protein; however, response readings were variable, and in this regard the hybrid Jabalí F<sub>2</sub> showed an indeterminate result by the *OD*, so it may have a reactive genotype masked. Given the evident resistance to glyphosate found in the plants, it is necessary to elucidate the results by RT-PCR.

Key words: *Zea mays*, L., glyphosate, conventional hybrids, ELISA, CP4/EPSPS, GMO screening.

### 3.3. INTRODUCCIÓN

A partir del primer reporte científico sobre detección de transgenes en México, en el que se da a conocer la contaminación de maíces nativos de Oaxaca (Quist y Chapela, 2001), se desarrollaron por lo menos una decena de investigaciones más para evaluar el flujo génico entre maíz genéticamente modificado (MGM) y poblaciones nativas, confirmándose este hecho en varios estudios (Mercer y Wainwright, 2007; Dyer *et al.*, 2009; Serratos, 2009; Turrent *et al.*, 2009; Carreón *et al.*, 2011; Peña 2013) no obstante, en otras investigaciones no se encontraron elementos transgénicos presentes en la constitución genética de maíces nativos (Ortíz *et al.*, 2005; INE-CENICA-UAM, 2009).

La polémica sobre la detección y aparente supresión de insertos transgénicos en poblaciones nativas continuó, por lo cual la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) mantuvo una moratoria *de facto* a la siembra de MGM, hasta marzo del 2009 cuando modificaciones hechas a la Ley de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) y a su Reglamento (Gobierno Federal, 2005; Gobierno Federal, 2008), permitieron la siembra de MGM en etapa experimental en el 2009 y en etapa piloto en el 2011 (Mercer y Wainwright, 2007).

Varias hipótesis son factibles para explicar la presencia de transgenes en maíces nativos, tales como: la importación de grano GM de otros países para la elaboración de piensos para el ganado y uso industrial, que eventualmente llega a usarse como semilla pues conserva viabilidad en muchos de los casos; el acarreo por los migrantes y el posterior intercambio de germoplasma entre productores y la distribución por las tiendas Diconsa de grano importado en alta proporción GM para consumo humano a las zonas rurales provocando un intercambio genético entre MGM y nativos (Quist y Chapela, 2001; Mercer y Wainwright, 2007; Dyer *et al.*, 2009, Turrent *et al.*, 2009; Carreón *et al.*, 2011).

México en 2012 ocupó el octavo lugar en producción de maíz a nivel mundial (FAOSTAT, 2013); sin embargo, es deficitario en el abasto interno, pues de los más de 33 millones de toneladas de grano que se consumen anualmente, se producen 23 millones, importándose aproximadamente 10 millones de toneladas en su mayoría de maíz amarillo; este nivel de importación cada vez es mayor, pues desde 1996 dos años después de que entrará en vigor el Tratado de Libre Comercio de América del Norte, debido a una reducción en la cuota arancelaria se incrementaron las importaciones de maíz de Estados Unidos (EE.UU.) donde está permitida la siembra de MGM desde ese mismo año (Serratos, 2009; Turrent, 2010).

Se han desarrollado investigaciones de los efectos adyacentes con el uso de la tecnología del ADN recombinante para resistencia a herbicidas (RH), entre los cuales se encuentran: a) evolución de organismos blanco: se ha comprobado una coevolución de maleza en lugares donde se siembran cultivos RH; reportándose 25 especies resistentes a glifosato (RG); siendo la primer especie reportada *Lolium rigidum*, L., en Australia en 1996. México ocupa el 38º lugar a nivel mundial reportándose en 2010, la gramínea perenne tropical llamada *Leptochloa virgata*, (L.) Beauv. (WeedScience, 2014); b) Daños a la salud: Paganelli *et al.* (2010) demostraron el potencial teratogénico del glifosato aplicado en los cultivos RG, utilizaron como modelo experimental embriones de *Xenopus Laevis*, que fueron incubados con diluciones de 1/5000 ppm. de un herbicida con base en glifosato. Los embriones tratados fueron altamente anormales con marcadas alteraciones en el desarrollo de la cresta neural y cefálica así como deformidades en los cartílagos craneales en el estadio de renacuajo; esto concuerda con los hallazgos clínicos reportados en algunas descendencias humanas y en aves, mencionados en este estudio.

Otro estudio realizado por Séralini *et al.* (2014), quienes evaluaron los efectos en la salud de 200 ratas, al consumir maíz transgénico tolerante a Roundup (11 % en la dieta) cultivado con o sin Roundup, y de Roundup en el agua que bebían (0.1 ppb) durante dos años, en grupos de machos y hembras, encontraron que en las hembras todos los grupos tratados murieron en una proporción 2-3 veces superior que los del grupo control y en forma más rápida. Las hembras desarrollaron más a menudo tumores mamarios, antes que el grupo control, la glándula pituitaria fue el segundo órgano más dañado. En los machos tratados, las inflamaciones del hígado y la necrosis fueron entre 2.5 a 5.5 veces más frecuentes. Las nefropatías graves del riñón también fueron generalmente 1.3 a 2.3 veces más frecuentes que en el grupo control. Los machos presentaron tumores palpables cuatro veces más grandes que los controles, lo cual ocurrió hasta 600 días antes que a los controles. Estos daños los han advertido diversos investigadores (Kato, 2004; Mercer y Wainwright, 2007; Álvarez y Piñeyro, 2009; Serratos, 2009; Turrent, 2010; Peña 2013; Turrent *et al.*, 2013). El glifosato *per se* puede causar toxicidad en células placentarias y del hígado, actuar como disruptor endócrino, generar necrosis, así como la fragmentación del material genético (Salazar y Aldana, 2011); y c) daños ambientales: pérdida de la biodiversidad en parcelas donde se realiza la siembra de OGM (SCDB 2000; Kato, 2004; Serratos, 2009; Benbrook, 2012).

México como signatario del Protocolo de Cartagena, requiere la adopción de sistemas de monitoreo de MGM en sus importaciones y debe regular el movimiento, manipulación y utilización de todos los OGM que puedan tener efectos adversos para la conservación de la diversidad biológica o la inocuidad alimentaria, como lo establece dicho protocolo a través de las evaluaciones de riesgo (SCDB, 2000). La importación de MGM para consumo es común; sin embargo, estos maíces son semillas funcionales y de llegar a sembrarse propiciaría un intercambio genético con materiales nativos e híbridos comerciales; aunque estos últimos, durante la producción de semilla tuviesen un mayor control en la polinización, empero, la calidad genética puede verse comprometida y, dado que se trata de semilla certificada un lote de producción contaminado debe darse de baja por el SNICS y en el peor de los casos, contaminar materiales nativos.

En una investigación realizada en 2009, para identificar y cuantificar los OGM en cargamentos arribados entre julio y septiembre de 2007 a ocho Puertos de México, se encontró en muestras de grano de maíz, la presencia de siete proteínas recombinantes (Cry9C, Cry1Ab/1Ac, CP4/EPSPS, Cry3Bb, Cry1F, PAT/bar y Cry34Ab1) y se detectaron ocho eventos específicos: NK 603, MON 810, MON 88017, MON 863, GA21, T14-T25, DAS-01507-1 y DAS-59122-7, autorizados por el gobierno para la importación. Encontrándose eventos en cantidades hasta del 80 % del maíz importado sin tratamiento alguno para que pierdan su viabilidad, esto da una idea de lo que implica la importación de MGM para México como centro de origen (†Com. pers.).

La presencia de proteínas transgénicas en híbridos comerciales en el país queda confirmada con la investigación de Peña (2013) quién evaluó el efecto transgénico sobre los taninos y la contaminación por aflatoxinas en genotipos de maíz colectados en los estados de Hidalgo, Morelos y Edo. México. El 44 % de los híbridos dieron respuesta positiva a *CaMV35S* y *tNOS*. Encontró una correlación entre los niveles más altos de aflatoxinas en los híbridos con proteína recombinante en su constitución genética. No obstante el flujo génico entre MGM e híbridos convencionales no se ha estudiado tanto como en el caso de los maíces nativos; sin embargo, es importante que se incluyan en los planes de monitoreo debido a su amplia distribución en el país. El presente trabajo propone evaluar en campo la respuesta a la aplicación de glifosato en plantas de híbridos comerciales en etapa V4-5 (crecimiento vegetativo), distribuidos en algunos de los estados de mayor producción de maíz que son: Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Chiapas, Guerrero, Veracruz, Guanajuato, Chihuahua, Puebla, Oaxaca e Hidalgo (SIAP, 2013), para comprobar si es una metodología práctica y económicamente accesible para el análisis indirecto de la presencia de la proteína recombinante CP4/EPSPS.

---

†Abraham Itzcoatl Acatzi Silva: Encargado de la unidad de secuenciación y análisis informático del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Contacto: +52 (55) 59051000 ext. 53040 e-mail: Abraham.acatzi@senasica.gob.mx

Se propone utilizar algunos de los híbridos más utilizados en las siembras comerciales de empresas como: Semillas y Agroproductos Monsanto, S.A. de C.V. y PHI México, S.A. de C.V., así como el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) pues son las empresas transnacionales y la institución nacional con el mayor número de variedades de maíz inscritas en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (SNICS, 2012). El presente trabajo tuvo como objetivo:

### **3.3.1. Objetivo**

Detectar resistencia al herbicida glifosato en plantas de los híbridos más distribuidos en las principales zonas productoras de maíz en México: Sinaloa, Hidalgo, Bajío (Jalisco, Guanajuato) y Estado de México y en caso de que así ocurra, definir la frecuencia de resistencia de cada híbrido que resultara resistente y a estas realizarles una prueba específica para detección de la proteína recombinante CP4/EPSPS que confiere resistencia a ese herbicida en plantas transgénicas.

### **3.3.2. Hipótesis:**

Algunos híbridos que provienen de las principales zonas productoras de México portan el transgén de resistencia al herbicida glifosato y a través de una prueba rápida en campo, es posible detectar dicha resistencia.

### 3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.4.1. Material Genético

Se utilizaron 40 híbridos comerciales: a) 36 en generación F<sub>1</sub> (semilla); b) cuatro en generación F<sub>2</sub> (grano para consumo directo, funcional como semilla) c) una muestra F<sub>2</sub> importada de EE.UU., que sólo se utilizó en la prueba de laboratorio, así como una población no resistente a glifosato, proveniente de Veracruz como control negativo (Proyecto FZ016 de CONABIO) (Cuadro 1C).

**Cuadro 1C. Híbridos comerciales evaluados en campo. Santa Lucía de Prías, INIFAP-CEVAMEX. P/V, 2013.**

Híbrido	¶L. R.	Empresa	Híbrido	L. R.	Empresa
A7573	H		P3050W	Sinaloa 2013	Pioneer
Caimán	i		Cimarrón F <sub>2</sub>	Jalisco	Asgrow
Cimarrón F <sub>1</sub>			Jabalí F <sub>2</sub>	2013	(Grano)
Cobra	d	Asgrow	Dk 2034		Dekalb
Faisán			Hércules	Guanajuato	UNISEM
Jabalí F <sub>1</sub>	a		Vulcano	2013	
Tigre F <sub>1</sub>			As 823		Aspros
Tigre F <sub>2</sub>	l		3368W	Bajío 2013	Pioneer
33J56			P 1884		
30G40	g	Pioneer	MJ 8092		Asgrow
30A60			H-40		
30P16	o		H-48	Edo. de México	INIFAP- CEVAMEX
Dk 357		Dekalb	H-52		
Dk 2060			H-51		
SYN 1806	2012	Syngenta	H-57		
Dk 2045	S	Dekalb	Puma 1076		Rega
Dk 2038	i		Puma 1167	2013	INIFAP- UNAM
Garañón	n		Puma 1183		
Ocelote	a	Asgrow	Importado	EE.UU. Brasil 2012	Grano
P3254W	l o		M 296	Veracruz 2009	Nativo: Tuxpeño
P3030	a 2013	Pioneer			

¶L. R.: Localidad y año donde y cuando se realizaron las recolecciones de los híbridos. NOTA: Los recuadros sólo diferencian las zonas de recolecta de los híbridos.

### 3.4.2. Localidad

El experimento se estableció en el Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) del INIFAP, durante el ciclo primavera-verano en Santa Lucía de Prías, Texcoco, Estado de México, ubicado geográficamente a 19° 23' 40" latitud N y 99° 39' 28" longitud O, a una altitud de 2,252 msnm.

### 3.4.3. Diseño y manejo experimental

El ensayo se desarrolló bajo un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA), con 40 tratamientos y tres repeticiones, un total de 120 unidades experimentales cada unidad con un área de 1.6 m<sup>2</sup> sembrando 100 semillas por parcela.

#### Manejo agronómico

- a) Preparación del terreno: Consistió en un paso de arado, dos rastreos, nivelación y surcado; los surcos se hicieron con separación de 0.8 m.
- b) Siembra: Se realizó a tapa pie depositando una semilla cada 0.2 m.
- c) Control de maleza: No se realizó un control de maleza químico debido a la naturaleza del experimento, ya que algún otro ingrediente activo podría alterar los resultados de la prueba.

Se utilizó el herbicida sistémico Faena Fuerte<sup>®</sup> de Monsanto Comercial, S.A. de C.V., cuya constitución química es: Sal de potasio de N-(fosfometil) glicina, con un contenido de ácido glifosato no menor de 81.61 % (equivalente a 540 g de ingrediente activo [ácido glifosato] L<sup>-1</sup> a 20 °C) con Transorb<sup>®</sup> como agente que potencializa la velocidad de penetración (Monsanto, 2010). La dosis utilizada fue la recomendada para el cultivo de maíz (3 L ha<sup>-1</sup>) y se asperjó una vez, cuando las plantas estaban en estado vegetativo (V4-5) hasta con 5 hojas desarrolladas hasta un mes después de la siembra.

#### 3.4.4. Variables evaluadas

Se registraron variables antes y después de la aplicación del herbicida, las que permitieron determinar la respuesta de cada uno de las poblaciones en estudio:

- a) Plantas establecidas: El número total de plantas establecidas se tomó a los 20 días después de la siembra en cada población y en cada repetición.
- b) Plantas sobrevivientes: 15 días después de la aplicación del glifosato (15 dda.) se realizó un conteo de las plantas sobrevivientes por cada material probado, en cada una de sus repeticiones.
- c) Frecuencia de resistencia (FR): Ésta se calculó dividiendo el número de plantas sobrevivientes por parcela, entre el número de plantas establecidas por parcela.
- d) Nivel de daño: Se estableció una escala visual para calificar el nivel de daño presente por la acción del herbicida (clorosis en hojas nuevas; cambio de color de verde a bronceado; muerte del tejido) en las plantas (15 dda.). En cada población se tomó el nivel de daño más frecuente en sus repeticiones. La escala quedó como se indica a continuación (Figura 2B):

Nivel 1 (N1): Sin daño aparente en la planta completa

Nivel 2 (N2): Sin daño aparente en 75 % del tejido de la planta

Nivel 3 (N3): Sin daño aparente en 50 % del tejido de la planta

Nivel 4 (N4): Sin daño aparente en 25 % del tejido de la planta

Nivel 5 (N5): Planta totalmente seca

A los 15 dda. se colectaron muestras de los tejidos de hoja menos dañados de las plantas entre N1 y N4 por repetición de cada híbrido, se etiquetaron y se almacenaron a -20 °C en un congelador horizontal (Torrey® modelo CH15, México)

### 3.4.5. Detección de proteínas recombinantes

A las plantas resistentes a glifosato en campo (N1-N4), se les realizó una prueba basada en proteínas (ELISA) para la inmunodetección de la proteína recombinante CP4/EPSPS (protein 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, enzima procedente de *Agrobacterium sp.*, cepa cuatro) con el kit RR® de la marca Agdia® (sin modificaciones al protocolo) a través de una muestra de hojas compuesta, analizada por duplicado (las hojas colectadas se cortaron con la tapa de un tubo Eppendorf hasta obtener 30 discos homogéneos). Los resultados se evaluaron con un lector de placas Multiskan FC whit incubator, con el software Skanlt 3.1.0.4 RE (Thermo Scientific Multiskan®, EE.UU.) a 450 nm. Los controles positivos (C<sup>+</sup>) incluidos en el kit, se prepararon con base en el mayor número de tejido foliar de las plantas en estudio, quedando de la siguiente manera: 1:1; 1:15 y 1:30. Los resultados de esta prueba se consideran confiables en 95 % de los casos sometidos (Ausubel *et al.*, 1995).

### 3.4.6. Análisis estadístico

Para la variable de respuesta (FR), se realizó un ANAVA y una prueba de medias por el método de Tukey, así mismo se realizaron pruebas de contrastes ortogonales para comparar un híbrido recolectado en dos localidades. Los resultados presentados son los promedios de frecuencias de resistencia a glifosato de cada híbrido.

Para el la prueba basada en proteínas de laboratorio, se realizó una prueba cuantitativa de los datos (Cuadro 10), con base en las densidades ópticas (*DO*) e Índice de Muestra *IM* determinando el punto de corte (*Cut off*) de los C<sup>-</sup> (nativo de Veracruz: 296) con el cual se interpreta un resultado negativo, utilizando las siguientes fórmulas:

$$Cut\ off = \frac{DO(C^-) + DO(C^-)}{2} + 0.150$$

Se determinó el índice de muestra de cada híbrido con la siguiente ecuación:

$$IM = \frac{DO(Híbrido)}{Cut\ off}$$

Donde;

*Cut off*= punto de corte;

*DO*= Densidad óptica;

*C*= Lectura de la densidad óptica del control negativo.

**Cuadro 2C. Interpretación de los resultados de la prueba cualitativa de ELISA por el método de interpretación de *DO* e *IM*.**

Método			
Densidad Óptica ( <i>DO</i> )		Índice de muestra ( <i>IM</i> )	
Interpretación			
> 0.3	Positivo (+)	> 1.1	Positivo (+)
< 0.1	Negativo (-)	< 0.9	Negativo (-)
0.3 a 0.1	Indeterminado (+/-)	1.1.a 0.9	Indeterminado (+/-)
Controles Valor esperado			
< 0.6	Positivo (+)		
> 0.3	Negativo (-)		
Fuente	RR® Agdia® (2013)	Fuente	Aranís <i>et al.</i> (2008)

### 3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.5.1. Plantas resistentes a Glifosato

De los 40 híbridos comerciales probados en el ANAVA, se encontró que por lo menos uno fue diferente a los demás con respecto a su FR (Cuadro 3C).

**Cuadro 3C. Análisis de varianza para frecuencia de resistencia en híbridos comerciales. P/V, 2013.**

F.V.	GL	SC	CM	Sig.
Tratamientos	39	0.579	0.015	**
Bloques	2	0.007	0.003	*
Error	78	0.072	0.0009	
Total	119	0.658		
C.V.	33.25			

\*; \*\*=significancia al 0.05 y al 0.01, respectivamente.

En total 15 híbridos presentaron la mayor FR (0.12 a 0.26), destacando los del estado de Hidalgo, que incluyeron los híbridos: 30G40 (Pionner) y Dk 2060 (Dekalb) probados en la investigación de Peña (2013) quien encontró presencia de proteínas recombinantes en estos materiales en concentraciones menores al 1 %. El híbrido local H-48, presentó FR de 0.19 (Cuadro 4C), probablemente porque la expresión fenotípica de resistencia (cutícula engrosada y resistencia mecánica) se presenta más favorablemente en materiales más adaptados a las condiciones ambientales, ello podría ayudar a tolerar de forma natural un daño como el causado por el herbicida (Cruz *et al.*, 2010).

**Cuadro 4C. Comparación de medias por el método de diferencias mínimas LSD de 40 híbridos evaluados en campo para FR. Santa Lucía de Prías, INIFAP-CEVAMEX. P/V, 2013.**

Híbrido	N.D.	FR		Híbrido	N.D.	FR	
Caimán	2	0.26	a	Dk 2034	3	0.06	f-m
Tigre F <sub>1</sub>	2	0.25	ab	P 3050W	3	0.05	g-m
Jabalí F <sub>1</sub>	2	0.23	a-c	H-52	3	0.05	g-m
Cobra	2	0.21	a-d	Vulcano	3	0.05	g-m
H-48	3	0.19	a-e	Faisán	3	0.05	h-m
Garañón	2	0.17	a-e	MJ 8092	3	0.05	h-m
Cimarrón F <sub>1</sub>	2	0.17	a-e	As 823	3	0.04	i-m
P 33J56	3	0.16	b-f	H-51	3	0.04	i-m
P 30G40	3	0.15	b-g	P 30p16	3	0.04	i-m
Jabalí F <sub>2</sub>	2	0.15	c-h	Hércules	3	0.04	i-m
A7573	3	0.13	c-i	Puma 1076	3	0.03	i-m
Cimarrón F <sub>2</sub>	3	0.13	c-i	Puma 1167	3	0.03	j-m
Brasil F <sub>2</sub>	1	0.13	d-k	H-40	3	0.03	j-m
Dk 2060	2	0.12	d-l	Puma 1183	3	0.03	k-m
Dk 2038	3	0.12	d-l	Tigre F <sub>2</sub>	3	0.02	lm
Ocelote	3	0.10	e-m	P 1884	3	0.02	lm
P 3254W	3	0.09	e-m	H-57	4	0.02	lm
Dk 2045	3	0.09	e-m	30A60	4	0.01	m
P 3030	3	0.07	f-m	SYN 1806	4	0.01	m
Dk 357	4	0.07	f-m	P 3368W	4	0.01	m
				DHS (0.05)		0.10	

\*Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). N.D.: Nivel de daño; FR= Frecuencia de resistencia promedio de cada híbrido, con base en las repeticiones. Los recuadros agrupan los híbridos obtenidos como F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> en dos diferentes localidades.

El grano importado de Brasil registró el menor nivel de daño a la aplicación de glifosato en campo; pues se observaron plantas sin daño aparente (N1) y FR de 0.13 (Cuadro 4C), esto concuerda con lo reportado por Mercer y Wainwright (2007) y Acatzi (†Com. pers.) quienes encontraron eventos para resistencia a glifosato en muestras de grano importado. En Brasil aproximadamente 87 % del maíz producido es GM (ILSI, 2012). Esto evidencia que el flujo génico entre maíz introducido como grano que todavía conserva viabilidad hacia los híbridos sembrados en México, es posible, lo cual representa un riesgo grave y un medio efectivo para diseminar transgenes en el caso de que los materiales importados sean GM tal como lo mencionan Carreón *et al.* (2011) en su investigación sobre maíces nativos de la Mixteca Poblana y materiales introducidos y distribuidos por las tiendas Diconsa.

En el estudio la siembra de maíz importado para consumo y uso industrial, se realizó con el objetivo de evidenciar el riesgo latente de contaminación que existe ya que las plantas adultas con capacidad reproductiva pueden tener intercambio genético con los híbridos que se encuentren en producción, ya sea de semilla o de grano.

Cabe destacar el comportamiento diferencial de los híbridos colectados en dos localidades como F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> (Cuadro 5C), pues al tratarse de semilla certificada se esperaría una respuesta un tanto similar en la F<sub>2</sub> con respecto a la F<sub>1</sub>, sin importar su procedencia, esta diferencia puede ser atribuible a la respuesta del genotipo en diversos ambientes. Las semillas certificadas deben tener un estricto control en los lotes de producción, para asegurar la calidad genética y la pureza varietal a la par de la calidad sanitaria, de acuerdo con la Ley Federal de Producción, Certificación y Comercio de Semillas (Gobierno Federal, 2007). Para que se expida la certificación del lote por parte del SNICS, se deben cubrir en forma correcta los requisitos de aislamiento.

De comprobarse la presencia de material GM en híbridos comerciales sería una situación grave, pues existiría la posibilidad de diseminación de estos genes hacia poblaciones nativas y en ese caso debería revisarse con detalle ya que los obtentores estarían cayendo en un delito y se deberán aplicar las sanciones relativas a la Ley Federal de Producción y Certificación de Semillas (2007), la LBOGM (2005) y su reglamento (2008), la Ley Federal de Variedades Vegetales (1996) y su reglamento (1998) y las demás leyes pertinentes. Convendría realizar nuevas pruebas con un mayor tamaño de muestra por híbrido, aunque, al tratarse de semilla certificada, ésta debe tener calidad genética y pureza varietal *per se* para asegurar que una muestra pequeña, como la de este estudio, pueda ser representativa para el genotipo.

**Cuadro 5C. Comparación de tres híbridos obtenidos en dos localidades evaluados para resistencia a glifosato en campo. Ciclo P/V, 2013.**

Contraste		GL	CM	Sig.
Tigre	F1 Vs F2	1	738.82	**
Cimarrón	F1 Vs F2	1	22.20	NS
Jabalí	F1 Vs F2	1	103.10	**

\*; \*\*= significancia al 0.05 y al 0.01, respectivamente. NS= No significativo.

### 3.5.2. Detección de proteínas recombinantes

Con la metodología aplicada (ELISA) se obtuvieron valores de Densidad Óptica (*DO*) entre 0.033 y 0.875. Los controles positivos resultaron positivos con valores de *DO* de 0.675 a 0.874 y el grupo control negativo resultó negativo a la prueba con valores de *DO* entre 0.033 a 0.046. Con base en su *DO*, no se encontró reacción a la proteína CP4/EPSPS en ninguno de los híbridos evaluados, sólo el híbrido Jabalí F<sub>2</sub> tuvo un resultado indeterminado (0.126) dejando la pauta para hacer más pruebas para descartar falsos negativos (Cuadro 6C).

**Cuadro 6C. Prueba cualitativa de ELISA con base en la Densidad Óptica (DO), en híbridos resistentes a glifosato probados en campo.**

Híbrido	DO		Híbrido	DO		Híbrido	DO	
Buffer	0.046	-	C. F <sub>2</sub>	0.072	-	J. F <sub>1</sub>	0.036	-
C <sup>-</sup> M296	0.038	-	Cobra	0.055	-	J. F <sub>2</sub>	0.126	(+/-)
C <sup>+</sup> 1:1	0.874	+	DK 2060	0.053	-	MJ 8092	0.042	-
C <sup>+</sup> 1:15	0.777	+	DK 2034	0.043	-	Ocelote	0.049	-
C <sup>+</sup> 1:30	0.675	+	DK 2038	0.049	-	Tigre	0.047	-
As 823	0.041	-	DK 2045	0.054	-	30A60	0.060	-
A 7573	0.045	-	EE.UU.	0.078	-	30G40	0.063	-
Brasil	0.051	-	Garañón	0.074	-	33J56	0.059	-
Caimán	0.049	-	H-48	0.045	-	Vulcano	0.048	-
C. F <sub>1</sub>	0.083	-	H-52	0.042	-			

C.F<sub>1</sub> = Cimarrón de Hidalgo; C. F<sub>2</sub> = Cimarrón de Jalisco; J. F<sub>1</sub> = Jabalí de Hidalgo; J. F<sub>2</sub> = Jabalí de Jalisco. (+/-) = Resultado indeterminado de acuerdo a la tabla de interpretación (Aranís *et al.*, 2008).

En cuanto al método de interpretación de la prueba cualitativa con base en el *IM* calculado donde el punto de corte fue de 0.188, se obtuvo la misma respuesta que con la *DO* (Figura 1C). No se descarta la posibilidad de que alguno de estos genotipos podría ser reactivo a otra proteína recombinante, por lo que se deben realizar más pruebas por inmunodetección y PCR.

Los resultados de este estudio también podrían indicar resistencia natural al herbicida glifosato, como producto de alguna transferencia vertical de resistencia de los parientes silvestres del maíz (teocintle) o por presión de selección, como ocurre en las plantas llamadas maleza que generan diversos mecanismos de resistencia ante la sobreexpresión de la proteína EPSPS, también por la pérdida de afinidad del sitio de acción o cualquier otra resistencia independiente al sitio de acción del herbicida (Cruz *et al.*, 2010).

Es importante señalar que en el muestreo azaroso se pudieron haber omitido plantas que posean alguna característica constituyente de un OGM, por lo que, dada la relevancia del tema, se deben hacer más pruebas con el mayor número de individuos por híbrido, de acuerdo al alcance y las posibilidades económicas de cada estudio.

Esta omisión pudo haber ocurrido en el estudio realizado por Ortiz *et al.* (2005) quienes indagaron los hallazgos reportados por Quist y Chapela (2001), sobre detección de transgenes en las variedades de maíz nativas de Oaxaca, no encontrando la misma respuesta y concluyendo que estos genes habían sido suprimidos; sin embargo, mencionan la posibilidad de obtener falsos negativos por algún error en el manejo de las muestras al utilizar umbrales comerciales para la interpretación de los geles de electroforesis de los productos de la PCR, o por el tamaño de las muestras y el muestreo azaroso donde pudieron existir omisiones.

Un caso similar fue el ocurrido en Perú donde el Instituto Nacional de Innovación Agraria, realizó una investigación en la zona del Valle de Barranca, a partir de un reporte en 2007, sobre detección de eventos transgénicos no autorizados por el gobierno para la siembra en esa zona, realizada por la Dra. Gutiérrez, sin embargo, en este estudio no se encontraron dichos eventos (INIA, 2010).

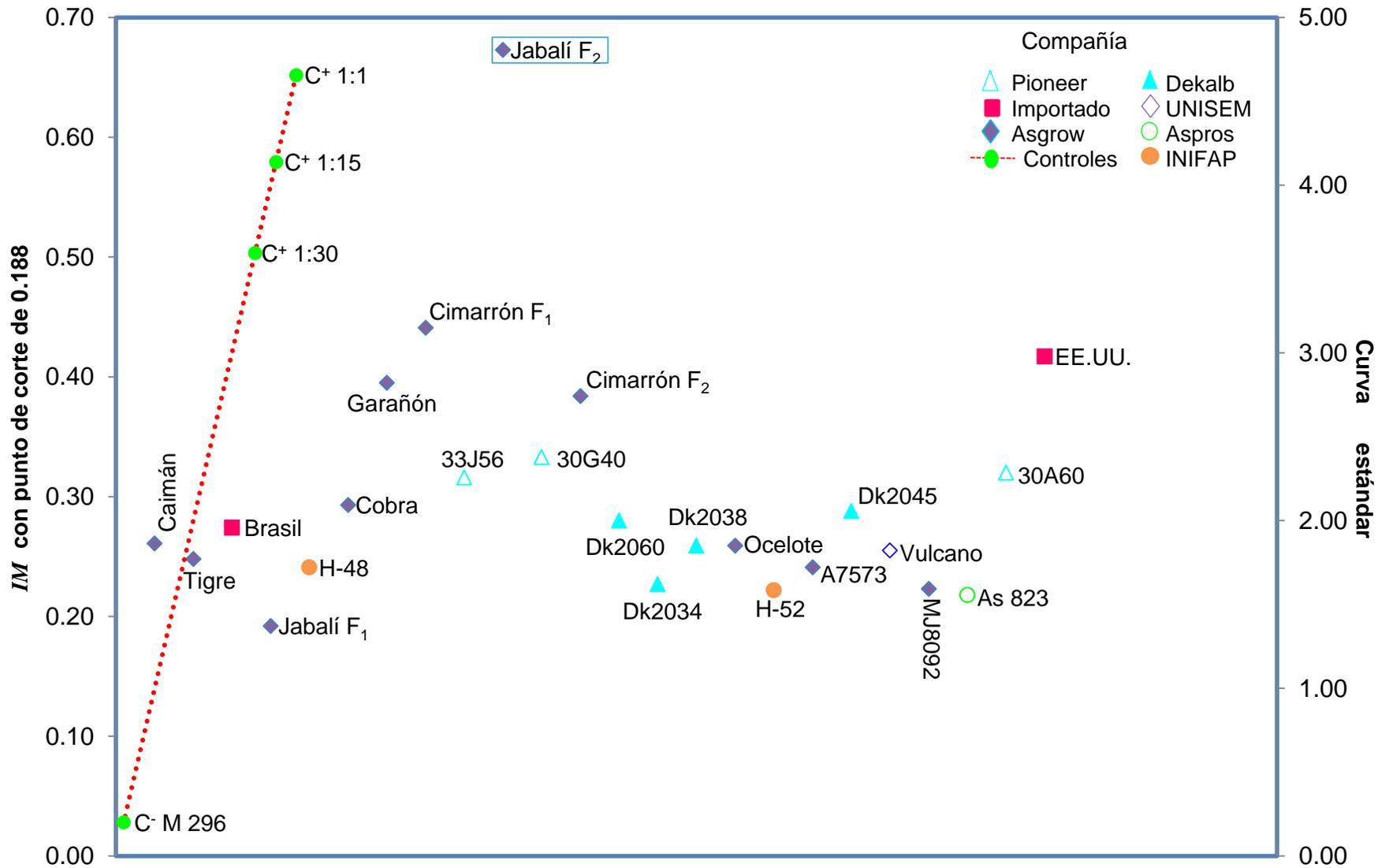


Figura 1C. Prueba cualitativa ELISA con base en el Índice de muestra (*IM*) en híbridos resistentes a glifosato probados en campo, comparados con una curva estándar.

### 3.6. CONCLUSIONES

No se encontraron muestras reactivas para la proteína recombinante CP4/EPSPS en la prueba basada en proteínas (ELISA) realizada en los híbridos en F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>, en comparación con la prueba de campo; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que estos híbridos puedan ser reactivos a alguna otra proteína recombinante y conviene realizar pruebas basadas en ADN como RT-PCR.

De acuerdo a la FR en campo en las muestras evaluadas, los híbridos de Hidalgo tuvieron las mayores frecuencias en especial el híbrido Caimán de Monsanto<sup>®</sup> (0.26), por lo que se debe poner especial atención a una probable introgresión transgénica en las zona productoras de maíz en este estado. El híbrido P3368W de Pionner<sup>®</sup> de la zona del Bajío registró la menor frecuencia (0.07).

El híbrido Jabalí F<sub>2</sub> (Asgrow<sup>®</sup>) presentó un resultado indeterminado por *DO* (0.126), pudiendo tener un falso negativo por lo que, se deben hacer más pruebas para descartar dicha duda.

### 3.7. LITERATURA CITADA

- Álvarez-Buylla R E, A Piñeyro Nelson (2009)** Riesgos y peligros de la dispersión de maíz transgénico en México. *Ciencias* 92-93: 82-96.
- Aranís J Carolina, 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. *Clinical Microbiology* 2008; 25 (2): 116-121.
- Ausubel F, R Brent, R Kingston, D Moore, J Seidman, J Smith, K Struhl (1995)** *Current Protocols in Molecular Biology*. Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School. John Wiley & Sons, Inc. ed. Supplement. Pp. 18-30.
- Benbrook C M (2012)** Impacts of genetically engineered crops on pesticide use in the U.S. – the first sixteen years. *Environmental Sciences Europe*. Centre for Sustaining Agriculture and Natural Resources, Washington State University, Hulbert 421, PO Box 646242, Pullman, WA 99164-6242, USA. 24(1) 24: 1-13
- Carreón-Herrera N I, H López Sánchez, A Gil Muñoz, P A López, M A Gutiérrez Espinosa, E Valadez Moctezuma (2011)** Flujo genético entre maíces comercializados por Diconsa y poblaciones nativas de la Mixteca Poblana. *Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(6): 939-953.
- Cruz Hipólito H E, J A Domínguez Valenzuela, R De Prado (2010)** Capítulo 4: Mecanismos de resistencia de malezas a herbicidas. *In: Resistencia de plantas a herbicidas*. J A Domínguez Valenzuela y J L Medina Pitalúa (eds). Universidad Autónoma Chapingo México. 1ra. Ed. Pp: 48-60.

**Dyer A G, J A Serratos Hernández, H R Perales, P Gepts, A Piñeyro Nelson, A Chávez, N Salinas Arreortua, A Yúnez Naude, J E Taylor, E R Álvarez Buylla (2009)** Dispersal of transgenes through maize seed systems in Mexico. PloS ONE 4(5): e5734.

**FAOSTAT (2013)** FAO Statistical Databases. Publishing Management Service, Information Division, Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO). Via delle Terme di Caracalla, Rome, Italy. <http://www.agropanorama.com/news/Produccion-Mundial-de-Maiz.htm>.

**Gobierno Oficial (2005)** Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Diario Oficial de la Federación, publicado el 18 de marzo de 2008. Presidencia de la República. México, D.F.

**Gobierno Oficial (2007)** Ley Federal de Producción, Certificación y Comercio de Semillas. Diario Oficial de la Federación, publicado el 15 de junio de 2007. Presidencia de la República. México, D.F.

**Gobierno Federal (2008)** Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. 2008. Diario Oficial de la Federación, publicado el 19 de marzo de 2008. Presidencia de la República. México, D.F.

**Internacional Life Sciences Institute do Brasil (ILSI, 2012)** Guía para la Evaluación de Riesgo Ambiental de Organismos Genéticamente Modificados. De Andrade Paulo P, W Parrot, M Mercedes Roca (eds). Sao Paulo, Brasil. 140 p.

**Instituto Nacional de Ecología (INE)-Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental (CENICA) y Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-Iztapalapa) (2009)** Informe final del estudio: detección de secuencias transgénicas en colectas de maíz nativo destinadas para su conservación en bancos de germoplasma. México. 13 p.

**Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA, 2010)** Regulación de la Seguridad de Biotecnología Agraria. Informe técnico: Verificación de la presencia de cultivos de maíz transgénico en el Valle de Barranca, Perú. 40 p.

**Kato Yamakake T A (2004)** Variedades transgénicas y el maíz nativo en México. Agricultura, Sociedad y Desarrollo 1(2): 101-109.

**Mercer K L y J D Wainwright (2007)** Gene flow from transgenic maize to landraces in Mexico: An analysis. Agriculture Ecosystems & Environment. United States of America. doi:10.1016/j.agee.2007.05.007.

**Monsanto Comercial (2010)** Guía Técnica para el uso de Tecnologías Monsanto Soya Solución Faena®. Pp. 59. México, D.F. extraído de: [www.monsanto.com](http://www.monsanto.com)

**Ortiz García S, E Ezcurra, B Schoel, F Acevedo, J Soberon and A A Snow (2005)** Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca. Mexico. S. PNAS Early Edition. August 102 (35): 12338–12343

**Paganelli A, V Gnazzo, H Acosta, Silvia L López, Andrés E Carrasco (2010)** Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling. Rev. *Chemical Research in Toxicology*. 23 (10): 1586-1595

**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(3): 485-490.

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

**Salazar L. N. J. y M M L Aldana (2011)** Herbicida Glifosato: Usos, toxicidad y regulación. *BIOtecnia* revista de ciencias biológicas y de la salud de la Universidad de Sonora. XIII (2): 23-28

**Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica (SCDB, 2000)** Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica: texto y anexos. Montreal, Canadá: Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica.

**Séralini Gilles-Eric, E Clair, R Mesnage, S Gress, N Defarge, M Malatesta, D Hennequin, J Spiroux de Vendômois (2014)**. Republished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Environmental Sciences Europe* 2014:14, enlace: <http://www.enveurope.com/content/26/1/14>

**Serratos Hernández J A (2009)** Bioseguridad y dispersión de maíz transgénico en México. *Ciencias* 92-93: 130-141.

**Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2013)** Producción anual de maíz grano por Estado, extraído del anuario estadístico de la producción agrícola.: [http://www.siap.gob.mx/aagricola\\_siap/icultivo/index.jsp](http://www.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp)

**Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS, 2012)** Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV), editado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).

**Turrent Fernández A (2010)** Variedades de maíz nativo, maíz transgénico, seguridad alimentaria y conflictos culturales en México. Red por una américa latina libre de transgénicos (RALLT). Boletín Octubre. No. 437.

**Turrent Fernández A, J A Serratos Hernández, H Mejía Andrade, A Espinosa Calderón (2009)** Liberación comercial de maíz transgénico y acumulación de transgénos en razas de maíz mexicano. Rev. Fitotecnia Mexicana 32(4): 257-263.

**Turrent Fernández A, J A Serratos Hernández, A Espinosa Calderón, E R Álvarez Buylla, E González Ortega, A Piñeyro Nelson, C Barros, D Hazam Jara, F Eccardi (2013)** *In*: El maíz transgénico en México (en 15 píldoras). Toledo F, J L Chávez Servia, A de Ávila (eds.). Oaxaca de Juárez, México. 74p.

**WeedScience (2014)** Internacional Survey of Herbicide Resistant Weeds: Weeds Resistant to Glycines: Glyphosate (G/9) by species and country. August, 2014: <http://www.weedscience.org/Summary/MOA.aspx?MOAID=12>

#### IV. DISCUSIÓN GENERAL

El estudio de introgresión de organismos genéticamente modificados, tanto en campo como en laboratorio, es relevante para el caso del maíz en México como centro de origen y diversidad. Varios estudios han comprobado la introgresión transgénica en aproximadamente 15 estados de la República Mexicana como: Oaxaca (Quist y Chapela, 2001; Rivera, 2009); Yucatán (Dyer *et al.*, 2009); Veracruz (Rojas, 2010); Puebla (Rivera, 2009; Dyer *et al.*, 2009; Carreón *et al.*, 2011); Chiapas, Chihuahua (Rivera, 2009) e incluso el Distrito Federal (Serratos, 2007).

Por ello, que es necesaria la creación de metodologías más accesibles y eficientes para el monitoreo del maíz en campo e instituciones como el SENASICA, SNICS, COFEPRIS e instituciones públicas en asociación con el INIFAP y escuelas públicas como la UNAM, CINVESTAV, UACH, IPN y otras, deben atender esta situación en conjunto, para garantizar la estandarización de protocolos para el monitoreo en aspectos que todavía no se han definido como: tamaño estándar de la muestra representativa de una población, registro o híbrido; repetibilidad de la metodología, ello se podría desarrollar con la estandarización del tamaño de muestra, el equipo y la metodología utilizada y la prueba en diferentes laboratorios, para garantizar que una metodología sea repetible y por lo tanto confiable. Se requiere más investigación para estudiar el potencial de sobrevivencia y dispersión de los transgenes para diseñar métodos de regulación y difusión donde existen reservas de semillas locales y prestar especial atención en la comercialización formal e informal de semillas (Dyer *et al.*, 2009). El Servicio de Inspección y Certificación de Semillas debería exigir a las personas físicas o morales una prueba de detección de elementos constituyentes de un OGM, de un laboratorio certificado para ello, como el del Centro Nacional de Referencia de OGM (CNROGM) y así poder rotular como libre de OGM, la etiqueta de cualquier híbrido o variedad de maíz o de cualquier otro cultivo cuyo centro de origen sea México.

Este trabajo aporta datos importantes para mejorar el monitoreo y detección de OGM en el maíz mexicano, además de abrir nuevas preguntas en el tema a). el contraste genético intravarietal observado por las diferencias en la sobrevivencia de individuos en presencia de glifosato es sorprendente, haciendo evidente la heterogeneidad que existe en las semillas analizadas; b) parece existir transferencia vertical al maíz que permite la sobrevivencia de las plantas en presencia de glifosato, esto puede ser aprovechado para el mejoramiento genético tradicional y por lo tanto, no es justificable la liberación de MGM, ya que es innecesaria en un centro de origen y diversidad genética donde los riesgos de flujo transgénico a razas nativas es inevitable y c) las implicaciones económicas de esta investigación para el monitoreo a gran escala.

En esta investigación se han manejado dos técnicas económicas para el monitoreo de la presencia de transgenes, principalmente las basadas en inmunodetección y la aplicación de glifosato en campo para observar sobrevivencia. Este trabajo evidencia que sin el análisis del rastreo de transgenes en DNA (lo cual es muy costoso a gran escala) no se puede diferenciar en este momento, qué técnica es viable.

La presencia de una secuencia GM dentro del genoma de un organismo puede ser un factor intrínsecamente desestabilizador debido a que contiene secuencias que favorecen la unión de recombinasas al ADN, enzimas que pueden cortar y pegar el ADN de manera aleatoria. Esto ha sido comprobado en virus, pero existe la posibilidad de que lo mismo ocurra cuando este promotor es insertado en otros genomas, esto aún no se ha estudiado con detalle. Por ello, resulta imposible controlar el sitio de inserción de un transgen y del efecto sobre el mismo contexto genómico, modificando de manera diferencial un fenotipo (Álvarez y Piñeyro, 2009). Lo anterior podría complicar aún más la detección y verificación de transgenes.

## V. CONCLUSIONES GENERALES

La aplicación de glifosato es una alternativa económicamente accesible para definir la presencia de plantas resistentes a este herbicida en campo y funcionaría como filtro para la discriminación de las plantas a evaluar en las pruebas más enfocadas y costosas de laboratorio.

Se pudo establecer la frecuencia de resistencia en campo, en los registros de Veracruz y el CIMMYT y en los híbridos comerciales teniendo que el material con la frecuencia más alta fue el registro 290 y el 172 de Veracruz (0.33), seguidos de SLP 87 (0.22) y SLP 77 (0.15) del CIMMYT; el material comercial Caimán (0.26), Tigre F<sub>1</sub> (0.25) y Jabalí F<sub>1</sub> (0.23) de Asgrow® y el grano importado de Brasil (0.13).

En la prueba de laboratorio basado en proteínas (ELISA) para detección de la proteína recombinante CP4/EPSPS, el registro 290 perteneciente a la raza Tuxpeño, originaria de Sehualaca, Santiago Tuxtla, del sur de Veracruz, dio positivo a esta proteína, lo que concuerda con el nivel de daño observado en campo (N1), lo cual podría servir como referencia para estudiar en laboratorio los genotipos que llegaran a tener niveles de daño bajos, a los 15 dda. No se descarta la posibilidad de que los materiales evaluados den positivo a alguna otra proteína constituyente de un OGM en otras pruebas más enfocadas.

Los tratamientos que tuvieron un menor nivel de daño en campo fueron: M290 y el grano importado de Brasil con N1, SLP 87 y SLP 87 con N2, así como las accesiones M 216, M 271, M 278, M 291 y M 295, las demás accesiones tuvieron un nivel de tolerancia de N3. De Monsanto® Hidalgo: Dk 2060, Caimán, Tigre, Jabalí, Cobra y Cimarrón; de Monsanto® Guanajuato: Garañon y de UNISEM® Guanajuato: Vulcano, todos con un nivel de tolerancia de N2; el resto de los materiales presentaron un nivel de tolerancia de N3.

La aplicación de glifosato en pruebas de campo constituye una alternativa accesible y rápida para detectar la presencia de plantas resistentes a este herbicida, así como para la identificación de genotipos con resistencia natural al herbicida que podrían ser utilizados en un programa de mejoramiento genético clásico y también, funcionaría como filtro para la discriminación de plantas a evaluar en pruebas específicas de laboratorio, las cuales por su propia naturaleza son más costosas.

El muestreo y los análisis realizados estuvieron en función a la disponibilidad de recursos con que se contó para el desarrollo de este estudio. Es recomendable para próximos trabajos ampliar el número de individuos de cada accesión, a fin de aumentar la precisión de las estimaciones que se realizaron y la probabilidad de detección de frecuencias más bajas de contaminación en laboratorio.

El siguiente paso será analizar el ADN, por alguno de los métodos que se emplean para ese caso, como la técnica de PCR, para buscar elementos que constituyen la estructura de un OGM como lo es el promotor p35S CaMV y el terminador tNOS, lo que se podrá llevar a cabo, tomando muestras de hojas de plantas sobrevivientes o bien en semillas remanentes que corresponden a las muestras de materiales blanco.

## APÉNDICE:

### GLOSARIO:

#### 1. Organismo genéticamente modificado (OGM)

1.1. Según la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) los define como: Cualquier organismo vivo, con excepción de los seres humanos, que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna, tales como técnicas *in vitro* de ácido nucleico, incluidos el ácido desoxirribonucleico recombinante (rADN) y la inyección directa de ácido nucleico en células u órganos; o la fusión de células más allá de la familia taxonómica, que superan las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o de la recombinación y que son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional (Gobierno Federal, 2005).

1.2. Definición que da el Instituto Nacional de Ecología: Son organismos vivos cuyas características han sido cambiadas, usando técnicas modernas en laboratorios especializados, para introducir genes que proceden de otras especies. Estas técnicas permiten separar, modificar y transferir partes del ADN de un ser vivo para introducirlo en el de otro. En plantas se ha buscado conferirles características como: Resistencia a plagas, virus y enfermedades; tolerancia a herbicidas; adaptación a ambientes extremos y mejoras alimenticias (INE, 2014).

1.3. Definición de la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios: También llamados Organismos Vivos Modificados (OVMs), se les confieren características específicas tales como resistencia a insectos plaga (expresan la proteína Cry de la bacteria *Bacillus thuringiensis*) y/o tolerancia a herbicidas (glifosato o glufosinato de amonio) y en cada desarrollo científico-técnico

se caracterizan genes para que los ingenieros genéticos puedan introducirlos a diferentes organismos. Sin embargo esta técnica tendrá que demostrar que incide en el aumento del rendimiento, la menor aplicación de insecticidas; la reducción de los costos y la mejora en la calidad e inocuidad de los OGM (COFEPRIS, 2014).

## **2. Evento**

Muchas veces se utiliza la palabra “evento” al hablar de un OGM. Un evento es un OGM derivado de una sola célula transgénica, es decir, de una sola transformación. Otros OGM creados independientemente en el mismo proceso de transformación pueden tener el mismo transgén, pero en otra posición del genoma, y por lo tanto serán diferentes eventos. Como la integración de un transgén en el genoma ocurre al azar en cada célula, no hay dos OGM derivados independientemente que tengan el transgén en la misma posición del genoma. Por eso a cada OGM derivado independientemente se le denomina “evento”. En la práctica se crean millares de eventos; sin embargo, para fines comerciales sólo uno es seleccionado (ILSI, 2012).

## **3. Resistencia**

Es la capacidad heredable de una población para sobrevivir y reproducirse luego de la exposición repetida a una dosis de herbicida normalmente letal para el tipo silvestre. Puede ser inducida por técnicas como la ingeniería genética, por mutagénesis o por la selección de variantes somaclonales.

## **4. Tolerancia**

Es la capacidad intrínseca de una especie para sobrevivir y reproducirse luego del tratamiento con un herbicida. Supone que no hubo un mecanismo de selección o inducción de la tolerancia ya que la especie es naturalmente tolerante al herbicida.