



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENÉTICA

**LINEA BASE DE INFILTRACIÓN DE TRANSGENES  
EN MAÍCES NATIVOS DE COAHUILA**

**ALEJANDRO CELSO VALLEJO**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN  
CAMPUS MONTECILLO

## **CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Alejandro Celso Vallejo**, alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. Leobigildo Córdoba Téllez**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Línea base de infiltración de transgénos en maíces nativos de Coahuila**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México a 05 de julio de 2019.

Alejandro Celso Vallejo

Dr. Leobigildo Córdoba Téllez  
Vo. Bo. Profesor Consejero  
Dr. Leobigildo Córdoba Téllez

La presente tesis, titulada: **Línea base de infiltración de transgénos en maíces nativos de Coahuila**, realizada por el alumno: **Alejandro Celso Vallejo**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

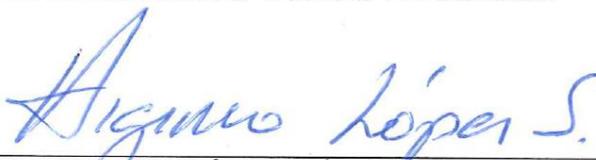
MAESTRO EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GENÉTICA

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO

  
\_\_\_\_\_  
DR. LEOBIGILDO CÓRDOVA TÉLLEZ

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. HIGINIO LÓPEZ SÁNCHEZ

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. VÍCTOR HEBER AGUILAR RINCÓN

Montecillo, Texcoco, Estado de México, julio de 2019.

# LÍNEA BASE DE INFILTRACIÓN DE TRANSGÉNES EN MAÍCES NATIVOS DE COAHUILA

Alejandro Celso Vallejo, M. en C.  
Colegio de Postgraduados, 2019

## RESUMEN

México es centro de origen del maíz y posee áreas con gran diversidad genética de este cultivo transcendental para el país que es la principal fuente de alimentación. Coahuila presenta siete polígonos considerados como centros de origen y diversidad de dicho cultivo, alberga razas y diversidad dentro de razas, que han sido mejoradas por los agricultores y por el libre flujo de genes, ya sea por polen o semilla, crea un sistema de semillas abierto, sujeto a procesos evolutivos de deriva genética, flujo genético y selección, en los que el destino de los transgenes introducidos es difícil de predecir. El presente trabajo se evaluó la diversidad existente en los centros de origen y se estableció una línea base de infiltración de transgenes en maíces nativos en el estado de Coahuila. Se colectaron 192 muestras, se analizaron a nivel de ADN por PCR tiempo real utilizando sondas TaqMan<sup>®</sup> para detectar la presencia del promotor 35S, así como la secuencia del terminador TNOS, utilizadas en la gran mayoría de los maíces transgénicos comerciales. Los resultados muestran que existe una amplia diversidad genética de algunas razas de maíz distribuidas en los polígonos de Coahuila, no obstante, no se encontró colectas de la raza Cónico quizás indicativo de la reducción de la presencia de esta raza en los polígonos muestreados. Se detectó la presencia de secuencias transgénicas en 11 de las 192 muestras analizadas (5.72 %), en niveles que variaron de 0.06 a 8.552 % de ADN, registrándose por primera vez niveles altos de contenido transgénico en maíces nativos en los polígonos muestreados; el nivel más elevado se localizó en las razas Ratón-Tuxpeño norteño y en menor medida en la raza Ratón. De acuerdo a los resultados, se tuvo información suficiente para conocer el estatus actual de los maíces nativos de Coahuila, México y la presencia de transgenes a nivel inter e intrapoblacional, lo que puede ser de utilidad para implementar medidas que aseguren la continuidad de este valioso recurso genético en Coahuila.

**Palabras claves:** maíz nativo, transgénico, Coahuila, razas, diversidad.

# **BASELINE INFILTRATION OF TRANSGENES IN NATIVE MAIZE OF COAHUILA**

**Alejandro Celso Vallejo, M. en C.**

**Colegio de Postgraduados, 2019**

## **ABSTRACT**

Mexico is center of origin the maize and has areas considered as maize genetic diversity centers, which continues to be very important for all of Mexico, because it is the main source of food. Coahuila presents seven polygons considered as centers of origin and diversity of this crop, it hosts races and variants between races improved by farmers by to the free flow of genes, either by pollen or seed, creates an open seed system, subject to evolutionary processes of genetic drift, genetic flow and selection, in which the destination of introduced transgenes is difficult to predict. The objective of this research was to evaluate the existing diversity in the centers of origin, as well as to establish a baseline of infiltration of transgenes in native maize. To that end, 192 accessions were collected, which were analyzed at the DNA level by real-time PCR using TaqMan<sup>®</sup> probes to detect the presence of the 35S promoter, as well as the sequence of the TNOS terminator, used in the vast majority of commercial transgenics. The results show that there is a wide genetic diversity indicated by a greater presence of races distributed in all the polygons, but also the loss of diversity of the Cónico race when no accession is found in the collection. On the other hand, transgenic sequences were detected in 11 of the 192 analyzed samples (5.72%), at levels ranging from 0.06 to 8.552% of DNA, registering high levels of transgenic content in native maize for the first time; the highest level was found in the Ratón-Tuxpeño norteño races and to a lesser extent in the Ratón race. According to the results, there was sufficient information to know the current status of the native maize of Coahuila, Mexico and the presence of transgenes at the inter and intrapopulation level, which may be useful to implement measures to ensure the continuity of this valuable genetic resource in Coahuila.

**Keywords:** native maize, transgenic, Coahuila, races, diversity.

## DEDICATORIA

*A mi mamá Rosa de la Luz Vallejo y sobre todo a mi papá Miguel Ángel Celso, aunque ya no está conmigo sé que él está muy orgulloso porque este logro es de ustedes también, producto de sus esfuerzos invertidos en mí; gracias por todo lo que me han dado.*

*A mis hermanos: Ma. Rosa, Alicia D., J. Miguel, Antonio y a Rebeca, porque forman parte importante de mi vida.*

## AGRADECIMIENTOS

Al **Pueblo de México**, que gracias a sus impuestos existen programas de becas para que mexicanos y también extranjeros tengamos la oportunidad de estudiar.

Al **Colegio de Postgraduados *Campus Montecillo***, por darme la oportunidad de estudiar la Maestría en Ciencias.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por la beca otorgada durante mis estudios de Maestría en Ciencias.

Al **Dr. Amalio Santacruz Varela**, por aceptarme en una estancia universitaria y por formar parte de mis asesores de tesis de licenciatura, lo cual me motivó a seguir con los estudios de M. C.

Al **Dr. Leobigildo Córdova Téllez**, por haberme aceptado como tesista de licenciatura y por ser mi Consejero, por su valioso apoyo brindado durante esta etapa de mi formación académica, por su disposición en querer trabajar conmigo, por compartir sus conocimientos, por sus enseñanzas y por su amistad brindada.

Al **Dr. Higinio López Sánchez**, por formar parte de mi Consejo Particular, por el excelente Curso de Escritura, Publicación y Presentación de Artículos Científicos y sobre todo por el apoyo brindado durante toda la investigación, tanto en los análisis estadísticos como en la revisión de toda la tesis, por ser un gran profesor y por su valiosa amistad.

Al **Dr. Víctor Heber Aguilar Rincón**, por formar parte de mi Consejo Particular y por su apoyo brindado durante la ejecución de la presente investigación y en la revisión de este escrito.

A los trabajadores del Colegio **Juan Herrera Hernández** y **Aristeo López Hernández**, por su valioso apoyo en la toma de datos.

Al **Ing. Ricardo López Ortega**, por la traducción al inglés de los resúmenes.

A **todas las amistades** que hice durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

A todas mis amistades que me han acompañado a lo largo de mi vida

## CONTENIDO

RESUMEN .....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL. ....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. ....	1
OBJETIVOS. ....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos. ....	3
HIPÓTESIS.....	4
Hipótesis general.....	4
Hipótesis particulares.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA. ....	4
Origen y diversidad del maíz. ....	4
Mejora clásica y mejora biotecnológica en la agricultura. ....	6
Flujo génico. ....	7
Cultivos transgénicos.....	8
Métodos de detección y cuantificación de OGM.....	8
Incertidumbre, riesgos y peligro de la liberación de los OGM.....	9
El maíz y su importancia en México.....	10
LITERATURA CITADA. ....	11
<b>CAPÍTULO I. DIVERSIDAD MORFOLÓGICA DE VARIEDADES NATIVAS DE MAÍZ DE COAHUILA MÉXICO. ....</b>	<b>17</b>
RESUMEN .....	18
ABSTRACT.....	19
INTRODUCCIÓN .....	20
MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
Ámbito geográfico .....	22
Localidades a muestrear.....	22
Método de muestreo.....	23
Colecta de semilla.....	24
Identificación racial .....	24
Características cuantitativas.....	24

Clasificación y distribución .....	24
Descripción morfológica.....	25
Análisis de dispersión y clasificación .....	25
Cuantificación de índices de diversidad .....	25
RESULTADOS.....	28
DISCUSIÓN .....	35
CONCLUSIONES .....	37
AGRADECIMIENTOS .....	38
LITERATURA CITADA .....	38
<b>CAPÍTULO II. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TRANSGENES EN MAICES NATIVOS DE COAHUILA.....</b>	<b>43</b>
RESUMEN .....	44
ABSTRACT.....	45
INTRODUCCIÓN .....	46
MATERIALES Y MÉTODOS .....	49
Ámbito geográfico de aplicación.....	49
Definición de los polígonos a muestrear.....	49
Colecta de poblaciones. ....	51
Obtención y muestreo de harina. ....	52
Extracción y Cuantificación de ADN .....	52
Determinación y cuantificación de secuencias transgénicas .....	53
RESULTADOS.....	54
Detección de la secuencia del promotor 35S .....	54
Detección de la secuencia terminadora tNOS.....	54
Cuantificación de la presencia de transgenes.....	55
DISCUSIÓN .....	58
CONCLUSIONES .....	60
AGRADECIMIENTOS .....	60
LITERATURA CITADA .....	60
CONCLUSIONES GENERALES.....	68

## LISTA DE CUADROS

### CAPÍTULO I.

Cuadro 1.1. Clasificación a nivel raza de las poblaciones de maíz colectadas en Coahuila, 2017.....	28
Cuadro 1.2. Analisis de varianza de los caracteres de mazorca y grano en poblaciones de miz nativas de Coahuila, 2017 .....	29
Cuadro 1.3. Comparación de medias de Tukey para las características morfológicas en mazorca y grano. ....	30
Cuadro 1.4. Análisis de los componentes principales para el estudio de la diversidad entre y dentro de grupos raciales de maíz de Coahuila, 2017.....	31

### CAPÍTULO II.

Cuadro 2.1. Muestras de maíz del estado de Coahuila positivas para la presencia del promotor 35S.....	54
Cuadro 2.2. Muestras de maíz del estado de Coahuila positivas para la presencia del terminador tNOS.....	55
Cuadro 2.3. Nivel de introgresión de secuencias transgénicas en maíces positivos del estado de Coahuila con respecto al promotor 35S y al terminador tNOS.....	56

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I.

Figura 1.1. A) Centros de origen y diversidad genética de maíz en el estado de Coahuila. B) Polígonos declarados como centros de origen y diversidad genética del maíz y sus parientes silvestres en México. ....	22
Figura 1.2. Distribución geográfica de las razas de maíz nativas colectadas en Coahuila, 2017.....	28
Figura 1.3. Dispersión de las 181 poblaciones de maíz nativo de Coahuila con base en los dos primeros componentes principales. A) Dispersión de las poblaciones por polígono. B) Dispersión de individuos por raza. ....	32
Figura 1.4. Dendrograma de relaciones entre 181 poblaciones de maíz nativo de Coahuila obtenido por el método de la media aritmética no ponderada (UPGMA). ....	33
Figura 1.5. Índices de diversidad en los periodos 1943-1952, 2006-2008 y 2017 dentro de los 7 polígonos denominados como centros de origen y de diversidad genética del maíz en Coahuila.....	34

### CAPÍTULO II.

Figura 2.1. A) Centros de origen y diversidad genética de maíz en el estado de Coahuila. B) Polígonos declarados como centros de origen y diversidad genética del maíz y sus parientes silvestres en México. ....	49
Figura 2.2. Puntos muestreados en los Centros de Origen en el estado de Coahuila. ....	51
Figura 2.3. Curva estándar de cuantificación utilizada para la determinación del nivel de introgresión de secuencias transgénicas en maíces positivas del estado de Coahuila con respecto al promotor 35S y terminador tNOS. ....	55
Figura 2.4. Intervalos de amplificación para el promotor CaMV-35S en la muestra 15 (M15) y 9 (M9). ....	56
Figura 2.5. Intervalos de amplificación para el promotor CaMV-35S en la muestra 14 (M14) y 15 (M15). ....	57
Figura 2.6. Ubicación geográfica de las muestras positivas de maíz en Coahuila. ....	57

## **INTRODUCCIÓN GENERAL.**

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Los cereales siguen siendo la fuente de alimentación más importante en el mundo; entre los principales se encuentra el trigo, el arroz y el maíz (FAO, 2019) En el año 2017, la producción mundial del maíz alcanzo 694.3 millones de toneladas superando la producción de trigo y arroz, que produjeron 690.7 y 687.8 millones de toneladas, respectivamente (FAOSTAT, 2019). En México la producción de maíz en 2017 se estimó en 27.7 millones de toneladas, de las cuales 13.3 se produjeron en condiciones de riego y 14.4 millones de toneladas en temporal (SIAP, 2019); no obstante, la producción total de maíz resulta insuficiente para satisfacer la demanda que sobrepasa los 37 millones de toneladas de grano (FIRA, 2016).

En este contexto urge elevar los niveles de producción de este cereal, desde una agricultura sostenible satisfaciendo las necesidades actuales y futuras, así como la mejora de los cultivos. En el 2012 se publicó un acuerdo por el que se determinan los centros de origen y centros de diversidad genética del maíz en México (SAGARPA, 2012), en el que inicialmente, se declaran como centros de origen y de diversidad genética del maíz algunas áreas comprendidas en los estados de Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Sonora, Sinaloa, Nuevo León, Tamaulipas y Coahuila. Estos estados son estratégicos para la producción de maíz en México, pues en su conjunto aportan alrededor de una cuarta parte de la producción total. En los estados del norte, incluidos en el acuerdo de centros de origen y diversidad, la producción comercial de maíz se lleva a cabo bajo el régimen de riego 21.0 % y de temporal con 79.0 % (INEGI, 2017).

Lo anterior ocasiona que las poblaciones nativas se encuentren dispersas en pequeñas unidades de producción hacia las partes de topografía más irregular y cultivadas bajo un

régimen de temporal, condiciones que generan una gran variación genética. Coahuila, aunque no representa una fuente potencial para la producción de maíz, contiene una gran riqueza genética, que está constituida de manera compleja por tipos raciales, variantes dentro de raza e intermedias entre razas, que han sido desarrollada por los agricultores, como son las razas Celaya, Cónico Norteño, Elotes cónicos, Tuxpeño Norteño, Olotillo Tuxpeño y Ratón (Rincón-Sánchez, 2014).

Estas poblaciones nativas de maíz se han conservado de generación en generación y contienen una amplia diversidad genética, que representan una fuente de genes que pueden ayudar a resolver los principales problemas de producción de este cultivo, así como el cambio climático, enfermedades fitosanitarias, entre otras. No obstante, el reservorio genético mantenido en estas poblaciones ha sido poco estudiado y se está erosionando por la implementación de nuevos cultivos, como lo es el sorgo forrajero, avena forrajera y algodón o la introducción de materiales mejorados de reducida base genética (maíz híbrido). Es claro entonces que existe una urgente necesidad de un estudio a fondo de la diversidad genética contenida en esas poblaciones, dado que constituyen un reservorio valioso de genes de resistencia que serían necesarios ante la presencia de nuevas plagas y enfermedades, como ocurrió en los años setentas en la industria semillera en los Estados Unidos, cuando los híbridos de Texas desarrollaron una gran susceptibilidad al ataque de un hongo (*Helminthosporium maydis* raza T), cuya resistencia se encontró en material genético de accesiones de maíz originarias de México (Muñoz, 2003).

La infiltración de transgenes a poblaciones nativas de maíz ha sido un tema polémico y controversial, Quist y Chapela (2001) reportan la presencia de maíz transgénico en maíces nativos de Oaxaca, con posibles consecuencias a poblaciones nativos debido a varios niveles de infiltración genética de maíces transgénicos a los maíces nativos (Doebley, 1989;

Serratos *et al.*, 1995; Kato, 2004; Turrent y Serratos, 2004; Snow, 2002), lo que origina la necesidad de evaluar las poblaciones nativas presentes en diferentes estados, como Coahuila, para descartar cualquier posible “introgresión genética”. Por lo tanto, es importante establecer una línea base sobre la diversidad existente de maíces criollos en Coahuila y sobre la presencia o no de transgenes, la cual es necesaria a fin de contar con la información pertinente para la toma de decisiones futuras para la conservación de los maíces nativos.

## **OBJETIVOS.**

### **Objetivo general.**

Establecer una línea base de diversidad genética y detectar la presencia/ausencia de transgenes en los centros de origen y de diversidad genética de maíz en Coahuila, México.

### **Objetivos específicos.**

1. Precisar el nivel de diversidad morfológica y verificar la continuidad de la presencia racial en poblaciones de maíz nativo de Coahuila.
2. Cuantificar la presencia del promotor 35S y terminador tNOS presentes en los maíces nativos de Coahuila, México.

## **HIPÓTESIS**

### **Hipótesis general.**

La diversidad genética de los maíces nativos presentes en los centros de origen y de diversidad genética están disminuyendo, aunado a que existe infiltración de transgénos hacia las variedades nativas de maíz en los centros de origen y de diversidad genética en Coahuila, México.

### **Hipótesis particulares.**

La diversidad genética de los maíces nativos está ausente o está disminuyendo en los centros de origen y de diversidad genética en Coahuila, México.

No existe un flujo de infiltración de contenido alto de transgenes hacia los maíces nativos en los centros de origen y de diversidad genética en Coahuila, México.

## **REVISIÓN DE LITERATURA.**

### **Origen y diversidad del maíz.**

Existen varias teorías acerca del origen del maíz desde el siglo XIX en 1895 Ascherson propuso la hipótesis de que el teocintle era un ancestro del maíz (Mangelsdorf y Reeves, 1959). Otra de las teorías es que el maíz fue domesticado de un maíz silvestre (Teoría tripartita). Anderson (1945) propuso la teoría “anfidiplóide”, en la que surgiere que el maíz

primitivo se originó en el sureste de Asia por medio de la hibridación y duplicación genómica de dos especies con cinco pares de cromosomas (*Coix* y *Sorghum*).

En 1951 Singleton sugirió que el mutante “Corn Grass” puede mostrar algunos de los caracteres primitivos tipo ancestral. En la actualidad solo se consideran tres teorías importantes: el teocintle un ancestro del maíz, la teoría tripartita y la teoría del ancestro común. La primera teoría es la más aceptada, en la que se señala que el teocintle es el ancestro del maíz, llevada a cabo por el hombre en un proceso de domesticación (Matsuoka *et al.*, 2002).

Ahora bien, en cuanto al lugar de origen del maíz existe una teoría denominada “Teoría multicéntrica del origen del maíz”, en la cual se señala mediante estudios cromosómicos que los maíces y los teocintles se originaron y se desarrollaron en varias regiones de México y en Guatemala; es decir, la zona denominada como Mesoamérica, en lo que comprende México a la altura media de los estados de Morelos, México, Guerrero y sus alrededores, en donde se desarrolló el complejo Pepitilla, en el centro-norte de Oaxaca el complejo Tuxpeño, en las regiones de Oaxaca y Chiapas se originó el complejo Chapalote y en lo que comprende la región de Guatemala surgió el complejo Altos de Guatemala (McClintock, 1981).

Matsuoka *et al.* (2002) postularon una nueva teoría, la “Teoría unicéntrica”, en la cual sugieren que el maíz pudo haber tenido un único origen o monofilético. El teocintle raza Balsas (*Zea mays* ssp. *Parviglumis*) posiblemente fue el precursor del maíz cultivado; esto debido a que los dendrogramas filogenéticos sugieren que de las poblaciones de esta raza se domesticó el maíz y no necesariamente fue un solo evento, resultados que divergen con los de Fukunaga *et al.* (2005). Benz (2006) concluye que es importante seguir investigando en la búsqueda de microfósiles, tanto de maíz como de teocintle, para conocer más a detalle la

evolución del maíz y poder comprender el origen y la evolución de este cereal. En la actualidad el maíz está en constante movimiento en todo el país, ya sea por flujo génico de manera libre, intercambio de semillas entre los agricultores o comercio de las semillas, que mantiene la diversidad de la especie y sus variedades (CONABIO, 2006).

### **Mejora clásica y mejora biotecnológica en la agricultura.**

Desde hace miles de años el hombre ha hecho mejoramiento, alterando la estructura genética de los cultivos que siembra, mediante la selección para obtener características tales como el crecimiento más rápido, semillas más grandes o frutos más dulces, proceso desarrollado por personas que no conocían las bases científicas del fitomejoramiento (Morris *et al.*, 2006). El mejoramiento genético de las plantas mediante métodos convencionales depende del carácter alógamo o autógeno. Con la ayuda de la selección de individuos (progenitores) durante varias generaciones de polinización controlada se logra obtener líneas puras (líneas endogámicas), que al cruzarse entre sí se obtiene el “vigor híbrido” (Alfaro y Segovia, 2009), aunque con una diversidad genética mucho menor que la que se puede encontrar en los campos de manera natural, en la que muchos de los casos se mantienen y en algunos hay un aumento de diversidad genética en cada generación (CONABIO, 2019). Por el otro lado existe una marcada tendencia hacia la uniformidad de los cultivos por la introducción de nuevos genes exógenos de reducida base genética, debido a la demanda en la uniformidad, resistencia al estrés ambiental, bajos costos de producción y menor cantidad de herbicidas e insecticidas. Los organismos genéticamente modificados, definidos como cualquier organismo vivo que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso de técnicas de la biotecnología moderna

(LBOGM, 2005). Un maíz genéticamente modificado contiene uno a más paquetes transgénicos en todas sus células, que puede incluir uno o más genes foráneos de cualquier otro organismo, además de otros fragmentos de ADN que provienen de microorganismos que no intercambian material genético con el maíz de manera natural (Diaz y Chaparro-Giraldo,2012). Debido a las interacciones de los genes y sus productos, el cual pueden tener efectos inesperados, es necesario evaluar las consecuencias y los alcances de la transgénesis hacia las variedades nativas.

### **Flujo génico.**

El flujo génico es el intercambio de genes entre las poblaciones de una especie en mayor o menor medida. Basseti y Westgate (1993) comentan la existencia de flujo génico entre variedades, siempre y cuando existan menos de cinco días de diferencia entre la floración masculina y la floración femenina. Por lo que si existe gran cantidad de intercambio entre ellas significa que las poblaciones evolucionan todas juntas, de lo contrario si hay poco flujo, cada población evolucionan en forma independiente (Slatkin, 1987).

Esto es de suma importancia debido a que, si un maíz transgénico y un maíz nativo llegaran a intercambiar genes vía polen, estos eventos de cruzamiento podrían dar como resultado la presencia de transgenes en una planta, como lo ocurrido en los estudios realizados por Quist y Chapela (2002). Heerwaarden *et al.* (2012) comentan que el flujo de semillas entre los agricultores conduce a una difusión de los transgenes mucho más amplia de lo esperado por el movimiento de polen. Louette (1995) argumenta que la variedad transgénica tendrá un efecto sobre la estructura genética del material nativo en la medida

que el material transgénico llegue a ser sembrado en áreas cercanas al material nativo y si existe condiciones favorables para el flujo genético entre estos dos materiales, así como la coincidencia floral.

### **Cultivos transgénicos.**

La introducción de los cultivos transgénicos en los primeros años estaba destinada a favorecer una agricultura más limpia y que gradualmente prescindirían del uso de agroquímicos (insecticidas y herbicidas), con una finalidad de “Aumento de productividad”. Estos fueron los organismos genéticamente modificados de primera generación. En los organismos genéticamente modificados de segunda generación se encuentran los resistentes a plagas de insectos y además a herbicidas. Los transgénicos de tercera generación son aquellas que son resistentes al calor y a la sequía. Los de cuarta generación son para la producción de biocombustibles, biovacunas, y se habla de una quinta generación, en la que se incluye la biología sintética, técnicas basadas en edición del ADN (tipo CRISPR-Cas9) (Gonzalo, 2017).

### **Métodos de detección y cuantificación de OGM.**

Los métodos moleculares para rastrear eventos transgénicos deben incluir cuantificación por número de copias, usando métodos altamente sensibles, específicos y confiables, como la PCR en tiempo real (Acatzi *et al.*, 2014). El Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM) del SENASICA recomienda técnicas de análisis basadas en ADN como la PCR que permite la

amplificación selectiva de segmentos de ADN, detecta la presencia de una sola secuencia de ADN presente en una muestra.

La secuenciación de ADN es una técnica que permite descifrar las características moleculares y genéticas de un organismo, lo que permite confirmar y hacer una evaluación de forma precisa (SENASICA, 2019).

Otro método de análisis es la técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay por sus siglas en inglés) que permite detectar o medir la cantidad de una proteína de interés presente en una muestra que puede contener otras muchas proteínas diferentes. 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 colorida, que es fácil de observar. La técnica de ELISA es menos sensible que la PCR; no discrimina entre diferentes modos y modelos de expresión de diferentes productos transgénicos que expresan características proteicas similares. Por lo anterior, en la detección de OGM se tiene claro que la PCR y ELISA deben considerarse mutuamente complementarios y no excluyentes entre sí (Inocuidad Agroalimentaria, 2013).

### **Incertidumbre, riesgos y peligro de la liberación de los OGM.**

La Ley de Bioseguridad exigía el establecimiento de un régimen de protección especial para el maíz. El 6 de marzo de 2009 se publicó un decreto presidencial que derogó dicho régimen y estableció un mecanismo transitorio para la toma de decisiones a las solicitudes de siembra experimental y piloto de maíz genéticamente modificado y la eventual liberación comercial, reanudando los permisos para el cultivo a cielo abierto. Para evaluar el riesgo de incertidumbre debido al uso de esta tecnología se crearon ciertos protocolos

como la EFSA en 2006, en el que se contempla el análisis de bioseguridad de un OGM específico de los posibles efectos negativos o peligros de la liberación de un OGM al ambiente (Álvarez-Buylla y Piñeyro, 2008).

Uno de los principales riesgos e incertidumbre es: la reconstrucción recombinante que incluye el o los genes que codifican para las proteínas, además de las secuencias reguladoras de la expresión del gen a la planta receptora, ya que de él dependerá el efecto fisiológico o morfológico del transgén, un contexto ambiental en donde se usara la planta transgénica, además de un contexto agrícola/tecnológica en el país donde se realizaría la liberación y por ultimo un contexto socioeconómico de la zona donde se usara el OGM bajo estudio. Por lo que es conveniente reducir todo tipo de riesgo en todos los niveles por más insignificantes que parezcan (Ellstrand, 2003). En México es de suma importancia las repercusiones que pudieran surgir entorno al cultivo e infiltración de maíz transgénico, tal y como lo señalan Kato (2004) y Turrent *et al.* (2009), ya que con el tiempo la infiltración hacia maíces nativos será irreversible debido a que un sinnúmero de diversos transgénos estarán almacenados en los maíces nativos, convirtiéndolos en un gran almacén causándoles distintos y contantes daños a lo largo del tiempo.

### **El maíz y su importancia en México**

El maíz tuvo un papel central en el origen y la difusión de la agricultura en todas las civilizaciones indígenas de Mesoamérica; estas civilizaciones dependieron en gran medida del cultivo del maíz y los cientos de usos del grano (tortillas, tostadas, atole, tamales, totopos, pinole, pozole, etc.) y otras partes de la planta (los tallos para el jugo azucarado, tallos secos para cercas y como combustible, las hojas del tallo y de la mazorca para

envolver tamales, etc.). Todo lo anterior ilustra su importancia en las culturas antiguas y actuales de México y del resto de Latinoamérica (Sánchez, 2011). Prácticamente el maíz mexicano es la dieta de todos los mexicanos porque contiene una invaluable riqueza cultural, además los cientos de usos que se le ha dado a lo largo de todo este tiempo (Bourges, 2008). En la actualidad también se usan en las bebidas, medicina, estimulantes, materiales en la industria y en gran medida en aspectos religiosos (Rivera, 2012). La gran diversidad de formas y de tipos de maíces nativos presentes en todo México representa una gran riqueza y un gran potencial para México, por lo que se debe de cuidar y resguardar este patrimonio cultural, pues se corre el riesgo de la pérdida de su diversidad genética, dificultando el establecimiento de programas de conservación *in situ* sustentables en el mediano y largo plazo (Perales, 2009). Adicionalmente, no se podrá monitorear los cambios en la diversidad genética, dificultando en un futuro estimar la erosión genética para las razas en estudio.

### **LITERATURA CITADA.**

- Alfaro, J. Y y Segovia, S.V. (2009). Formación, Evaluación y descripción simple de maíz (Zea mays) amarillo INIA 21. Revista UDO Agrícola 9 (3): 499-508. 2009.
- Álvarez-Buylla, R. E. y Piñeyro, N. A. (2008). Riesgos y peligros de la dispersión del maíz Ciencias 92-93 octubre 2008 marzo 2009.
- Acatzi, A., A. Gálvez, J. Plasencia y M. Quirasco (2014). Assessment of DNA extraction methods for GMO analysis for grain monitoring in Mexico. Part II: Quantification by Real-Time PCR. Agrobiencia 48:35-52.
- Anderson, E. (1945). What is Zea mays? A report of progress. Chron. Bot. 9:88-92.

- Bassetti, P. y M.E. Westgate. (1993). Senescence and receptivity of maize silks. *Crop Science* 33: 275-278.
- Benz, B.F. (2006). Maize in the Americas. In: Staller, J. E., R. H. Tykot, B. Benz. (eds.) *Histories of maize: multidisciplinary approaches to the prehistory, linguistics, biogeography, domestication, and evolution of maize*. Academic Press, San Diego. 9-18 pp.
- Bourges, R.H. (2008). Los alimentos, la dieta y la alimentación. En E. Casanueva, H.M. Kaufer, A. B. Pérez Lizaur, P. Arroyo (ed.). *Nutriología Medica*, 597-662, Editorial Medica Panamericana.
- CONABIO. (2006). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Documento base sobre centros de origen y de diversidad en el caso del maíz en México. México.
- CONABIO (2019). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Disponible en <https://www.biodiversidad.gob.mx/genes/divgenetica.html>. (Consultado en mayo del 2019).
- Díaz, G., C. y Chaparro-Giraldo, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Rev.udcaactual.divulg.cient.* Bogotá. V. 15, No. 1, p. 49-61. Jane/June. 2012.
- Doebley, J. F. (1989). Isozymic evidence and the evolution of crop plants. In: *Isozymes in Plant Biology*. D. E Soltis and P. S. Soltis (eds). Dioscorides Press. Portland, OR. pp: 165-191.
- Ellstrand, N, C (2003). Going to “Great Lengths” to prevent the escape of genes that produce specialty chemicals. *Plant physiology*, 132, 1770-1774.

- FAO. (2019). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Disponible en <http://www.fao.org/3/y3557s/y3557s08.htm>. (Consultado febrero del 2019).
- FAOSTAT. (2019). Statistical Databases. Publishing Management Service, Information Division, Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO). Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. (Consultado abril del 2019).
- FIRA. (2016). Fideicomisos Instituidos en Reacción con la Agricultura. Panorama Agroalimentario. Dirección de investigación y evaluación económica y sectorial. Maíz. 2016.
- Fukunaga, K., J. Hill, Y. Vigouroux, Y. Matsuoka, J. Sánchez G., K. Liu, E.S. Buckler, y J. Doebley. (2005). Genetic diversity and population structure of teosinte. *Genetics* 169:2241-2254.
- Gonzalo., B. Z. F. (2017). Transgénicos. Grandes beneficios, ausencia de daños y mitos. Comité de biotecnología. Academia Mexicana de Ciencias. ISBN: 978-607-8379-28-6. Disponible en: [www.amc.mx/transgenicos](http://www.amc.mx/transgenicos).
- Heerwaarden, V. J., Del V. Ortega., D., Alvarez-Buylla, E.R. y Bellon, M.R. (2012) New Genes in Traditional Seed Systems: Diffusion, Detectability and Persistence of Transgenes in a Maize Metapopulation. *PLoS ONE* 7(10):e46123. doi: 10.1371/journal.pone.0046123.
- INEGI. (2017). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Disponible en <https://www.inegi.org.mx/temas/agricultura/>. (Consultado en mayo del 2019).
- Inocuidad Agroalimentaria. (2013). Centro Nacional de Referencias en Detección de Organismo Modificados (CNRDOGM) del SENASICA.

- Kato Y., T. A. (2004). Variedades Transgénicas y el Maíz Nativo en México. Agricultura, Sociedad y Desarrollo. Vol. 1 Núm. 2.
- Quist, D. y Chapela, I. H. (2001). Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, México. *Nature* 414, 541–543 2001.
- Louette, D. (1995). Intercambio de semillas entre agricultores y flujo genético entre variedades de maíz en sistemas agrícolas tradicionales. In: Flujo Genético entre el Maíz Criollo, Maíz Mejorado y Teocintle: Implicaciones para el Maíz Transgénico. J. A. Serratos, M. C. Wilcox y F. Castillo (eds.). Memoria de Foro. El Batán, Edo. de México. pp: 60-71.
- LBOGM, (2005). Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. Secretaria General. Secretaria de Servicios Parlamentarios. México, D.F. 15 de febrero de 2005.
- McClintock, B., Kato, T.A. Y. y Blumenschein, A. (1981). Chromosome Constitution of Races of Maize. Its Significance in the Interpretation of Relationships between Races and Varieties in the Americas. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- Mangelsdorf, P.C. y Reeves, R.G. (1959). The origin of corn. I. Pod corn, the ancestral form. *Bot. Mus. Leaf. Harv. Univ.* 18(7):329-355.
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M.M., Sánchez, J.J., Buckler, G., E. y Doebley, J. (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (6):6080-6084.
- Morris, M., Edmeades, G., y Pehu, E. (2006). The global need for plant capacity: the role of the public and private sectors? *HortScience* Vol. 41(1). February. 2006.
- Muñoz, A. O. (2003). Centli-Maíz. Prehistoria, historia, diversidad, potencial origen genético y geográfico. México: Colegio de postgraduados SAGARPA.

- Perales, H. R.R. (2009). Maíz riqueza de México. El colegio de la frontera del sur. Ciencias 92-93 octubre 2008 marzo 2009.
- Rincón-Sánchez, F., Ruiz-Torres, NA, Cuellar-Flores, R., y Zamora-Cancino, F. (2014). 'Jaguan', variedad criolla mejorada de maíz para las áreas temporales del sureste de Coahuila, México. Revista Fitotecnia Mexicana, 37, 403-405.
- Rivera R., D. M. (2012). Variabilidad genética del género Zea. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. Durango, Dgo. 82 p.
- SAGARPA. (2012). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. ACUERDO por el que se determinan Centros de Origen y Centros de Diversidad Genética del Maíz. Diario Oficial de la Federación. Segunda Sección. 2 de noviembre de 2012.
- SENASICA. (2019). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria Disponible en <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/tecnicas-de-analisis-28488>. (Consultado en mayo de 2019).
- Sánchez G., J. J. (2011). Diversidad del maíz y el teocintle. Informe preparado para el proyecto: “Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México”. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 98 p.
- Serratos J.A., Wilcox M.C., Castillo F. (eds.). (1995). Actas de foro: flujo de genes entre variedades autóctonas de maíz, variedades de maíz mejoradas y teosintes: consecuencias para el maíz transgénico. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias de México (INIFAP), Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y Comité Nacional de Bioseguridad Agrícola de México (CNBA).

- SIAP. (2019). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. (Consultado en mayo de 2019).
- Slatkin, M. (1987). Gene Flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 263, 787-792.
- Singleton, W.R. (1951). Inheritance of corn grass, a macromutation in maize, and its possible significance as an ancestral type. *Amer. Nat.* 85:81-86.
- Snow, A. A. 2002. Transgenic crops – Why gene flow matters. *Nature Biotechnology* 20: 542.
- Turrent, A., y J.A. Serratos. (2004). Context and background on wild and cultivated maize in Mexico. In: *Maize and biodiversity: The effects of transgenic maize in Mexico*. Secretariat of the Commission for Environmental Cooperation of North America, Montreal.
- Turrent. F., A, Serratos-Hernández, J. A, Mejía-Andrade, H, y Espinosa-Calderón, A. (2009). Propuesta de cotejo de impacto de la acumulación de transgenes en el maíz (*Zea mays* L.) nativo mexicano. *Agrociencia*, 43(3), 257-265.

**CAPÍTULO I. DIVERSIDAD MORFOLÓGICA DE VARIEDADES NATIVAS DE  
MAÍZ DE COAHUILA MÉXICO.**

**CHAPTER I. MORPHOLOGICAL DIVERSITY OF NATIVE MAIZE VARIETIES  
OF COAHUILA MEXICO.**

Alejandro Celso-Vallejo<sup>1</sup>, Leobigildo Córdova-Téllez<sup>1\*</sup>, Higinio López-Sánchez<sup>2</sup>, Víctor  
Heber Aguilar-Rincón<sup>1</sup> y Amalio Santacruz-Varela<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco.  
Montecillo, Texcoco, Edo. de México. C.P. 56230. <sup>2</sup> Colegio de Postgraduados, Campus  
Puebla. Boulevard Forjadores de Puebla Núm. 205, Santiago Momoxpan, Municipio de San  
Pedro Cholula, Puebla, México. C.P. 72760.

*\*Autor para correspondencia (lcordova@colpos.mx).*

## RESUMEN

Al norte de México existe una gran diversidad genética de maíz nativo, donde la caracterización de poblaciones nativas, en particular las de las razas de Coahuila, es deficiente, por lo que es necesario generar conocimiento sobre la situación actual de la diversidad y distribución de las razas nativas. El objetivo de esta investigación fue evaluar la diversidad genética del maíz nativo de Coahuila, México. Con 192 poblaciones colectadas en 7 polígonos se realizó una clasificación racial y considerando con los caracteres morfológicos de mazorca y grano se realizó un análisis de varianza, de componentes principales, clústeres e índices de diversidad. En la clasificación racial se identificaron 6 grupos raciales, 11 con algún grado de combinación y un híbrido. Los análisis de varianza nos indican la existencia de amplia diversidad morfológica evidenciada principalmente por peso de mazorca. Del total de poblaciones el 58 % se asoció a la raza Ratón, el 11 % a Ratón x Tuxpeño Norteño y el 10 % a Tuxpeño Norteño. Además, se identificó una reducida diversidad genética en la raza Cónico, evidenciada por la presencia de 22 % de formas intermedias. Nuestros resultados indican que existe una amplia diversidad morfológica en los maíces nativos de Coahuila, a la vez que se está presentando la pérdida o ausencia de la raza Tuxpeño y Olotillo.

**Palabras clave:** Diversidad genética, maíces nativos, caracteres morfológicos, centros de origen, ratón.

## ABSTRACT

In northern Mexico there is a great genetic diversity of native maize, where the characterization of native populations, particularly the races of Coahuila, is deficient, so it is necessary to generate knowledge about the current situation of the diversity and distribution of the native races. The objective of this research was to evaluate the genetic diversity of the native maize of Coahuila, Mexico. With 192 populations collected in 7 polygons, we carried out a racial classification and with the morphological characters of ear and grain, an analysis of variance, principal components, clusters and diversity indexes was carried out. In the racial classification we identified 8 racial groups and 10 with some degree of combination. The analysis of variance indicates the existence of a wide morphological diversity evidenced mainly by ear weight. Of the total populations, 58% were associated to the Ratón race, 11% to Ratón x Tuxpeño Norteño and 10% to Tuxpeño Norteño. In addition, we identified the loss of genetic diversity in the Cónico race, evidenced by the presence of 22% intermediate forms. Our results indicate that there is a wide morphological diversity in the native maize of Coahuila, at the same time that the loss or absence of the Tuxpeño and Olotillo races is being presented.

**Key words:** Genetic diversity, native maize, morphological characters, centers of origin, ratón.

## INTRODUCCIÓN

El maíz tuvo un papel central en el origen y la difusión de la agricultura en todas las civilizaciones indígenas de Mesoamérica, que dependieron en gran medida del cultivo de maíz y los diversos usos del grano (tortillas, atole, tamales, pinole, etc.) y otras partes de la planta (tallos secos para cercas y combustible, las hojas de la mazorca para envolver tamales, etc.) (Fernández *et al.*, 2013). México es un país mega diverso, con gran variedad de especies, considerado como centro de origen y de diversidad genética del maíz, con más de 60 razas y cientos de variedades, por lo que la caracterización de la diversidad genética del maíz es compleja, aunque actualmente se disponen de métodos moleculares que permiten detectar diferencias a nivel de secuencias de ADN (CONABIO, 2019). También se puede realizar una caracterización con base a variaciones morfológicas por herencia mendeliana que son de alta heredabilidad, lo que permite determinar el grado de similitud con base a su morfología (Sánchez *et al.*, 2000; Hernández y Alanís, 1970). Los maíces nativos representan el 88 % de la superficie de la siembra de temporal en México (SIAP, 2011). La diversidad del maíz en el estado de Coahuila, como en gran parte de la República Mexicana, está constituida de manera compleja por tipos raciales, variantes dentro de raza e intermedias entre razas desarrollados por los agricultores, que indica la importancia de este tipo de atributos en la descripción de las poblaciones de maíz (Rincón, 2010). En la descripción morfológica la variación de un sitio con un material particular depende del factor ambiental, del proceso de selección y las labores que realizan los agricultores, que se manifiesta en la expresión fenotípica del material seleccionado (Reyes-Méndez *et al.*, 2017). Por lo tanto, los caracteres distintivos particulares pueden ser utilizados para la

comparación relativa entre tipos de maíces procedentes de otros sitios con materiales específicos, siempre y cuando estos sean distintos.

En el primer trabajo en donde se propuso la clasificación de la diversidad genética del maíz en México se describió 25 razas de maíz con algunas sub razas (Wellhausen *et al.*, 1952). Hernández y Alanís (1970) recolectaron y describieron cinco razas de maíz del noroeste de México: azul, apachito, bofo, gordo y tablilla de ocho. Ortega (1985) hizo la descripción de cinco razas de maíz poco investigadas: ratón, onaveño, tuxpeño norteño, cristalino de Chihuahua y palomero de Chihuahua. Este y otros estudios permitieron establecer relaciones con otras razas de maíz (Sánchez y Goodman, 1992). Sánchez *et al.* (2000) y Mera (2009) realizaron colectas de poblaciones nativas, además han participado diversas instituciones e investigadores, a tal grado que actualmente se reconocen 59 razas de maíz descritas (CONABIO, 2012). En el sur de Coahuila, con el apoyo del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI, 2003), se realizó un trabajo de exploración y de recolección de maíces nativos, donde se logró identificar a seis grupos raciales: Ratón, Tuxpeño norteño, Cónico norteño, Tuxpeño, Olotillo y Elotes cónicos. Rincón *et al.* (2010) colectaron 90 accesiones y agregaron una raza más a las seis identificadas por el SINAREFI. De acuerdo a las fechas de colecta y a la cantidad colectada, es conveniente precisar el nivel de diversidad genética de las poblaciones nativas de Coahuila. El objetivo de la presente investigación fue precisar el nivel de diversidad morfológica y verificar si existe o no pérdida de las razas existentes en poblaciones de maíz nativo de Coahuila.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ámbito geográfico

El estudio fue realizado dentro de los siete polígonos del estado de Coahuila, declarados como Centros de Origen y Diversidad Genética del Maíz en México, publicado en el Diario Oficial de la Federación de 2012 (Figura 1.1).

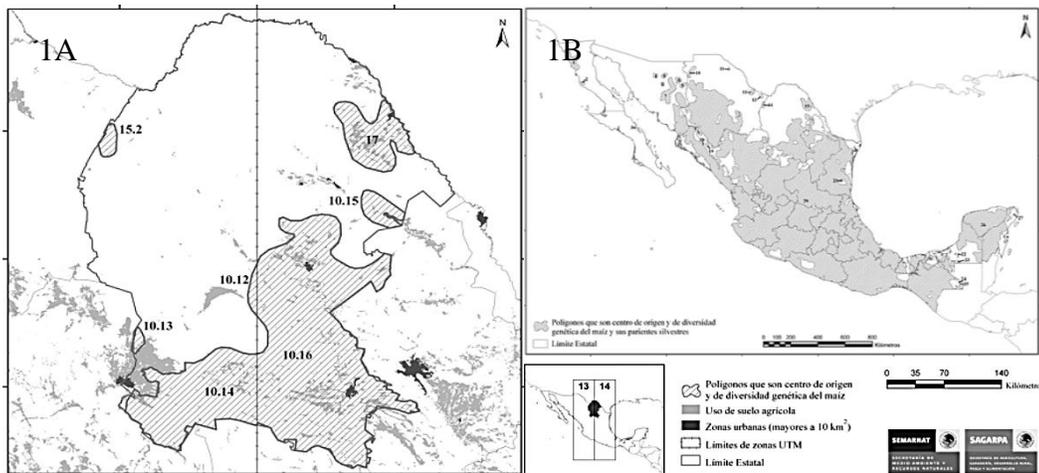


Figura 1.1 A) Centros de origen y diversidad genética de maíz en el estado de Coahuila. B) Polígonos declarados como centros de origen y diversidad genética del maíz y sus parientes silvestres en México.

### Localidades a muestrear

Con el programa ArcMap de ArcGis 10.3 se elaboraron los polígonos considerados Centros de Origen y Diversidad Genética de Maíces Nativos y Parientes Silvestres en el estado de Coahuila, partiendo de los puntos que delimitan dichas áreas publicados en el Diario Oficial de la Federación en noviembre de 2012. A los polígonos generados se superpusieron las capas de división estatal, municipal, localidades urbanas, carreteras y medios de comunicación, así como distritos de riego y localidades rurales en formato SHP, las cuales se descargaron del INEGI (INEGI, 2014).

## Método de muestreo

Considerando la extensión de las áreas declaradas como centros de origen y diversidad genética, así como el nivel de riqueza genética inferido por la intensidad de colectas registrada de proyectos nacionales ya ejecutados, se realizó un muestro sistemático por proporciones. Para determinar el número de localidades a visitar se contabilizó y sumó el número de localidades dentro de los 7 polígonos. Al total se le aplicó el muestreo sistemático propuesto por Murray (1988), con una confiabilidad del 95 % y un error de muestreo del 10 %, mediante la ecuación:

$$n = \frac{NS_{sist}^2}{\frac{B_{\mu}^2}{t^2}(N-1) + S_{sist}^2}$$

Dónde:

n: Tamaño de muestra. Beneficiarios de PROCAMPO 2012 ciclo PV (SAGARPA, 2016).

N: Tamaño de la población (2560).

t: Valor de la distribución “ $t_{\alpha/2, N-1}$ ” para una confiabilidad (1 -  $\alpha$  = 95 %)

$$t_{\alpha/2, N-1} = t_{0.05/2, 2560-1} = 1.96$$

$S_{sist}^2$ : Varianza de la población (Varianza Máxima = 0.25)

$B_{\mu}$ : Error de muestreo = 0.10.

Con este procedimiento de muestreo se considera máxima varianza con 95 % de confianza y un error de 10 %, tomado como base lo propuesto por Manzano y Braña (2003) y Martínez y Martínez (2006), que es la situación más desfavorable en cuanto a dispersión de la distribución, asegurando una buena estimación en los tamaños de muestra; esto ocurre cuando la probabilidad de éxito (p) y fracaso (q = 1-p) de una distribución binomial es 0.25 (p = 0.5), asemejándose a una distribución normal.

### **Colecta de semilla**

La colecta de semilla se realizó solicitando a cada productor de maíz que proporcionara una muestra de su material, realizando selección de la misma manera como si fuera a ser semilla para sembrar en un ciclo posterior. Cada colecta tenía como mínimo 5 mazorcas para la identificación racial y toma de fotografía. Las colectas se documentaron con el formato de los datos pasaporte para muestras de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, así como los datos de georreferenciación (GPS) para cada una de ellas.

### **Identificación racial**

La identificación racial se realizó de manera visual por un experto clasificador de razas con base a las características de la mazorca más afines a la raza, en cinco mazorcas representativas, en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México. Posteriormente se realizó la descripción morfológica de las mazorcas y grano, en un tamaño de muestra de 5 mazorcas representativas de cada colecta, para determinar las características cualitativas y cuantitativas.

### **Características cuantitativas**

Los caracteres morfológicos registrados fueron: peso (PM), longitud (LM), diámetro (DM) y número de hileras (NH). En 10 granos, tomados al azar, se midieron en cm: longitud (L10G), ancho (A10G), grosor (G10G). Adicionalmente se obtuvo por triplicado el peso de 100 semillas.

### **Clasificación y distribución**

A las muestras colectadas se le dio una asignación preliminar a nivel de raza. Con los datos de las coordenadas geográficas de cada población se elaboró un mapa de distribución de los

maíces nativos (ArcMap de ArcGis 10.3), utilizando mapas disponibles en el Sistema de Información del INEGI

(INEGI, 2014) y de la CONABIO (CONABIO, 2016), donde se incluyó la clasificación a nivel de raza y las variantes intermedias entre los grupos raciales.

### **Descripción morfológica**

El análisis estadístico de los datos de mazorca y grano fue realizado mediante un análisis de varianza y una comparación de medias (Tukey con un  $\alpha=0.05$ ), mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute, 2004).

### **Análisis de dispersión y clasificación**

El análisis de agrupamiento y distribución de la diversidad de las poblaciones de maíz consistió en el análisis de componentes principales (ACP) y análisis de conglomerados, basados en las medias de colectas a través de los caracteres morfológicos, para las variables que se consideraron como apropiadas para la valoración de la diversidad genética. El análisis de componentes principales fue realizado mediante el procedimiento PRINCOMP del paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute, 2004). También se realizó el análisis de conglomerados mediante el método de agrupamiento por pares usando promedios aritméticos (UPGMA).

### **Cuantificación de índices de diversidad**

Con base en datos de CONABIO de colectas de maíz realizados desde 1943 hasta el 2008 y la colecta realizada para la presente investigación estimaron parámetros mediante una comparación de la diversidad genética existente en los distintos periodos. Para ello se tomó la diversidad alfa y gamma.

La diversidad alfa mide la riqueza de especies de una comunidad en particular a la que se le considera homogénea, que está dada por riqueza específica ( $S$ ), que es igual al número total de especies obtenido por un censo de la comunidad. En esta clasificación se tomaron en cuenta los diferentes índices, como:

a) Índice de diversidad de Margalef:

$$D_{Mg} = \frac{s - 1}{1nN}$$

Dónde:  $S$ : número de especies,  $N$ : número total de individuos. Supone que hay una relación funcional entre el número de especies y el número total de individuos  $S=k_N$ , donde  $k$  es constante (Magurran, 1988). Si esto no se mantiene, entonces el índice varía con el tamaño de muestra de forma desconocida. Usando  $S-1$ , en lugar de  $S$ , da  $DMg = 0$  cuando hay una sola especie.

b) Índice de diversidad de Menhinick:

$$D_{Mn} = \frac{S}{\sqrt{N}}$$

Se basa en la relación entre el número de especies y el número total de individuos observados, que aumenta al aumentar el tamaño de la muestra.

La diversidad gamma, definida (Whittaker, 1972) como la riqueza en especies de un grupo de hábitats, que resulta como consecuencia de la diversidad alfa de las comunidades individuales y del grado de diferenciación entre ellas (diversidad beta).

a) Cálculo basado en la riqueza de especies:

$$Beta = \sum_j q_j (s_T - s_j)$$

Dónde:  $q_j$ : peso proporcional de la comunidad  $j$ , basado en su área o cualquier otra medida de importancia relativa.  $T$ : Número total de especies registradas en el conjunto de comunidades.  $S$ : Número de especies registradas en la comunidad  $j$ .

b) Cálculo de la diversidad beta basado en el índice de Shannon:

$$H_{1_{be} + a} = - \sum_i P_i \ln P_i - \sum_j q_j H_j$$

$$P_1 = \sum_j q_j P_{ij}$$

Dónde:

Representa la frecuencia promedio de la especie  $i$  en el conjunto de comunidades, ponderada en función de la importancia de las comunidades ( $q_j$ ). La segunda parte de la fórmula utiliza el índice de Shannon calculado para cada comunidad, y el valor de importancia de las comunidades.

c) Cálculo basado en el índice de Simpson ( $\lambda$ ).

Éste refleja el grado de dominancia en una comunidad; la diversidad de la misma puede calcularse como  $D = 1 / \lambda$ . En este caso, la diversidad beta se calcula como:

$$Beta = \sum_j q_j \lambda_j - \sum_i P_i^2$$

Los datos obtenidos para cada uno de los caracteres fueron organizados a fin de tener la base de datos que permitan hacer las comparaciones con las características de los grupos raciales definidos en México.

## RESULTADOS

Se identificaron 6 grupos raciales individuales, 11 grupos raciales con un grado de combinación y un híbrido (El Cuadro 1.1), con mayor proporción hacia la raza ratón (58 %), seguida de la raza Ratón x Tuxpeño Norteño (21 %). Los resultados indican un mayor porcentaje de la raza Ratón con 111/192 poblaciones. Existe una amplia distribución de la raza Ratón en 6 de los 7 polígonos (Figura 1.2).

Cuadro 1.1 Clasificación a nivel raza de las poblaciones de maíz colectadas en Coahuila, 2017.

Clasificación a nivel racial, 2017		
Raza	#	%
Ratón	111	58
Ratón x Tuxpeño Norteño	21	11
Tuxpeño Norteño	20	10
Cónico Norteño	15	8
Cónico Norteño x Ratón	4	2
Ratón x Cónico Norteño	4	2
Elotes Occidentales	2	1
Híbrido	2	1
Ratón mezcla mejorado	2	1
Tuxpeño Norteño x Ratón	2	1
Celaya x Tuxpeño Norteño	1	1
ND*	1	1
Celaya	1	1
Celaya x Ratón	1	1
Elotes Cónicos	1	1
Elotes Cónicos x Ratón	1	1
Mezcla de híbrido x Tuxpeño norteño	1	1
Ratón x Segregante híbrido	1	1
Ratón x Segregante mejorado	1	1
Total	192	100

\*ND= No identificado. El símbolo “x” entre grupos raciales indica algún grado de combinación o forma intermedia entre los dos grupos raciales.

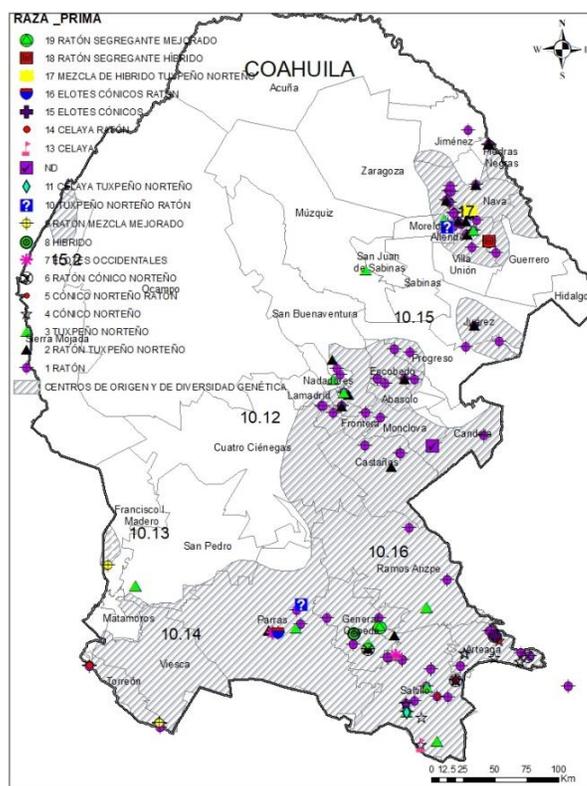


Figura 1.2 Distribución geográfica de las razas de maíz nativas colectadas en Coahuila, 2017.

Los cuatro caracteres de mazorca resultaron altamente significativos y para los caracteres de grano, tres variables fueron estadísticamente significativas ( $P \leq 0.01$ ), excepto para el grosor del grano (Cuadro 1.2). Los resultados indican que las variables entre poblaciones

dentro del grupo pueden ser diferenciadas a través de los caracteres morfológicos de mazorca y de grano.

Cuadro 1.2 Analisis de varianza de los caracteres de mazorca y grano en poblaciones de miz nativas de Coahuila, 2017

Variabes	*SC	*CM	F-Valor		Pr > F
Peso de mazorca (g)	208377.8	11576.5	11.5	**	<.0001
Longitud de mazorca (cm)	402.7	22.4	8.1	**	<.0001
Diámetro de mazorca (cm)	14.6	0.8	3.9	**	<.0001
Número de hileras	110.1	6.1	3.4	**	<.0001
Longitud de grano (cm)	0.9	0.0	3.4	**	<.0001
Ancho de grano (cm)	0.2	0.0	2.0	*	0.0123
Grosor de grano (cm)	1.3	0.1	1.0	NS	0.523
Peso de 100 granos (g)	1960.9	108.9	6.0	**	<.0001

\*Suma de cuadrados, \*Cuadrados medios, \*\* Altamente significativo,

\*Significativo, NS: No significativo.

Para los caracteres de mazorca se encontraron diferencias estadísticamente significativas en PM y NH, en los caracteres morfológicos del grano fue en LG y P100G (Cuadro 1.3). Los resultados indican una amplia variación entre razas. Por ejemplo en PM hay una gran diferencia significativa de la raza Tuxpeño Norteño sobre las demás razas; de igual forma, para el carácter de grano sobresale la raza Elotes Cónicos.

Cuadro 1.3 Comparación de medias de Tukey para las características morfológicas en mazorca y grano.

Raza	Caracteres de mazorca				Caracteres de grano			
	PM	LM	DM	NH	LG	AG	GG	P100G
Tuxpeño Norteño	203.6 a	17.2 b	5.0 a	15 b	1.2 b	0.9 a	0.5 a	31.3 b
Celaya	174.3 b	17.2 b	4.4 a	14 b	1.2 b	0.9 a	0.4 a	29.3 b
Ratón-Tuxpeño Norteño	158.1 b	15.4 b	4.7 a	14 b	1.2 b	0.9 a	0.4 a	27.6 b
Tuxpeño-Norteño-Ratón	150.8 b	19.6 a	4.4 a	15 b	1.2 b	0.9 a	0.5 a	34.3 b
Ratón-Cónico Norteño	142.8 b	13.8 b	4.4 a	14 b	0.9 b	0.7 a	0.7 a	28.1 b
Cónico Norteño	140.7 b	14.5 b	4.4 a	14 b	1.2 b	0.8 a	0.7 a	28.6 b
Celaya-Tuxpeño Norteño	137.4 b	14.2 b	4.3 a	14 b	1.2 b	0.9 a	0.4 a	23.9 b
Elotes Occidentales	134.5 b	15.5 b	4.1 a	11 b	1.2 b	1.0 a	0.5 a	23.9 a
Celaya-Ratón	131.1 b	17.0 b	4.2 a	16 b	0.9 b	0.7 a	0.6 a	18.7 b
Cónico Norteño-Ratón	128.9 b	12.8 b	4.5 a	14 b	1.2 b	0.8 a	0.5 a	28.2 b
Elotes Cónicos-Ratón	126.0 b	15.0 b	4.0 a	14 b	1.1 b	0.7 a	0.5 a	28.9 b
Elotes Cónicos	116.8 b	14.0 b	4.2 a	13 b	1.4 a	0.8 a	0.4 a	30.3 b
Híbrido	115.8 b	14.5 b	4.1 a	14 b	0.9 b	0.8 a	0.5 a	23.7 b
Mezcla de Híbrido-Tuxpeño Norteño	111.3 b	18.0 b	4.5 a	14 b	1.2 b	0.9 a	0.4 a	28.4 b
Ratón	105.8 b	13.2 b	4.2 a	13 b	1.1 b	0.8 a	0.4 a	23.5 b
Ratón-Segregante de Híbrido	92.3 b	11.4 b	4.4 a	17 a	1.2 b	0.8 a	0.5 a	23.3 b
Ratón Mezcla con mejorado	69.6 b	13.8 b	3.9 a	17 a	0.9 b	0.7 a	0.4 a	19.1 b
Ratón-Segregante de mejorado	61.8 b	11.7 b	3.4 a	13 b	1.0 b	0.7 a	0.5 a	18.4 b
*ND	37.1 c	12.7 b	3.8 a	13 b	0.8 b	0.7 a	0.3 a	16.9 b

\*ND: No Identificado. Medias con la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes ( $p < 0.001$ ). PM: Peso de mazorca (g); LM: Longitud de mazorca (cm); DM: Diámetro de mazorca (cm); NH: Número de hileras; LG: Longitud de grano (cm); AG: Ancho de grano (cm); GG: Grosor de grano (cm) y P100G: Peso de 100 granos (g).

Considerando los primeros seis componentes los coeficientes de cada componente (vectores característicos) son proporcionales a los coeficientes de correlación entre las variables originales y los nuevos componentes (Cuadro 1.4). Por lo tanto, los coeficientes positivos y negativos indican el nivel de asociación entre las variables originales y los componentes principales. Estos resultados indican que la mayor variación se concentra en el primer

componente principal (40.80 %), el cual está determinado por el PM. El componente 2 da como resultado una variación del 17.64 % y está determinado por el NH y AG. El componente 3 con 12.88 % lo determina el GG. El componente 4, con 9.53 %, está determinado por la LG. Estos resultados indican que las variables de mazorca fueron más discriminatorias que las variables de grano, indicando que en estas características también existe una amplia variabilidad.

Cuadro 1.4 Análisis de los componentes principales para el estudio de la diversidad entre y dentro de grupos raciales de maíz de Coahuila, 2017.

Característica	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6
Peso de mazorca (g)	0.51*	-0.15	0.01	-0.16	0.07	-0.12
Longitud de mazorca (cm)	0.43	0.02	-0.04	-0.33	0.59*	0.08
Diámetro de mazorca (cm)	0.39	-0.14	-0.12	-0.05	-0.74*	0.34
Número de hileras	0.22	-0.69*	-0.04	0.07	0.16	0.27
Longitud de grano (cm)	0.31	0.10	0.14	0.91*	0.15	0.03
Ancho de grano (cm)	0.24	0.65*	-0.16	-0.08	0.05	0.52
Grosor de grano (cm)	0.03	0.03	0.97*	-0.16	-0.06	0.19
Peso de 100 granos (g)	0.45	0.20	0.08	-0.07	-0.21	-0.69*
Valor característico	3.26	1.41	1.03	0.76	0.67	0.41
Porcentaje de la variancia explicada (%)	40.80	17.64	12.88	9.53	8.42	5.08

CP1: Componente principal 1; CP2: Componente principal 2; CP3: Componente principal 3; CP4: Componente principal 4; CP5: Componente principal 5; CP6: Componente principal 6; \*: Coeficiente del vector de importancia que determina las características del CP.

Considerando los primeros dos componentes principales se observan 6 polígonos a nivel raza, de estos el complejo Ratón se encuentra ampliamente distribuido en un polígono del extremo izquierdo (Figura 1.3-A). Considerando la dispersión de las 181 poblaciones de maíz pertenecientes a seis grupos raciales, se observa que la variabilidad es amplia aun dentro de razas por grupos (Figura 2B).

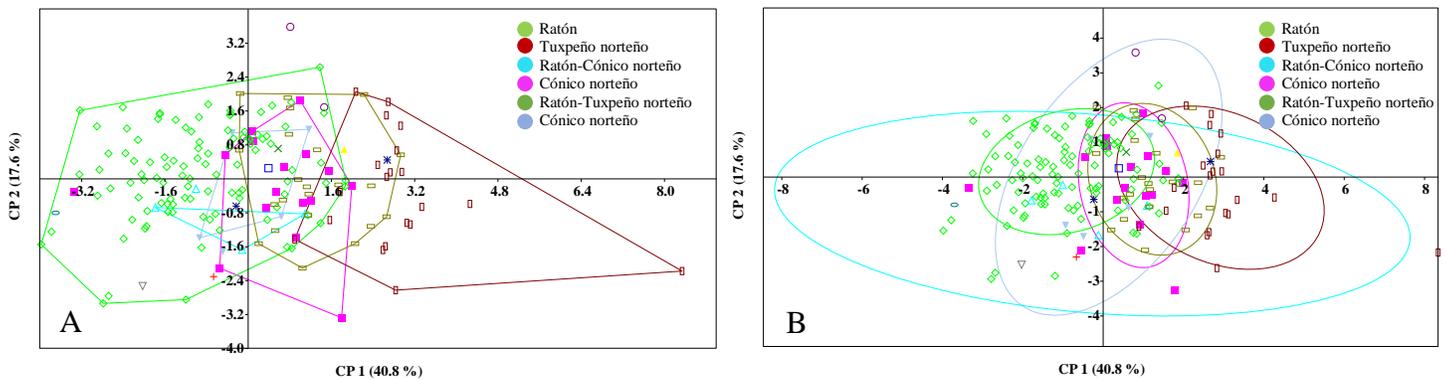


Figura 1.3 Dispersión de las 181 poblaciones de maíz nativo de Coahuila con base en los dos primeros componentes principales. A) Dispersión de las poblaciones por polígono. B) Dispersión de individuos por raza.

En el agrupamiento por conglomerados las poblaciones están agrupadas con base a las distancias medias a partir de las ocho variables (Figura 1.4). De acuerdo con el nivel de significancia es posible formar tres grupos que contiene las 181 poblaciones. Estos resultados permitieron ver grupos formados por poblaciones a nivel raza. Por ejemplo, en el primer grupo se concentra la mayor cantidad de poblaciones de la raza Tuxpeño Norteño, en el segundo grupo están las de la raza Ratón y sus combinaciones y en el tercero están distribuidos en subgrupos la raza Ratón Tuxpeño, Elotes Cónicos, Cónico Norteño y Elotes Occidentales. Cabe resaltar que la raza ratón es ampliamente distribuida en los tres grupos.



Considerando los parámetros de diversidad, la riqueza específica no se mantuvo, por ejemplo, en el primer periodo de colecta de maíz en Coahuila (1943) se tenían 6 razas, aunque en 2006-2008 aumentó dos razas más, actualmente en las colectas 2017 se encontraron 6 grupos raciales individuales y 11 grupos raciales con un grado de combinación. (Figura 1.5). Estos resultados confirman un aumento y amplia diversidad genética presentes en el estado de Coahuila. El índice de riqueza específica de Menhinick indica un aumento en relación al número de razas y el número de individuos. Con base en los índices de diversidad por Margalef se observa un aumento considerable, lo cual supone que hay una relación entre el número de razas y el número de individuos. En cuanto a la riqueza de especies, con base en los índices de diversidad de Simpson, se presenta un grado de dominancia menor de individuos que ayudó en un aumento de las razas. De acuerdo con el índice de Shannon la frecuencia promedio de las razas para el año 2107 fue ligeramente mayor.

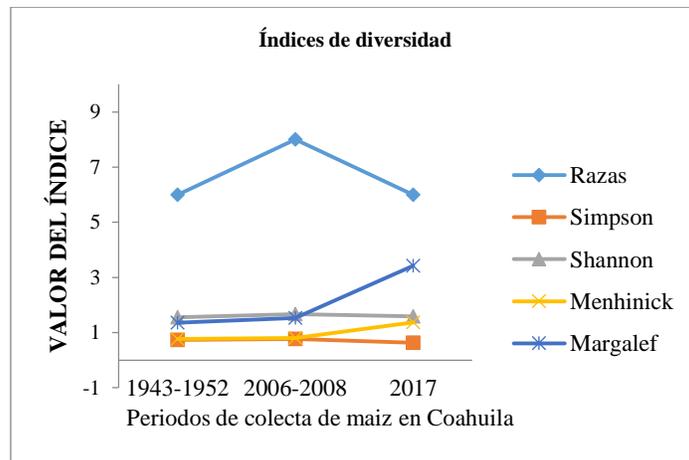


Figura 1.5 Índices de diversidad en los periodos 1943-1952, 2006-2008 y 2017 dentro de los 7 polígonos denominados como centros de origen y de diversidad genética del maíz en Coahuila.

## DISCUSIÓN

1) En Coahuila, México existe una amplia variación morfológica.

De acuerdo con investigaciones previas (SINAREFI, 2003; Rincón *et al*, 2010) el estado de Coahuila no constituye una región importante en la concentración de la diversidad genética de maíz, ya que solo se ha reportado la presencia de algunas colectas representativas de las razas Ratón, Tuxpeño y Tuxpeño norteño. Nuestros resultados no concuerdan con las investigaciones realizadas, pues existe una amplia diversidad genética de maíces nativos en el estado de Coahuila. La diversidad racial mayormente encontrada fue la raza Ratón 111/192 (58 %), seguida de Ratón x Tuxpeño Norteño (11 %), Tuxpeño Norteño (10 %) y Cónico Norteño (8 %). Adicionalmente, dicha variabilidad se sustenta en que se caracterizó un total 6 grupos raciales individuales y 11 grupos raciales con un grado de combinación ampliamente distribuida en Coahuila en los centros de origen y de diversidad genética. Tal diversidad se debe a que los agricultores locales han conservado y han mejorado sus materiales nativos, apoyados por las condiciones orográficas y la gran variación de microclimas presentes en Coahuila (Nájera, 2010). El SINAREFI en 2003 logró identificar seis grupos raciales y Rincón *et al*. (2010) identificaron una raza más (raza Celaya) además de varios grupos raciales; ambos concuerdan que las condiciones diversas de clima y precipitación determinan una gran variación de ambientes agroecológicos, y por consiguiente la potencial fuente de variación genética en maíz (Sierra *et al*, 2014). Rincón y colaboradores (2010) reportaron un mayor porcentaje encontrado en la raza Ratón (26.7 %), Cónico Norteño (21.1 %) y Tuxpeño Norteño (20 %), en una población mucho menor (90 accesiones). Wellhausen (1952) señala que las razas Ratón, Tuxpeño y Tuxpeño Norteño son originarias de Coahuila. El maíz nativo adaptado a las condiciones agroecológicas

de su región comúnmente son poblaciones heterogéneas, homo-heterocigotas, desarrolladas y conservadas por los agricultores (Herrera *et al.*, 2000; Munguía-Aldama *et al.*, 2015 y Sánchez *et al.*, 2000). El maíz nativo posee ciertos atributos como la tolerancia al estrés hídrico, resistencia a plagas y a enfermedades y además poseen la capacidad para amortiguar las diferentes condiciones ambientales (Rincón-Sánchez *et al.*, 2014); aunque estas poblaciones son de baja productividad (Aguirre *et al.*, 2011). El estudio para evaluar la diversidad de las razas considera también el evaluar los efectos ambientales (interacción genotipo-ambiente). Para ello el material genético colectado se debe evaluar en al menos dos ambientes diferentes. En esta investigación se evaluaron caracteres morfológicos de mazorca y grano en poblaciones colectadas directamente en la región de origen, sin llegar a evaluarlas en ambientes diferentes, por lo que en una futura investigación es necesario establecer el material experimental en diferentes ambientes y evaluar el efecto del ambiente en la expresión de la diversidad morfológica de cada una de las razas.

2) El maíz nativo de la raza Tuxpeño, Olotillo y Cónico están disminuyendo o están ausentes.

Respecto a la diversidad genética de la región, Wellhausen *et al.* (1952) señalan que las razas Ratón, Tuxpeño y Tuxpeño Norteño son poblaciones originarias de Coahuila, y los resultados más actuales (Rincón *et al.*, 2010) indican que la diversidad en Coahuila se encuentra representada por siete grupos raciales: Celaya, Cónico Norteño, Elotes Cónicos, Olotillo, Ratón, Tuxpeño y Tuxpeño Norteño. Nuestros resultados indican que de las poblaciones originarias reportadas anteriormente en la región ya solo se encuentran las razas Ratón, Tuxpeño Norteño, Cónico Norteño, Celaya y Elotes Cónicos. Por lo que la ausencia de la raza Tuxpeño y Olotillo

sugiere que han desaparecido o que están disminuyendo. En otros estudios, González *et al.* (2013) evidenciaron una erosión genética en razas nativas como Jala y Tehua, así mismo el complejo genético Zapalote que puede llegar a estar en riesgo por su limitada distribución geográfica. En nuestra investigación encontramos un 21 % (191 accesiones) de formas intermedias, cantidad menor al 23.5 % reportado por Rincón *et al.* (2010) con una población mucho menor (90).

Por otra parte, el grupo amplio de poblaciones de formas intermedias como Celaya x Tuxpeño Norteño, Elotes Cónicos x Ratón y Celaya x Ratón sugieren la existencia de un proceso de diferenciación morfológica o de variantes raciales no reportadas previamente (Sánchez *et al.*, 2017).

Aguirre *et al.* (1998) y Flores-Pérez *et al.* (2015) argumentan que los pocos agricultores que cultivan maíz mantienen un continuo conjunto de poblaciones de maíz, y estas poblaciones se distribuyen de manera más uniforme que en otros entornos, por lo que su destino es incierto en el mediano y largo plazo, siendo necesario realizar estudios de seguimiento a través del tiempo para estar en posibilidades de diseñar estrategias para manejar y asegurar su presencia.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a las variables evaluadas en existe una amplia diversidad morfológica en los maíces nativos del Estado de Coahuila; no obstante, la raza Cónico está desapareciendo pues en este estudio no se encontraron poblaciones.

## **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece a SAGARPA-COFUPRO, por el financiamiento para el desarrollo de este proyecto. Al Dr. Gilberto Esquivel, por realizar la caracterización varietal. A los trabajadores del Colegio de postgraduados, por apoyarme en la toma de datos.

## **LITERATURA CITADA**

- Aguirre G., J. A., M. R. Bellon and M. Smale. (1998). A Regional Analysis of Maize Biological Diversity in Southeastern Guanajuato, Mexico. CIMMYT Economics Working Paper 98-06. México, D.F. CIMMYT. 17 p.
- Aguirre M. V. J., F. Rincón S., R. Ramírez S., O. G. Colón A. y M. G. Razo M. (2011) Modelo para la Conservación de Maíces Criollos en el sureste de Coahuila, México. Vicente Javier Aguirre Moreno, Saltillo Coahuila, México. 61 p.
- CONABIO. (2012). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad /Proyecto Global de Maíces Nativos (2012).  
<https://www.biodiversidad.gob.mx/genes/maicesInfGest.html>.
- CONABIO. (2016). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Disponible en línea en <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>.
- CONABIO. (2019). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Disponible en línea en <https://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/maices/razas2012.html>.
- Fernández, S. R., Morales, C. L. y Gálvez, M. A. (2013). Importancia de los maíces nativos en México en la dieta Nacional una revisión indispensable. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 36 Supl. 3-A: 275 - 283, 2013.

- Flores-Pérez, L., & López, P., & Gil-Muñoz, A., & Santacruz-Varela, A., & Chávez-Servia, J. (2015). Variación intra-racial de maíces nativos del altiplano de Puebla, México. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 47 (1), 1-17.
- González C., M. E., Palacios R., N., Espinoza B, A, y Bedoya S., C. A. (2013). Diversidad genética en maíces nativos mexicanos tropicales. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(Supl. 3-a), 239-338.
- Herrera C., B., & Castillo G., F., & Sánchez G., J., & Ortega P., R., & Goodman, M. (2000). Caracteres morfológicos para valorar la diversidad entre poblaciones de maíz en una región: caso la Raza Chalqueño. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 23 (2), 335-353.
- Hernández X., E. y G. Alanís F. (1970). Estudio morfológico de cinco nuevas razas de maíz de la Sierra Madre Occidental de México: Implicaciones filogenéticas y fitogeográficas. *Agrociencia* 1:3-30.
- Herrera C., B. E., A. Macias L., R. Diaz R., M. Valadez R. y A. Delgado A. (2002). Uso de semilla criolla y características de mazorca para la selección de semilla de maíz en México. *Rev. Fitotec. Mex.* 25: 17-23.
- INEGI. (2014). Instituto Nacional de Estadística y Geografía 2014. Disponible en <http://www.beta.inegi.org.mx/app/mapas/>.
- Magurran, A. E. (1988). *Ecological diversity and its measurement*. Princeton, NJ: Princeton University Press, New Jersey, 179 pp.
- Manzano, V., y Braña, T. (2003). Análisis de datos y técnicas de muestreo. En Levy, J.P., y Varela, J. (Dir.): *Análisis multivariante para las Ciencias Sociales* (pp. 91-143), Madrid: Pearson Educación.

- Martínez, J.A., y Martínez, L. (2006). El Factor de Imprecisión sobre la Escala de Medida (FIEM) en la estimación de medias en un muestreo aleatorio simple. *Investigación y Márketing*, 92, 66-70.
- Mera O., L. M. (2009). Diversificación y distribución reciente del maíz en México. In: T. A. Kato Y., C. Mapes S., L. M. Mera O., J. A. Serratos H. y R. A. Bye B. (eds.). *Origen y Diversificación del Maíz: Una Revisión Analítica*. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. pp: 69-82.
- Munguía-Aldama, J., & Sánchez-Plata, F., & Vizcarra-Bordi, I., & Rivas-Guevara, M. (2015). Estrategias para la producción de maíz frente a los impactos del cambio climático. *Revista de Ciencias Sociales (Ve)*, XXI (4), 538-547.
- Murray S. (1988) *Estadística*. 2a. edición. Editorial McGraw Hill. Madrid, España. 372 p.
- Nájera., C. L. A. (2010). Tesis de maestría. Estudio de la diversidad genética de lo maíces de Coahuila, México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila.
- Ortega P., R. (1985). Descripción de algunas razas mexicanas de maíz poco estudiadas. In: *Variedades y razas mexicanas de maíz y su evaluación en cruzamientos con líneas de clima templado como material de partida para fitomejoramiento*. Traducción al español por el autor. Tesis de grado Ph. D. Leningrado, URSS.
- Reyes-Méndez, C. A., Cantú-Almaguer, M. A., Gill-Langarica, H. R., García-Olivares, J. G., y Mayek, N. P. (2017). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.8 Núm.3 01 de abril - 15 de mayo, 2017 p. 571-582.

- Rincón S., F., F. Castillo G. y N. A. Ruiz T. (2010). Diversidad y Distribución de los Maíces Nativos en Coahuila, México. SOMEFI. Chapingo, Méx.
- Rincón-Sánchez, F., Ruiz-Torres, NA, Cuellar-Flores, R., y Zamora-Cancino, F. (2014). 'Jaguan', variedad criolla mejorada de maíz para las áreas temporales del sureste de Coahuila, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37, 403-405.
- Sánchez, J; and Goodman, M; (1992). Relationships among the mexican races of maíz. *Econ. Bot.* 46:72-85.
- Sanchez G., J. J., M. M. Goodman and C. W. Stuber (2000). Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of México. *Econ. Bot.* 54:43-59.
- Sánchez, J., Espinosa-Paz, N., Cadena-Iñiguez, P. (2017). Caracterización morfológica de poblaciones de maíz nativo (*Zea mays* L.) en Chiapas, México, *Agroproductividad*. 10. 26-33.
- SAS. (2004). SAS Institute 2004. SAS/STAT 9.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. USA. 5121 p.
- SIAP. (2011). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de la producción agrícola por cultivo. Disponible en:  
[http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=215](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=215).
- Sierra, M. M., Mesa, P. A. Barrón, F. S., Palafox C. A. y Meneses, M. I. (2014). Diversidad morfológica en maíces nativos del estado de Tabasco, México. *Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan* 2(3): 284-288. ISSN: 2007-6940.
- Wellhausen, J; Roberts, M; Hernández, E. (1952). Races of maíz in México their origin characteristics and distribution. The Bussev Institution of Harvard Univesity. USA. p. 13-44.

Whittaker, R. H. (1972). Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, 21(2/3): 213-251.

**CAPÍTULO II. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TRANSGENES EN MAICES NATIVOS DE COAHUILA.**

**CHAPTER II. DETECTION AND QUANTIFICATION OF TRANSGENES IN NATIVE MAIZE OF COAHUILA**

Alejandro Celso-Vallejo<sup>1</sup>, Leobigildo Córdova-Téllez<sup>1\*</sup>, Higinio López-Sánchez<sup>2</sup>, Víctor Heber Aguilar-Rincón<sup>1</sup> y Amalio Santacruz-Varela<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Edo. de México, México. C.P. 56230. <sup>2</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. Boulevard Forjadores de Puebla Núm. 205, Santiago Momoxpan, Municipio de San Pedro Cholula, Puebla, México. C.P. 72760.

*\*Autor para correspondencia (lcordova@colpos.mx).*

## RESUMEN

El Estado de Coahuila presenta áreas de temporal en las que también se cultiva maíz nativo. En otras regiones de México se ha detectado la presencia de ADN transgénico en variedades nativas. A la fecha no se ha realizado investigación que nos permita saber si en la diversidad genética de maíz nativo en Coahuila existe infiltración de transgénos y en qué cantidad. Esta investigación tuvo como objetivo establecer una línea base de presencia o no de transgénos en variedades nativas de maíz de Coahuila. En el año 2017 se colectaron 192 muestras que fueron analizadas a nivel de ADN por PCR tiempo real utilizando sondas TaqMan<sup>®</sup> para detectar la presencia del promotor 35S, así como la secuencia del terminador TNOS, ambos utilizadas en la gran mayoría de los transgénicos comerciales. Los resultados indicaron la presencia de secuencias transgénicas en 11 (5.72 %) de las 192 muestras analizadas, en niveles que variaron de 0.06 a 8.552 % de ADN transgénico, registrándose los niveles más elevados en las colectas de maíz de los municipios de Parras de la Fuente, Viesca y Ejido Tío Pio. De acuerdo a lo encontrado en otras regiones, aunque la presencia transgénica interpoblacional fue baja, la cantidad de transgenes intrapoblacional fue alta.

**Palabras clave:** Maíz, diversidad genética, variedades nativas, transgénos, Coahuila.

## ABSTRACT

The State of Coahuila has seasonal areas where native maize is also grown. In other regions of Mexico, the presence of transgenic DNA has been detected in native varieties. To date, research has not been carried out to find out if in the genetic diversity of native maize in Coahuila there is infiltration of transgenes and in what quantity. The objective of this research was to establish a baseline for the presence or absence of transgenes in native maize varieties of Coahuila. In the year 2017, 192 samples were collected that were analyzed at the DNA level by real-time PCR using TaqMan<sup>®</sup> probes to detect the presence of the 35S promoter, as well as the sequence of the TNOS terminator, both used in the vast majority of commercial transgenics. The results indicated the presence of transgenic sequences in 11 (5.72 %) of the 192 analyzed samples, in levels that varied from 0.06 to 8.552% of transgenic DNA, registering the highest levels in the collected the maize the municipalities of Parras de la Fuente, Viesca and Ejido Tío Pio. According to what was found in other regions, although the interpopulation transgenic presence was low, the amount of intrapopulation transgenes was high.

**Keywords:** Maize, genetic diversity, native varieties, transgenes, Coahuila.

## INTRODUCCIÓN

En México se localizan los centros de origen del maíz y en todo el país se lleva a cabo el proceso de diversificación, en un amplio rango de altitud y variación climática, desde el nivel del mar hasta los 3,400 metros sobre el nivel del mar (msnm), con más de 59 razas, cada una con una amplia variación (CONABIO, 2011).

Actualmente en la agricultura industrializada existe una marcada tendencia hacia la uniformidad genética; es decir, hacia la implementación de unas pocas variedades seleccionadas genéticamente homogéneas (Davies, 2003); esto ha ocasionado el desplazamiento de los materiales nativos y, en otros casos, estas han disminuido su frecuencia, debido a la introducción de materiales mejorados de reducida base genética, que en algunos casos con la aplicación de la biotecnológica e ingeniería genética modifican la expresión de genes e introducen genes nuevos, como es el caso del maíz transgénico u organismos genéticamente modificados (OGM) (Fernández *et al.*2008) .

Un OGM se define como cualquier organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético que se haya obtenido mediante la aplicación de la biotecnología moderna (LBOGM, 2005). Por lo tanto un maíz GM es aquel que contiene uno o más paquetes transgénicos en todas sus células, el cual puede incluir uno o más genes foráneos de cualquier otro organismo, además de otros fragmentos de ADN que provienen de microorganismos que no intercambian material genético con el maíz de manera natural (Turrent *et al.*, 2013a).

Uno de los primeros transgénicos introducido en México fue en 1988 con una variedad de jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.) en Sinaloa (Serratos, 2009). Desde el descubrimiento de la presencia de secuencias transgénicas por Quist y Chapela en 2001 se ha intensificado la búsqueda de nuevos protocolos capaces de detectar dichas secuencias para rastrear eventos

transgénicos, una de ellas es la técnica de Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay que permite detectar una proteína o proteínas diferentes de interés, aunque no es capaz de medir la cantidad presente, por lo que la cuantificación por número de copias requieren métodos altamente sensibles, específicos y confiables, como la PCR en tiempo real (Mejía, 2011, Acatzi *et al.*, 2014, Lopez-Sanchez *et al.*, 2005, SENASICA, 2014 y Nageswara-Rao *et al.*, 2013).

Varios investigadores se han enfocado en conocer los mecanismos de difusión y la frecuencia de los OGM (Dyer *et al.*, 2009 y Mirco *et al.*, 2014). Díaz y Galindo (2014) evaluaron por primera vez en Venezuela eventos transgénicos en semillas de maíz obteniendo resultados positivos con la proteína Cry1Ab asociado a eventos específicos DAS-Ø15Ø7-1(resistencia a herbicida y tolerancia a insectos lepidópteros). Gutiérrez-Rosati en 2008 reporta la presencia de eventos MON810, NK603 en Perú. También se ha hecho un estudio vía polen en Uruguay (Fernández, 2011), en el que se reportan resultados positivos con MON810 en 13 de las muestras, BT11 en 14 de ellas y la combinación de ambos eventos en 9 de ellas (eventos apilados). En Colombia, Chaparro-Giraldo *et al.* (2015) realizaron estudios del proceso de flujo de genes que afectan a las poblaciones de maíz en campo, confirmando la presencia de transgénos en variedades locales y otras en variedades convencionales en el Valle de San Juan, concluyendo que el flujo genético se relaciona con prácticas inadecuadas entre los agricultores. Goggi *et al.* (2007) estudiaron el flujo de genes en campos de maíz con diferentes densidades de polen; los resultados indican la importancia de la densidad de polen en campo y en los campos receptores sobre el flujo genético del maíz. Otro estudio de dispersión de polen en la atmósfera fue cuantificar la contaminación del flujo de genes por polen de maíz GM y no GM; los resultados indicaron una disminución de contaminación por GM si la distancia de la fuente GM es mayor (Popescu *et al.*, 2010 y Luna *et al.*, 2001). Ma *et al.* (2004) consideran que una distancia de 200 m entre dos genotipos (híbridos,

poblaciones y parientes silvestres) parece ser apropiada para Bt u otro maíz GM. Aunque Zhang *et al.* (2011) consideran un aislamiento apropiado de 300 m. Viljoen y Chetty (2011) consideran un control más estricto del flujo génico y sugieren aislamientos temporales combinados con las distancias más estrictas de los requeridos.

Considerando que en el territorio mexicano y en las comunidades campesinas sigue existiendo una gran riqueza genética de maíz la detección de transgenes también ha sido motivo de estudio y de controversia en diversas investigaciones (Metz y Fütterer, 2002; Kaplinsky *et al.*, 2002; Ortiz *et al.*, 2005a; Ortiz *et al.*, 2005b; Cleveland *et al.*, 2005; Serratos-Hernandez *et al.*, 2007; Piñeyro-Nelson *et al.*, 2009). Los anteriores estudios, además de otros realizados en México (Landavazo *et al.*, 2006; Castro, 2006; Rojas, 2010; Ruiz, 2012; Trejo, 2014; Rivera-Lopez, 2009; Serratos-Hernández *et al.*, 2004; Mezzalama y Ortiz, 2010) no contemplaron la cuantificación de OGM, como lo fue en la investigación de Carreón (2011), quien reporta porcentajes bajos (0.31 y 0.01%) a nivel intrapoblacional. Además, los anteriores estudios no contemplaron a los estados del norte de México, en donde también se cultivan variedades nativas y que son puntos estratégicos para la producción del maíz; tal es el caso de Coahuila. La presente investigación tuvo por objetivo detectar y cuantificar secuencias transgénicas inter e intrapoblaciones en maíz nativo de Coahuila, conocimiento que ayudará a conocer el estatus actual de los maíces nativos y al mismo tiempo tomar las medidas pertinentes en pro de la conservación de las razas nativas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ámbito geográfico de aplicación.

El estudio fue realizado dentro de los siete polígonos del estado de Coahuila, declarados en el acuerdo como Centros de Origen y Diversidad Genética del Maíz en México, publicado en el Diario Oficial de la Federación (Figura 2.1).

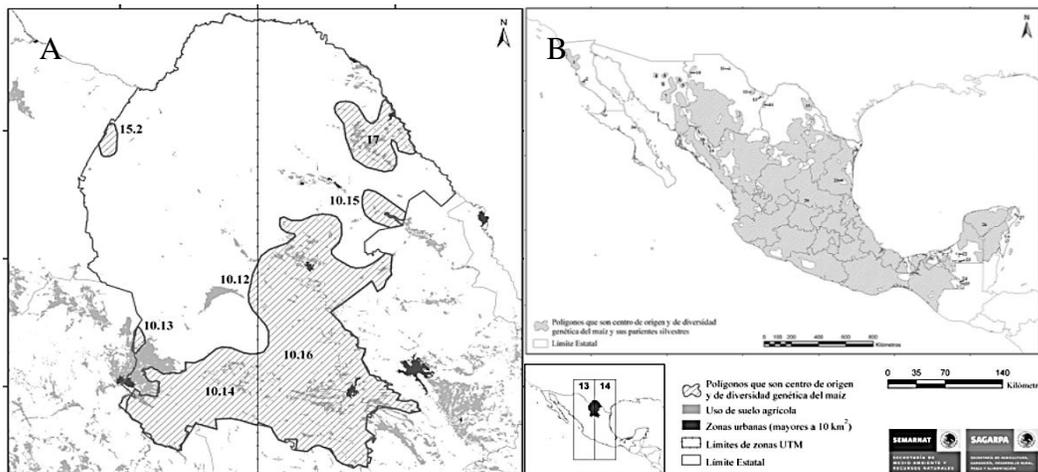


Figura 2.1 A) Centros de origen y diversidad genética de maíz en el estado de Coahuila. B) Polígonos declarados como centros de origen y diversidad genética del maíz y sus parientes silvestres en México.

### Definición de los polígonos a muestrear.

Con el programa ArcMap de ArcGis 10.3 se elaboraron los polígonos considerados Centros de Origen y Diversidad Genética de Maíces Nativos y Parientes Silvestres en el estado de Coahuila, partiendo de los puntos que delimitan dichas áreas publicados en el Diario Oficial de la Federación en noviembre de 2012. A los polígonos generados se sobrepusieron las capas de división estatal, municipal, localidades urbanas, carreteras y medios de comunicación, así como distritos de riego y localidades rurales en formato shape, las cuales se descargaron del INEGI.

Método de muestreo en cada polígono.

Para determinar el número de localidades a visitar se contabilizó y sumó el número de localidades dentro de los 7 polígonos; a este total se le aplicó el muestreo sistemático propuesto por Murray (1988), con una confiabilidad del 95 % y un error de muestreo del 10 %, aplicando la siguiente ecuación:

$$n = \frac{NS_{sist}^2}{\frac{B_u^2}{t^2}(N - 1) + S_{sist}^2}$$

Dónde:

n: Tamaño de muestra. Beneficiarios de PROCAMPO 2012 ciclo PV (SAGARPA, 2016).

N: Tamaño de la población (2560).

t: Valor de la distribución “ $t_{\alpha/2, N-1}$ ” para una confiabilidad (1 -  $\alpha$  = 95 %)

$$t_{\alpha/2, N-1} = t_{0.05/2, 2560-1} = 1.96$$

$S_{sist}^2$ : Varianza de la población (Varianza Máxima = 0.25)

$B_u$ : Error de muestreo = 0.10.

Con este procedimiento de muestreo se considera máxima varianza de 95 % de confianza y un error de 10 % tomado como base lo propuesto por Manzano y Braña (2003) y Martínez y Martínez (2006) que es la situación más desfavorable en cuanto a dispersión de la distribución, asegurando una buena estimación en los tamaños de muestra; esto ocurre cuando la probabilidad de éxito (p) y fracaso (q = 1-p) de una distribución binomial es 0.25 (p = 0.5) asemejándose a una distribución normal (Martínez y Martínez, 2008). Considerando la extensión de las áreas declaradas como centros de origen y diversidad genética, así como el nivel de riqueza genética inferido por la intensidad de colecta registrada de proyectos nacionales ya ejecutados.

## Colecta de poblaciones.

Se realizaron recorridos recolectando muestras de mazorca en las localidades ubicadas dentro de cada uno de los polígonos, que se determinó de manera previa mediante trabajo de gabinete. Debido a la fecha en la que se realizó la colecta la mayoría de las muestras se obtuvieron de la troja de los productores o bien en las bodegas donde se almacena el grano, colectando un total de 192 accesiones (Figura 2.2).

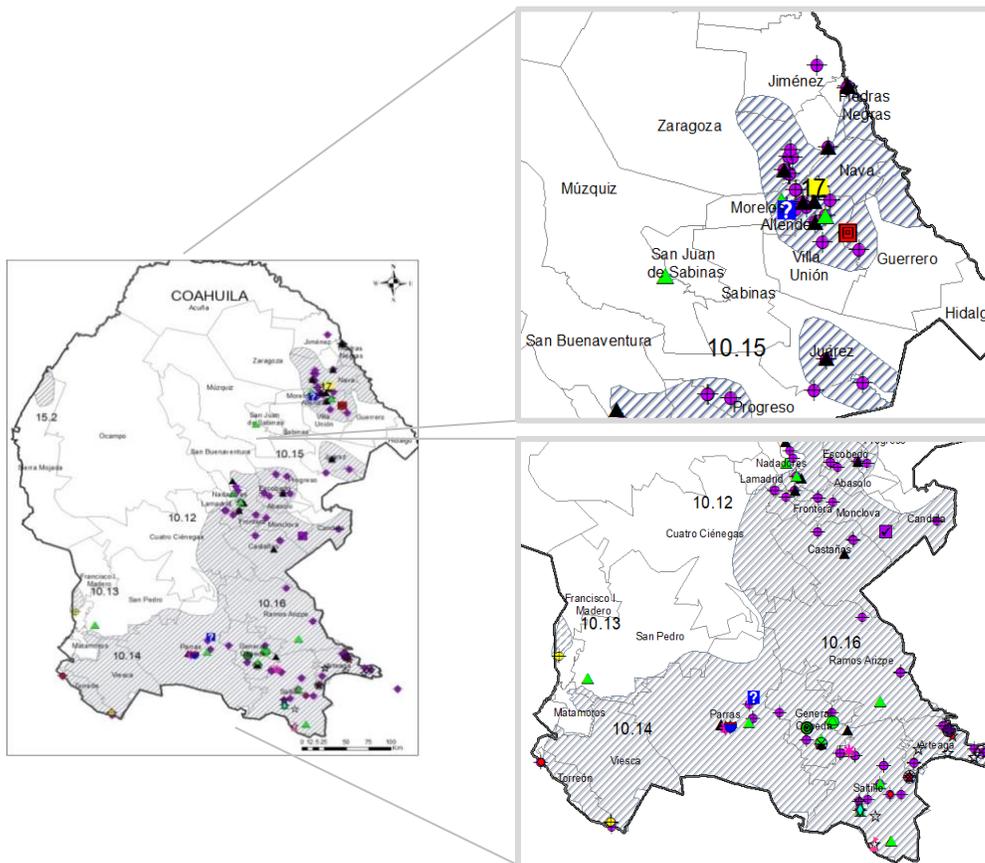


Figura 2.2 Puntos muestreados en los Centros de Origen en el estado de Coahuila.

A cada productor de maíz se le pidió una muestra de su material, que seleccionó de la misma manera como si fuera a ser semilla para sembrar en un ciclo posterior. Cada colecta tenía como mínimo 5 mazorcas para la identificación racial y toma de fotografía; cuando ésta fue en grano se le solicitó 2 kg como mínimo.

### **Obtención y muestreo de harina.**

El material de partida fue 1 kg de la semilla de maíz colectada, el cual se dividió en tres partes iguales. A cada tercio de muestra se le sometió a un molido por separado durante 2 minutos obteniendo harina muy fina. Una vez obtenida la muestra de harina se procedió a realizar un muestreo por el método de doble cuarteo apegadas a las normas de la ISTA (2014), para lo cual se colocó 1 kg de harina en un molde de madera de  $35 \times 40 \text{ cm}^2$ , delimitado por tirantes de madera de 1 cm de alto en su interior, con marcas para formar 16 cuadrantes; la harina se distribuyó de forma homogénea con ayuda de una barra distribuidora dentro del molde descrito. Con apoyo de una espátula metálica, la barra de madera y las marcas del molde de madera se trazaron 16 cuadrantes (primer cuarteo), dejando dividida la muestra en 16 partes iguales. Con la ayuda de la espátula de metal se tomaron 5 sub-muestras (segundo cuarteo) de cada uno de los 16 cuadrantes obtenidos. Cada cuadrante fue sub-muestreado en un tubo eppendorf con un volumen de 0.5 mL. Cada mL de cada uno de los 16 cuadrantes por muestra fue colocado en un tubo Falcón.

### **Extracción y Cuantificación de ADN**

De cada una de las muestras de harina contenidas en el tubo Falcón se tomaron 150 mg y se colocaron en un tubo eppendorf de 2  $\mu\text{L}$  y el sobrante de la muestra se conservó en tubos Falcón. A cada tubo eppendorf se le aplicaron 900  $\mu\text{L}$  de solución de lisis y 100  $\mu\text{L}$  de reactivo A, se les dio vórtex (Si™ Vórtex Genie® 2 Modelo G560, USA) por 15 seg y después se dejó reposar durante 14 h a  $4 \text{ C}^\circ$ . Una vez pasadas las 14 h se aplicaron 2  $\mu\text{L}$  de RNAsa al tejido y se le dio vórtex por 15 segundos. Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de dodecil sulfato de sodio (SDS) 10 % al lisado, se le dio vórtex por 15 seg y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 400  $\mu\text{L}$ . de buffer de precipitación (N5) al lisado, se dio vórtex por 30 seg, después se

centrifugó (Hemle Labortechnik GmbH, D-78564 Germany) a 15000 rpm por 15 min a 4 °C. La extracción de DNA se realizó en un robot de extracción de DNA King Fisher Flex 96 (Thermo Fisher Scientific Inc., U.S.A.). Para ello se transfirieron 800 µL del sobrenadante a la placa con 80 µL de detergente (DI) y 40 µL de perlas magnéticas. También se utilizaron tres placas de pozo profundo con 750 µL de amortiguador de lavado, se agregaron en una placa de pozo pequeño 100 µL de amortiguador de dilución y por último se colocó el cubre peine. La cuantificación y determinación de la calidad del ADN obtenido se realizó utilizando un espectrofotómetro de ultra-bajo volumen NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, Waltham MA.), a través de lecturas de absorbancia de 260 y 280 nm. Las muestras se mantuvieron guardadas en el congelador a -20 °C hasta el momento de su uso.

### **Determinación y cuantificación de secuencias transgénicas**

Esta fase se realizó utilizando el equipo de PCR tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems, California, USA) mediante el kit para detección de organismos genéticamente modificados Genesig® GMO Event Quantification CaMV 35S Promoter, para detectar la secuencia del promotor 35S del *Virus Mosaico de la Coliflor*, así como de la secuencia terminadora del gen nopalina sintasa (*TNOS*) de *Agrobacterium tumefaciens*, con el kit Genesig® GMO Event Quantification NOS Terminator, corriéndose cada una de las muestras por duplicado. En cada placa fue posible colocar 45 muestras con 2 repeticiones más el control interno (IPC), control positivo y control negativo propio del kit; ambos controles con dos repeticiones. Para la cuantificación se usaron las secuencias del promotor 35S y el terminador NOS como targets para la detección de organismos genéticamente modificados, utilizando una curva estándar de cuantificación. Para dicha curva se usaron siete diluciones de un material de referencia de contenido conocido; dicho material fue harina transgénica de maíz del evento MON 863 x MON

810 con 9.9 % de contenido transgénico, certificados por The Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Geel, Bélgica). El análisis se realizó en las muestras que resultaron positivas a la presencia de los primers mencionados anteriormente.

## **RESULTADOS**

### **Detección de la secuencia del promotor 35S**

Las amplificaciones por PCR en tiempo real arrojaron resultados negativos para 182 muestras (94.8 %), mientras que 10 muestras (5.2 %) resultaron positivas para la presencia de secuencias de organismos genéticamente modificados (Cuadro 2.1)

Cuadro 2.1 Muestras de maíz del estado de Coahuila positivas para la presencia del promotor 35S.

Muestra	Localidad	Municipio	Raza
4	Ejido Jalisco	Torreón	Ratón
8	Tanque Aguilereño	Viesca	Ratón
9	San José de Aguaje	Viesca	Ratón
15	Ejido Parras 2	Parras de la Fuente	Ratón-Tuxpeño Norteño
44	Santa Rita	Saltillo	Ratón
45	Santa Rita	Saltillo	Ratón
58	Hedionda Grande	Saltillo	Cónico Norteño- Ratón
108	La Providencia	Castaños	Ratón
156	Zaragoza	Ejido Tío Pío	Ratón
171	Villa Unión	Ejido La Luz	Ratón

### **Detección de la secuencia terminadora tNOS**

El resultado de la PCR tiempo real para la secuencia tNOS arrojó resultados negativos para 187 muestras (97.4 %), mientras que se detectaron resultados positivos en 5 muestras (2.6 %),

(Cuadro 2.2). Las muestras 15, 44, 45 y 171 ya habían sido detectadas como positivas con el análisis para el P35S, excepto por la muestra 4 que solo amplificó para el tNOS.

Cuadro 2.2 Muestras de maíz del estado de Coahuila positivas para la presencia del terminador tNOS.

Muestra	Localidad	Municipio	Raza
14	Ejido Parras 2	Parras de la Fuente	Ratón-Tuxpeño Norteño
15	Ejido Parras 2	Parras de la Fuente	Ratón-Tuxpeño Norteño
44	Santa Rita	Saltillo	Ratón
45	Santa Rita	Saltillo	Ratón
171	Villa Unión	Ejido La Luz	Ratón

### Cuantificación de la presencia de transgenes

En la siguiente figura (2.3) se puede observar la curva estándar de cuantificación del promotor 35S y del terminador tNOS.

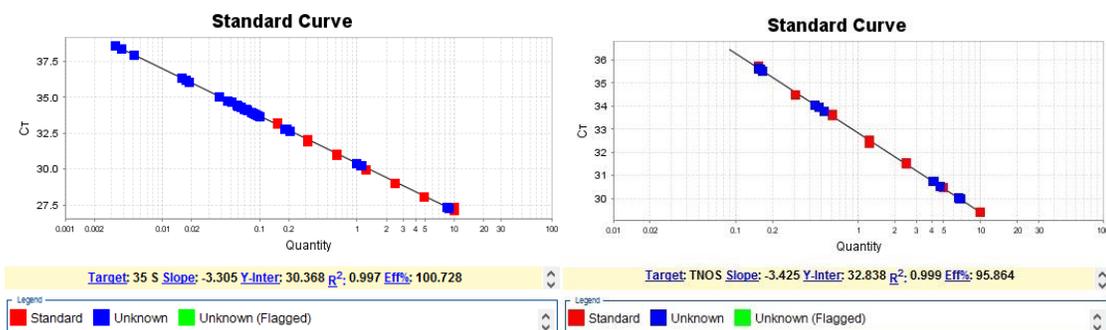


Figura 2.3 Curva estándar de cuantificación utilizada para la determinación del nivel de introgresión de secuencias transgénicas en maíces positivos del estado de Coahuila con respecto al promotor 35S y terminador tNOS.

En el Cuadro 2.3 se presentan de forma resumida los resultados obtenidos, donde puede observarse la cuantificación de las 11 muestras (5.2 %) de 192 que resultaron positivas a la introgresión de secuencias transgénicas.

Cuadro 2.3 Nivel de introgresión de secuencias transgénicas en maíces positivos del estado de Coahuila con respecto al promotor 35S y al terminador tNOS

Muestra	Raza	Nivel de introgresión (%)	
		P35S	tNOS
4	Ratón	0.083	-
8	Ratón	0.004	-
9	Ratón	1.070	-
14	Ratón-Tuxpeño norteño	-	6.770
15	Ratón-Tuxpeño norteño	8.552	4.810
44	Ratón	0.060	0.123
45	Ratón	0.064	0.169
58	Cónico norteño-Ratón	0.095	-
108	Ratón	0.017	-
156	Ratón	0.194	-
171	Ratón	0.045	0.361

La Figura 2.4 muestra las curvas de amplificación de los estándares de referencia y de la muestra 15, que fue en la que se obtuvo un mayor porcentaje del promotor CaMV-35S (8.552 %) y la muestra 9 que amplificó con una exactitud de 1.070 %.

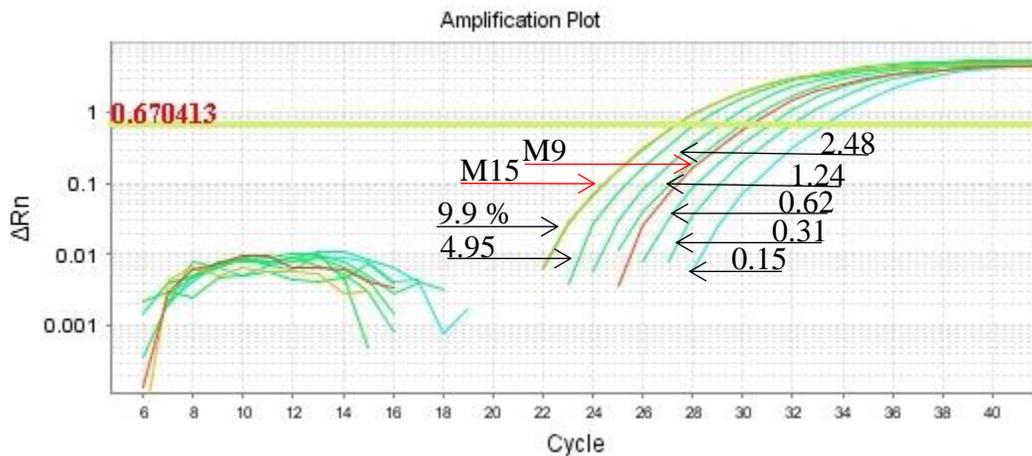


Figura 2.4 Intervalos de amplificación para el promotor CaMV-35S en la muestra 15 (M15) y 9 (M9).

La Figura 2.5 muestra los intervalos de amplificación de los estándares de referencia con la muestra 14 y la muestra 15 en la que se detectó una amplificación de 6.770 % y 4.810 %, respectivamente.

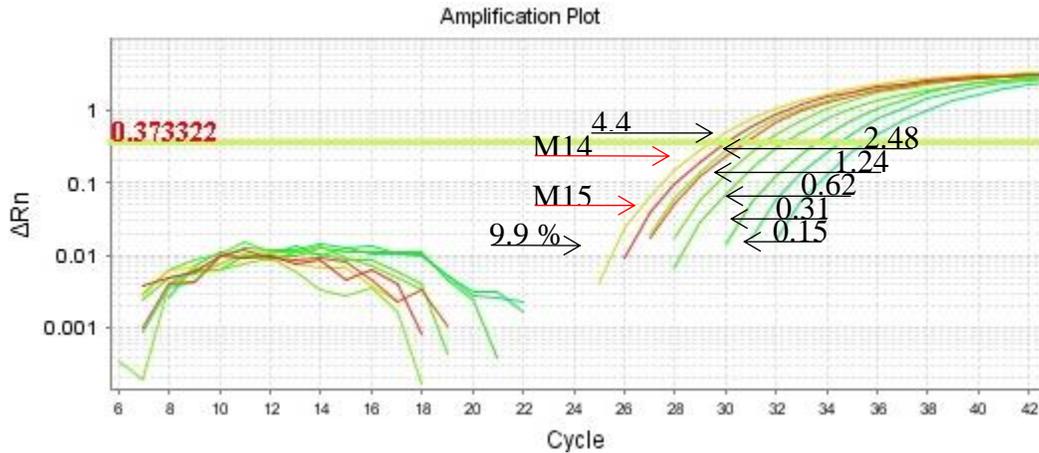


Figura 2.5 Intervalos de amplificación para el promotor CaMV-35S en la muestra 14 (M14) y 15 (M15).

La Figura 2.6 muestra la ubicación de las poblaciones donde se detectó y cuantificó la presencia de transgenes. Como se puede observar las poblaciones positivas están distribuidas en casi todos los polígonos, lo que representa un peligro pues éstas son puntos de diseminación de los transgenes.

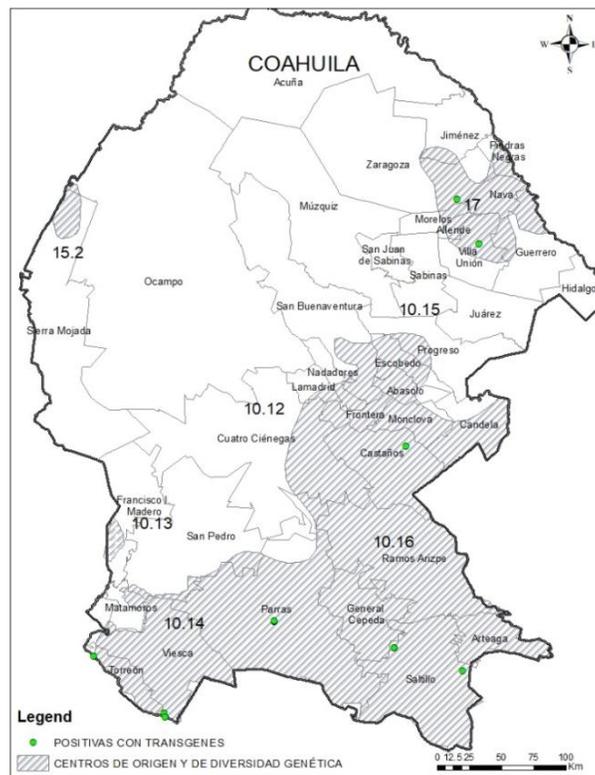


Figura 2.6 Ubicación geográfica de las muestras positivas de maíz en Coahuila.

## DISCUSIÓN

Presencia de secuencias transgénicas del promotor CaMV 35S y del terminador NOS en maíces nativos de Coahuila.

Nuestros resultados indican la presencia de secuencias transgénicas (P35S y tNOS) en maíces nativos del estado de Coahuila. En otras investigaciones también se ha reportado la presencia de transgenes en maíz. Quist y Chapela (2001) fueron los primeros en detectar la secuencia del promotor 35S en variedades nativas de maíz de Oaxaca, confirmado años más tarde por Landavazo *et al.* (2006). En ese mismo año Castro (2006) reporta la presencia de secuencias transgénicas en maíces nativos en Sinaloa. Serratos-Hernández *et al.* (2007) encontraron muestras positivas (2/208 muestras) mucho menores a nuestros resultados (11/192 muestras). Dyer *et al.* (2009) reportan de 1.8 % a 3.1 % de proteínas de origen transgénico en maíz nativo de Oaxaca, Veracruz, Yucatán y Guanajuato. En ese mismo año Piñeyro-Nelson *et al.* (2009) reportan la presencia del promotor 35S. Un año después Rojas (2010) encontró muestras positivas en el norte, centro y sur de Veracruz en un 40 % de las muestras; en nuestra investigación encontramos una frecuencia de 5.2 % para el p35S y de 2.6 % para la secuencia terminadora NOS. Carreón (2011) realizó un estudio en dos regiones del estado de Puebla y encontró al promotor CaMV 35S en mayor frecuencia (36 %) entre poblaciones que dentro de poblaciones (menor a 0.3 %). Recientemente Iversen *et al.* (2014) analizaron la presencia del promotor 35S en 796 plantas individuales de maíz (hojas) y en 20 muestras de semillas de maíz de Sudáfrica observando resultados positivos para una de las 796 muestras de hoja (0.0013 %) y en cinco de las 20 muestras de semillas (25 %). Chaparro-Giraldo *et al.* (2015) realizaron pruebas para la detección del flujo génico en semillas y polen en relación con los estándares

legales. El 88 % de las parcelas fueron positivas para las pruebas de ImmunoStrip® y PCR (para identificación del promotor 35S, el terminador NOS y el gen cry1F) sobre hojas (flujo de genes vía semilla) y el 12 % de las parcelas restantes fueron positivas para transgenes en semillas (flujo de genes vía polen).

Cantidad de secuencias transgénicas entre y dentro de poblaciones de maíz nativo de Coahuila.

Las curvas de cuantificación utilizadas (Figura 3) muestran resultados confiables ya que éstas presentaron valores para  $R^2$  superiores a 0.99 y eficiencias arriba del 95 %. Hasta la fecha no se había reportado grandes cantidades de contenido transgénico en maíces nativos como los reportados en esta investigación. En un estudio realizado por Landavazo *et al.* (2006) en maíz nativo de la Sierra de Oaxaca se detectó resultados positivos de muestras de hasta con nueve decimales (0.000000001); nuestros resultados más bajos fueron de 0.004 en la raza Ratón, perteneciente al ejido de Tanque Alguilereño del municipio de Viesca. Rojas en 2010 reporta porcentajes entre 0.01 % a 0.07 %. El porcentaje de transgénos reportados por Carreón son entre 0.31 y 0.01 %. En Brasil, Branquinho *et al.* (2013) reportan valores superiores al 1 % de contenido transgénico. Cabe resaltar que nuestro mayor porcentaje fue de 8.552 % de contenido transgénico para el promotor P35S en la raza Ratón-Tuxpeño Norteño de Coahuila. En otros estudios se reportan porcentajes más altos, como el de Kaur *et al.* (2010), quienes reportan 47.5%; sin embargo, el estudio se realizó en una variedad transgénica y no a maíces nativos.

La entrada de los transgénos en una población no asegura que éstos puedan persistir en las poblaciones receptoras, pues dichos genes al llegar a una nueva variedad cultivada en el campo entran en una dinámica dictada por las leyes de la genética cuantitativa y de poblaciones y son sujetos a presiones de selección natural o artificial, positiva o negativa, de acuerdo con el valor adaptativo que confieran a los individuos portadores; además de quedar expuestos al fenómeno

de deriva genética, lo que eventualmente puede conducir a una fijación total o a una pérdida definitiva en la población, por lo que su destino es incierto en el mediano y largo plazo, siendo necesario realizar estudios de seguimiento a través del tiempo para estar en posibilidades de diseñar estrategias para manejar su presencia.

### **CONCLUSIONES**

Nuestra investigación evidencia la introgresión de secuencias transgénicas del promotor 35S y del terminador NOS en maíces nativos de Coahuila, en un porcentaje de hasta 8.5, cantidad no reportada en la literatura científica. Los mayores niveles de introgresión se presentan en los maíces nativos de los municipios de Parras de la Fuente y Viesca Coahuila, México.

### **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece a SAGARPA-COFUPRO, por el financiamiento para el desarrollo de este proyecto. A los trabajadores del Colegio de postgraduados, por apoyarme en la toma de datos.

### **LITERATURA CITADA**

- Acatzi, A., Gálvez A., Plasencia J., Quirasco M. (2014). Assessment of DNA extraction methods for GMO analysis for grain monitoring in Mexico. Part II: Quantification by Real-Time PCR. *Agrociencia* 48:35-52.2014.
- Branquinho, M.R., Vasconcelos-Gomes, D.M., Barroso-Ferreira, R.T., Lawson-Ferreira, R. and Cardarelli-Leite, P. (2013) Detection of genetically modified maize events in Brazilian maize-derived food products. *Food Science and Technology* 33(3):399-403.

- Carreón H. N. (2011). "Detección de transgenes en variedades nativas de maíz en dos regiones del estado de Puebla" Tesis de maestría. Colegio de postgraduados campus Puebla.
- Castro, V. I. (2006). Identificación de transgenes en poblaciones de maíces criollos (*zea mays* L.) del estado de Sinaloa. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- CONABIO. (2011). 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". Octubre de 2010. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F.  
<http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/proyectoMaices.html>.
- Cámara de Diputados (2005). Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Secretaria General. Secretaria de Servicios Parlamentarios. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. México, D.F.
- Chaparro-Giraldo, A., Blanco, M J. T. and López-Pazos, S.A. (2015). Evidence of gene flow between transgenic and non-transgenic maize in Colombia. *Agronomía Colombiana* 33:297-304.
- Cleveland, D. A., D. Soleri, F. Aragón- Cuevas, J, Crossa y P. Gepts. (2005). Detecting (trans) gene flow to landraces in centers of crop origen: lessons from the case of maize in Mexico. *Environ. Biosafety Res.* 4: 197-208.
- Davies, W. P. (2003). An historical perspective from the Green Revolution to the gene revolution. *Nutrition Reviews* 61:S14-S134.

- Díaz L. y Galindo I. (2014). Detección e identificación de eventos asociados a organismos vivos modificados en semillas de maíz (*Zea mays* L.) en Venezuela empleando métodos de inmunoensayo y análisis por PCR. *Rev. Fac. Agron. (UCV)* 40 (1): 37-49. 2014.
- Dyer, G. A., J. A. Serratos-Hernández, H. R. Perales, P. Gepts, A. Piñeyro-Nelson, A. Chávez, N. Salinas-Arreortua, A. Yúnez-Naude, J. E. Taylor and E. R. Alvarez-Buylla (2009). Dispersal of transgenes through maize seed systems in Mexico. *PLoS ONE* 4(5): e5734. doi:10.1371/journal.pone.0005734.
- Fernández, P., Martínez J. Z., Jiménez, M, M., A-Barahona, N., Muñoz, E, R., E-Urrialde, A., R-Álvaro, C., G-Lizcano, J. (2008). Los alimentos genéticamente modificados: Perspectivas biológicas, médicas, medioambientales y sociales. *Encuentros Multidisciplinares* 5 (2000): 1-42.
- Fernández, C. M. (2011). Tesis "Análisis de Transgénesis mediante PCR de 20 Polentas que se encuentran a la venta en el Mercado Uruguayo" Tesis de licenciatura. Universidad de la República Facultad de Ciencias.
- Goggi, A.S., López-Sánchez, H., Caragea, P., Westgate, M., Arritt, R. and Clark, C.A. (2007). Gene flow in maize fields with different local pollen densities. *International Journal of Biometeorology* 51:493-503.
- Gutiérrez-Rosati A, Poggi PD, Gálvez GM, y Cáceres RR. (2008). Investigaciones sobre la presencia de transgénos en Perú: caso maíz (*Zea mays* L.). *Rev. Latinoam. Genet.* 2008; 1(1): GV-89.
- Iversen, M., Idun M. Grønsberg, Johnnie van den Berg, Klara Fischer, Denis Worlanyo Aheto, Thomas Bohn. (2014). Detection of Transgenes in Local Maize Varieties of Small-Scale

- Farmers in Eastern Cape, South Africa. PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0116147  
December 31, 2014.
- ISTA, (2014). International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing 2014. Testing for seeds of Genetically Modified organisms. Zürichstr. 50, CH-8303 Bassersdorf, Switzerland. Online ISSN 2310-3655.
- Kaplinsky, N., D. Braun, D. Lisch. A. Hay, S. Hake y M. Freeling. (2002). Maize transgene results in Mexico are artefacts. *Nature*. 416: 601-602.
- Kaur, J., Radu, S., Ghazali, F.M. and Kqueen, C.Y. (2010) Real-Time PCR-based detection and quantification of genetically modified maize in processed feeds commercialized in Malaysia. *Food Control* 21:1536-1544.
- Landavazo G., D. A; Calvillo A., K. G.; Espinosa H., E.; González M., L; Aragón C., F.; Torres P., Guzmán M., S.; Montero T., Mora A. M. A. (2006). Caracterización molecular y biológica de genes recombinantes en maíz de Oaxaca. *Agricultura Técnica en México* 32(3):267-279.
- Lopez-Sanchez, H., Goggi, A.S. and Satish, R. (2005) Detection of the CaMV-35S Promoter Sequence in Maize Pollen and Seed. *Seed Technology* 27 (2):211-222.
- Luna, V.S., Figueroa, M.J., Baltazar, M.B., Gomez, L.R., Townsend, R. and Schoper, J.B. (2001). Maize Pollen Longevity and Distance Isolation Requirements for Effective Pollen Control. *Crop Science* 41:1551-1557.
- Ma, B.L.; K.D. Subedi, y L. M. Reid. (2004). Extent of Cross-Fertilization in Maize by Pollen from Neighboring Transgenic Hybrids. *Crop Science - CROP SCI*. 44. 10.2135/cropsci2004.1273.

- Manzano, V., y Braña, T. (2003). Análisis de datos y técnicas de muestreo. En Levy, J.P., y Varela, J. (dir.): Análisis multivalente para las Ciencias Sociales (pp.91-143), Madrid: Pearson Educación.
- Martínez, J. A., y Martínez, L. (2006). El factor de Imprecisión sobre la Escala de Medida (FIEM) en la estimación de medias en un muestreo aleatorio simple. *Investigación y Marketing*, 92, 66-70.
- Martínez G., J., y Martínez C., L. (2008). Determinación de la máxima varianza para el cálculo del factor de imprecisión sobre la escala de medida, y extensión a diferentes tipos de muestreo. *Psicothema*, 20 (2), 311-316.
- Mejía C., M. L. (2011). Tesis "Estandarización de un Protocolo para Detección de OGMs: Evaluación de la Presencia de OGMs en Granos de Soya Colectados en Diferentes Centros de Acopio de Ecuador" Tesis de licenciatura. Universidad San Francisco de Quito. Disponible en <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/800>.
- Metz, F. y J. Fütterer. (2002). Suspect evidence of transgenic contamination. *Nature*. 146:600-6001.
- Mezzalama, M., Crouch, J.H. and Ortiz, R. (2010). Monitoring the threat of unintentional transgene flow into maize gene banks and breeding materials *Electronic Journal of Biotechnology* 13(2):1-6.
- Mirco H., Bernadette O., Jürg S., Peter B., Claudia B. (2014). Detection of feral GT73 transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) along railway lines on entry routes to oilseed factories in Switzerland. *Environ Sci Pollut Res* (2014) 21:1455–1465.
- Murray S (1988) *Estadística*. 2a. edición. Editorial McGraw Hill. Madrid, España. 372 p.

- Nageswara-Rao, M., Kwit, C., Agarwal, S., T, M. P., A, J S., S, J Y., M, R M. y Neal C, S. Jr. (2013). Sensitivity of a real-time PCR method for the detection of transgenes in a mixture of transgenic and non-transgenic seeds of papaya (*Carica papaya* L.) BMC Biotechnology 2013, 13:69 <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/13/69>.
- Ortiz, G. S., E. Ezurra, B. Schoel, F. Acevedo, J. Soberon y A. A. Snow. (2005a). Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, México (2003-2004). Proceedings of the National Academy Sciences. 102: 12,338-12343.
- Ortiz, G. S., E. Ezurra, B. Schoel, F. Acevedo, J. Soberon y A. A. Snow. (2005b). Reply to Cleveland *et al.*'s "Detecting (trans) gene flow to landraces in centers of crop origin: lessons from the case of maize in Mexico. Environ. Biosafety Res. 4: 209-215.
- Piñeyro-Nelson, A., J. Van Heerwaarden, H. R. Perales, J. A. Serratos-Hernández, A. Rangel. M. B. Hufford, P. Gepts, A. Garay-Arroyo, R. Rivera-Bustamante y E. R. Alvarez-Buylla. (2009). Transgenes in Mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. Molecular Ecology. 18:750-761.
- Popescu, S., Ioja-Boldura, O., Marutescu, A., Sabau, I. y Badea, E.M. (2010) Quantification of pollen mediated gene flow in maize. Romanian Biotechnological Letters, Vol. 15, No. 2, Supplement.
- Quist, D. y Chapela, I. H. (2001). Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, México. Nature 414, 541–543 2001.
- Rivera-López, F. (2009) Análisis de la Presencia de Proteínas de Maíces Genéticamente Modificados en Variedades de Maíz Nativo en México. Tesis de Licenciatura. Universidad nacional Autónoma de México.

- 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 Veracruz. Tepetates, Manlio Fabio Altamirano. 117 p.
- Ruiz, M. O.J. (2012). Tesis " Monitoreo y detección de maíz transgénico en el municipio de Erongarícuaro, Michoacán. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- SENASICA. (2014). Detección de Organismos Genéticamente Modificados Centro Nacional de Referencia en Detección de OGM. Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera. Km 37.5 Carretera Federal México-Pachuca. Estado de México, Tecámac de Felipe Villanueva Centro, C.P 55740.
- Serratos-Hernández, J.A., Islas-Gutiérrez, F., Buendía-Rodríguez, E. y Berthaud J. (2004). Gene flow scenarios with transgenic maize in Mexico Environmental Biosafety Research 3:149-157.
- Serratos-Hernández, J. A., J. L. Gómez-Olivares, N. Salinas-Arreortua, E. Buendia-Rodríguez, F. Islas-Gutiérrez y A. de-Ita. (2007). Transgenic proteins in maize in the soil conservation area of Federal District. Mexico. Front Ecol Environ. 5 (5):247-252.
- Serratos, H J. A. (2009). Bioseguridad y dispersión del maíz en México. Redalyc. Ciencias. Núm. 92-93.pp 130-141. Universidad Autónoma de México. México.
- Turrent F., A., J. A. Serratos H. A. Espinosa C. y E. Álvarez-Buylla R. (2013a). El Maíz Transgénico en México. Edic. Francisco Toledo, PRO-OAX, A.C. José Luis Chávez Servia, UCCS Oaxaca Alejandro de Ávila, Jardín Etnobotánico de Oaxaca y UCCS. Oaxaca de Juárez.

Trejo P., V. (2014). Resistencia al Glifosato en Maíces Nativos de Veracruz e Híbridos Comerciales en México. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados-Campus Montecillo. 86 p.

Viljoen, C. and Chetty, L. (2011) A case study of GM maize gene flow in South Africa Environmental Sciences Europe 2011, 23:8. Europe 2011, 23:8  
<http://www.enveurope.com/content/23/1/8>.

Zhang, K., Li, Y. and Lian, L. (2011) Pollen-mediated transgene flow in maize grown in the Huang-huai-hai region in China. The Journal of Agricultural Science 149(2):205-216.

## CONCLUSIONES GENERALES

Nuestro estudio representa un avance en el tema de la diversidad genética de maíz nativo pues describimos una amplia diversidad morfológica de variedades nativas y un aumento en el número de razas intermedias con algún grado de combinación en Coahuila, aunque a la vez, detectamos que la raza Cónico está ausente, quizás indicativo de la reducción de la presencia de esta raza en los polígonos muestreados en Coahuila. Además, descubrimos la presencia de transgenes a nivel inter e intrapoblacional en cantidades no reportadas en estudios previos, lo que representa un riesgo en la conservación de las variedades nativas de maíz.

Indudablemente que estos resultados deben representar, por sí mismos, móviles para que las autoridades involucradas emprendan acciones al respecto, pues el acuerdo por el que se determinan Centros de Origen y Centros de Diversidad Genética del Maíz indica que “las personas físicas y morales que se dedican a la producción o distribución de semillas para siembra de maíz en las áreas enunciadas en el Acuerdo, deberán hacerlo con semillas de maíz libres de secuencias genéticamente modificadas” y deberán restringir las actividades relacionadas con este tipo de semilla en las áreas determinadas en el Acuerdo. La situación se torna particularmente crítica tomando en cuenta que la dispersión de las secuencias transgénicas en maíz es notoriamente amplia, abarcando cinco de siete polígonos protegidos por su condición de centros de origen y diversidad.