



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Monitoreo de detección de secuencias
transgénicas en granos
de polen del maíz**

T E S I S

Que para obtener el título de:

BIÓLOGA

P r e s e n t a :

Ixel Yuriria Miranda López



**Director de tesis:
Dra. Martha Graciela Rocha Munive
México D.F. marzo 2014**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

"La tristeza, para todos aquellos que, como yo, han perdido el rumbo de la vida, se manifiesta como una rabia que pretende pasar por inteligencia, y es ese deseo de ser inteligente lo que acaba por fastidiarlo todo". Pamuk

Dedico este trabajo de resistencia con agradecimiento a mi familia. Jesús, Vicky, Beli y Karla, sin ellos nada sería posible.

También, a mi abuela Ifigenia y a mis tíos Héctor, Poli y Mercedes quienes me estimularon en los inicios académicos.

Igualmente, lo dedico a César Torres, quien me ha acompañado y ayudado en este camino de dudas, alegrías, tristezas y caos. Agradezco y celebro que haya aparecido y que siga en mi vida.

Expreso mi gratitud a Paulina Soberanes: sin su ayuda y apoyo todo hubiera sido más difícil.

AGRADECIMIENTOS

La culminación de esta tesis se debe, en gran medida, a las minuciosas lecturas que Berenice Zúñiga Bustos le dedicó. Sus observaciones fueron indispensables para darle forma. También agradezco profundamente el apoyo en laboratorio y en campo que César Guerrero Guerra me ha brindado durante todo este proceso, y a Martha Rocha Munive por estos años de paciencia y solidaridad.

Reconozco el trabajo de los sinodales, Alfonso José Vilchis Peluyera y Mario Pérez Hernández en las correcciones de este escrito.

Índice

Resumen	1
Introducción	2
La importancia del maíz en México	2
Presencia en México y a nivel mundial de los organismos genéticamente modificados	8
Muestreo y detección de maíz GM en México	11
Objetivos	18
Justificación	19
Hipótesis	22
Método	23
Descripción de las muestras	23
Primer ensayo de colecta de granos de polen	23
Segundo ensayo de colecta de granos de polen	24
<i>Establecimiento de las condiciones del equipo Fast-Prep</i>	24
<i>Elección del adherente</i>	25
a) Experimento en el túnel de viento	26
b) Interferencia de los adherentes en qPCR	26
<i>Tipo de muestreador</i>	28
Tercer ensayo de colecta de granos de polen	32
Cuarto ensayo de colecta de granos de polen	34
Implementación y optimización del método de extracción de ADN a partir de granos de polen	40
Método de extracción 1: Ruptura de pared celular con CTAB	40
Método de extracción 2: Ruptura de pared celular con CTAB modificado	42
Método de extracción 3: Ruptura de pared celular con equipo <i>Fast-Prep</i>	42
Método de extracción 4: Modificación del Método de ruptura de pared celular con <i>Fast-Prep</i> .	44
Evaluación de la eficiencia de extracción de ADN y pureza por espectrofotometría y evaluación de su integridad por electroforesis	45
Cuantificación de un gen endógeno de maíz mediante qPCR	46
Amplificación por PCR con albumina sérica bovina (BSH)	49
Detección evento-específico para MON88017 y MON89034 mediante qPCR	50

Resultados	51
Discusión	72
Conclusiones	88
Referencias	91
Anexos	106

Resumen

En este trabajo se planteó la necesidad de estudiar cómo se mueven los transgenes entre cultivos de maíz a través del polen, el cual es la parte móvil de la planta y puede fertilizar a individuos de la misma o de otras poblaciones, para hacer un monitoreo de secuencias transgénicas en el ambiente.

Como parte de la investigación se probaron diferentes métodos de captura de granos de polen y de extracción de ADN para implementar la metodología adecuada en un campo de siembra experimental y así poder probar un protocolo definitivo.

Se encontró que las trampas volumétricas Hirst no son adecuadas para la captura de polen pero en el laboratorio se realizó una buena extracción de ADN con un nuevo procedimiento, el cual se propone en este estudio.

Introducción

La importancia del maíz en México

Desde épocas antiguas en México, el hombre estableció una estrecha relación con el maíz. Esta planta es la base de la alimentación de los mexicanos, ha sido aprovechada por los productores mexicanos (Álvarez-Buylla, 2011) y representa un patrimonio biológico y cultural muy importante (Orellana, 2006).

El maíz es originario de Mesoamérica, área que se extiende desde el sur de México hasta América Central. El maíz pertenece a la familia Poaceae y al género *Zea*. Se han reconocido cuatro subespecies de *Zea mays* L.: *Zea mays*, ssp *huehuetenangensis*, distribuida en los Altos de Guatemala; *Zea mays* ssp *mexicana* y *Zea mays* ssp *parviglumis*, a estas dos subespecies se les denomina teocintes, y *Zea mays* ssp. *Mays*, la subespecie que se cultiva ampliamente en México. El genoma de esta última incluye 10 cromosomas, que contienen alrededor de 50 mil genes (Turrent, 2009).

Es una planta monoica con flores masculinas (en la espiga) y flores femeninas (comúnmente llamadas mazorca) separadas de uno a dos metros a lo largo del tallo que puede crecer hasta tres metros de altura, lo que favorece la polinización cruzada a través del viento.

Existen evidencias para considerar a *Zea mays ssp. mays L.* como la primera planta domesticada en el Sur de México hace 10,000 años, aproximadamente. Sin embargo, Carrillo (2008) cita evidencias que indican que se pudo domesticar en Tehuacán, en el valle de Oaxaca o la Sierra de Tamaulipas bajo la forma de una pequeña mazorca con minúsculos granos (comparados con los actuales) que modificaron su tamaño debido a una mutación súbita en su genoma. Otras pruebas sugieren que la diversificación temprana, probablemente, ocurrió en tierras altas entre los actuales estados de Oaxaca y Jalisco (Bellon, 2006; Tenailon, 2011).

Durante la expansión y diversificación del cultivo, las diferentes razas adquirieron características genéticas y morfológicas particulares; lo que ha originado que botánicos, taxónomos y genetistas no hayan establecido si el maíz divergió del teocintle o viceversa (Silva, 2005; Vigouroux, 2008). En América Latina se han descrito cerca de 220 razas, de las cuales 64 se han identificado y descrito para México. De estas, 59 se pueden considerar nativas y a través de análisis moleculares a gran escala se ha confirmado que la diversidad de razas en Europa deriva de la complejidad de grupos de América (Vigouroux, 2008).

El maíz es un vegetal anemófilo en el que se favorece la fecundación cruzada. Se ha demostrado que el 95% de los óvulos son fecundados con polen de otra planta

y un 5%, por autofecundación (Silva, 2005). Esto se debe a que hojas superiores (8-10 hojas) interponen una barrera física entre la espiga y la mazorca (o jilote). Esta estrategia de la planta origina la difusión de nuevos alelos dentro de las poblaciones, lo cual aumenta la diversidad genética, y por lo tanto, una riqueza de caracteres que resultan interesantes para este cultivo en diferentes condiciones.

El polen es producido en las anteras de la espiga en la parte superior de la planta. Cuando estas maduran, emerge la borla de filamentos y el polen se libera desde una abertura en la punta de la antera. La producción de polen es prolífica, una borla de tamaño medio produce aproximadamente 25 millones de granos de polen (Aylor, 2003), cuyo tamaño, que es uno de los más grandes de la familia de las gramíneas— por lo general de 70 a 100 micras de diámetro— y forma, que va de esférica a ovoide, limitan su capacidad de dispersión en comparación con otros miembros de la familia Poaceae.

El polen únicamente es emitido durante el ciclo solar diurno, inmediatamente al amanecer. La pérdida de agua y humedad ocasionan la apertura de la antera por donde el polen se libera a la atmósfera, principalmente durante periodos de ambiente seco (que duran entre cinco y ocho días) y durante la mitad de la mañana hasta el mediodía. Pero la cantidad de polen en el aire disminuye rápidamente con la altura y la distancia (Aylor, 2003).

Las características de los granos de polen que son arrastrados por los movimientos del viento cambian significativamente conforme avanza el día (Chamecki, 2011) dado que el viento y las condiciones atmosféricas afectan su movimiento y longevidad en el ambiente (Baltazar, *et. al* 2005). Su viabilidad puede ser de pocos minutos u horas y la mayoría de los granos pueden dispersarse de manera óptima de 100 a 1000 metros (Reyes, 1990; Jugenheimer, 1990).

En general, un grano fresco se considera viable pero su aptitud disminuye a medida que pierde agua (Chamecki, 2011). Una vez que se desprende de las anteras, pierde viabilidad entre una y 24 horas. Estudios controlados han demostrado que en la atmósfera esta característica disminuye rápidamente a elevadas temperaturas y baja humedad relativa (HR). Luna *et al.* (2001) informaron que polen expuesto en un campo ambiental (20-25°C y 60-80% HR) la perdió por completo en dos horas.

En la liberación del polen se presentan tres pasos fundamentales: 1) el proceso de floración durante el cual ocurren la polinización (antesis) y la formación de un poro en la antera; 2) la vibración mecánica de la antera ocasionada por el viento, lo que origina la salida de los granos de la antera, y 3) el desprendimiento del polen y el cual puede ser arrastrado de inmediato o sedimentarse temporalmente en una

parte de la planta (generalmente una hoja) hasta que un viento fuerte lo transporte (Turrent, 2009).

Los procesos de arrastre y dispersión se rigen por las propiedades físicas de los granos (forma, tamaño y superficie) ya que éstas determinan su respuesta al movimiento turbulento. También, el contenido inicial de humedad en el polen, cuando es arrastrado por un viento turbulento, y la tasa de deshidratación durante la exposición a las condiciones atmosféricas son importantes en la distancia de transporte y en la probabilidad de fecundación entre plantas diferentes.

El polen de maíz puede viajar hasta 180 kilómetros a lo largo de la atmósfera superior. En algunas días continúa hasta el período en que la atmósfera se vuelve inestable (Aylor, 2003) por lo cual, los niveles de turbulencia afectan el transporte ascendente de polen (Van Hout, 2008).

En modelos donde se ha establecido una fuente de polen en un área de 12 km², los granos se dispersaron hasta 79 km (0.005 granos de polen/ m²) (Ricroch, 2009). En pocos kilómetros cercanos a la fuente (menos de cinco), la tasa de fecundación cruzada es de 0.05%, si el receptor de maíz no está castrado, y de 0.25%, si está emasculado. Además de que se presenta competencia con polen de plantas regionales. A cinco kilómetros de la fuente, la viabilidad del polen es de 30% (Ricroch, 2009).

Aunque el polen seco es transportado más lejos de la fuente no es eficaz para la polinización cruzada (Chamecki, 2011). Aunado a esto existen diversos factores que influyen en la tasa de fertilización. Por ejemplo, la viabilidad y longevidad del grano de polen; la fertilidad o esterilidad del grano; la sincronización de la floración entre la planta donadora y la receptora; la dirección y velocidad del viento; las condiciones ambientales; el tamaño, la forma y la orientación tanto del cultivo origen como del cultivo receptor de polen; la distancia, la topografía y la vegetación existente entre los dos campos de cultivo (Sanvido, 2008).

Por ello, al evaluar la dispersión del polen deben considerarse las condiciones locales, tales como la topografía y el clima (precipitación, velocidad y dirección del viento).

Para entender el movimiento de polen a través del aire, Sabban (2006) propone un análisis de trayectoria para investigar los episodios específicos de dispersión de polen por medio de la aplicación del modelo HYSPLIT (HYbrid Single-Particle Lagrangian Integrated Trajectory), el cual analiza las condiciones meteorológicas y el transporte de masas a largas distancias.

Presencia en México y a nivel mundial de los organismos genéticamente modificados

Los cultivos genéticamente modificados (GM) tienen dos objetivos principales: aumentar la producción de los cultivos (con cultivos resistentes a herbicidas o a plagas de insectos y virus) y mejorar la calidad del producto (por ejemplo, incrementar el contenido de fibra o disminuir el contenido de grasas) (Kleppin, 2011).

Desde 1996 que se comercializaron por primera vez, los agricultores en todo el mundo han aumentado de manera constante cada año sus plantaciones en un 10% y su superficie a nivel mundial alcanzó aproximadamente nueve millones de hectáreas en 2012 con un crecimiento del 11% con respecto a al año anterior (James, 2012). De los 28 principales países productores de cultivos GM, 18 de ellos producen cultivos biotecnológicos con 50 mil hectáreas o más. Los cinco primeros son Estados Unidos, Brasil, Argentina, Canadá e India. México ocupó el lugar número 16 en 2012 (James, 2012).

El cultivo más importante transformado con genes *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) es el maíz, con una superficie global de 39 millones de hectáreas en 2010 (Meissle, 2011) y aumentó un 9% en 2011. Ocupó el tercer lugar de las plantaciones más grandes después de las de algodón y canola GM.

La Unión Europea sembró las primeras variedades de maíz GM (Sanvido, 2006; Richoch, 2009) y actualmente, a nivel mundial, presenta dos variantes genéticas: la tolerancia a herbicida y la resistencia a insectos. Variedades de este maíz, como MON810, Bt11 y 1507, han sido modificadas a través de la inserción del gen del *Bacillus thuringiensis* (Bt), una bacteria que produce una proteína insecticida (δ -endotoxina) que controla las plagas de insectos lepidópteros como *Ostrinia nubilalis* (el barrenador europeo de maíz).

También se han diseñado otras variedades para producir proteínas de importancia farmacéutica o industrial y se ha buscado mejorar la calidad de la semilla de maíz GM al modificar, por ejemplo, el contenido de aminoácidos o reduciendo los niveles de ácido fitico (Aylor, 2003).

En el planeta se desarrollan, aproximadamente, 89 millones de hectáreas que contienen un gen que proporciona tolerancia a un determinado herbicida; 26 millones, resistentes a insectos, y los plantíos con ambas propiedades (eventos apilados) alcanzaron una extensión de 37.3 millones de hectáreas (James, 2012).

Los eventos apilados se encuentran en el maíz en tres tipos de combinaciones: Bt/HT (resistencia a insecticida (Bt) y tolerancia a herbicida (HT)); Bt/Bt (dos tratamientos con resistencia a insectos), y Bt/Bt/HT (triple aglomeración con dos tipos de resistencia a insectos más una alta tolerancia a herbicida) (James, 2012).

Sudáfrica sembró un área de 2.43 millones de hectáreas de maíz GM entre 2011 y 2012. El 80.5% eran plantas solo con el gen Bt; el 16.2%, con tolerancia a herbicida, y el resto, con dos eventos apilados (James, 2012). Por su parte, el país estadounidense ha aumentado la superficie de las plantaciones de maíz Bt de 8% en 1997 a 76% en 2013. Este aumento puede deberse a la introducción comercial de variedades de maíz GM resistentes a diferentes especies de plagas (James, 2013).

En México, a partir de 1998 se impuso una acción moratoria sobre la siembra de maíz GM en el ambiente. Antes de ese año, pocas variedades de este cultivo fueron usadas bajo control en experimentos de campo a pequeña escala pero, bajo esas condiciones los granos de polen o semillas no fueron liberadas, probablemente porque no se aplicaron medidas de control (Ortiz, 2005).

En 2011, México plantó 175 mil hectáreas de algodón biotecnológico y 14 mil hectáreas de soya GM. El 95% del algodón era con eventos Bt/HT y el 55% con tolerancia a herbicida. La soya se sembró en los tres estados de la Península de Yucatán, Tamaulipas y Chiapas (James, 2013).

De acuerdo con la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados diversas variedades de maíz Bt fueron aprobadas en 2002 y 2003 para su comercialización en México (dirigidas a *Diabrotica spp* y

Lepidóptera) (Soleri, 2006). A partir de la entrada en vigor de la Ley de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados en el año 2005, se ha permitido la siembra de diversos cultivos una vez que se cumplan con los requisitos regulatorios; por ejemplo, en 2009 se aprobaron las pruebas experimentales de maíz GM en campo y durante 2010 y 2011 se sembró maíz con rasgos apilados y con tolerancia a herbicida en Sonora, Sinaloa, Tamaulipas, Chihuahua y Coahuila (James, 2012).

Nuestro país cultiva más de siete millones de hectáreas de maíz pero en 2012 importó alrededor de 10 millones de toneladas de los cuales 87.9% provino de Estados Unidos y el resto, de Sudáfrica y Brasil. El Departamento de Agricultura de Estados Unidos estima que el gobierno mexicano importe 10.5 millones de toneladas de maíz para el periodo de 2013-2014 (ASERCA, 2013).

Muestreo y detección de maíz GM en México

A finales del 2000, investigadores de la unión Zapoteco-Chinanteca (UZACHI) y de la Universidad de California pusieron en marcha un programa para documentar la ausencia de marcadores transgénicos en variedades tradicionales de maíz en la Sierra de Juárez, Oaxaca. Esto con el objetivo de abrir un mercado para “maíz libre de transgénicos”; sin embargo, durante la creación de los protocolos experimentales algunas muestras de maíz convencional dieron resultados

positivos para el promotor del virus del mosaico de la coliflor P35S (Ezcurra, 2001).

El primer periodo de introducción en México de maíz GM, el cual se produjo en Estados Unidos, fue de 1997 a 2002. Este maíz fue internado por programas gubernamentales asistenciales en áreas de alta marginalidad, y en algún momento se pudo haber utilizado como semillas y si algunas plantas crecieron, probablemente no se adaptaron a los agrosistemas del país lo que pudo originar una alta dispersión geográfica de ADN transgénico en baja frecuencia dentro de las poblaciones de maíz nativo (Turrent, 2009), pero hasta la fecha se carece de datos que corroboren esto.

Desde la primera detección de maíz GM en variedades tradicionales de maíz de Oaxaca se han realizado varios estudios de monitoreo para detectar la ausencia o presencia de transgenes en cultivos convencionales, los cuales han presentado inconvenientes, principalmente metodológicos y, en algunas ocasiones, han sido contradictorios entre sí (Tabla 1).

Tabla 1. Muestreo de maíz GM en México

Autor	Fuente de ADN	Resultado	Observaciones al estudio	Metodología empleada
Quist & Chapela, 2001	Semillas	Presencia de transgenes en variedades de maíz de localidades de Oaxaca	Interpretación errónea al inferir que los eventos de introgresión eran comunes. No son claros los métodos de muestreo, el tamaño ni la ubicación geográfica de la muestra original	PCR punto final. PCR inversa. Prueba de Southern Blot
Ezcurra <i>et. al.</i> 2001	Semillas	Presencia del promotor 35S en maíz de Oaxaca y Puebla	El trabajo no fue arbitrado por pares. Los autores indican que los resultados no son concluyentes	PCR punto final
Ortiz <i>et.al.</i> 2005	Semillas	Ausencia de maíz GM en variedades de maíz nativo de Oaxaca	Tamaño de muestra insuficiente para descartar presencia de transgenes	PCR punto final
Serratos <i>et.al.</i> 2005	Semillas	Presencia de proteínas transgénicas en semillas del Distrito Federal	La prueba de Elisa que utilizaron no provee información sobre las secuencias de ADN aunque, sí detectan proteínas Cry expresadas	Prueba de Elisa

Autor	Fuente de ADN	Resultado	Observaciones al estudio	Metodología empleada
Piñeyro-Nelson <i>et al.</i> (2009)	Semillas y hojas	Presencia de transgenes en bajas frecuencias dentro de muestras colectadas en diferentes años en Puebla y Oaxaca	Sugieren la reintroducción de transgenes en frecuencias bajas	PCR punto final y análisis de Southern Blot
Ruíz, 2012	Semillas	Ausencia de transgenes en Michoacán	Pueden mejorar el sistema de muestreo porque existe la posibilidad de que los transgenes estén presentes en frecuencias muy bajas	PCR punto final y tiempo real
Castillo, 2012	Hoja	Hojas de maíz GM con el evento MON810 en Chihuahua	Implementan una validación de metodología para la cuantificación de un evento transgénico específico en hojas de maíz	PCR tiempo real
Gutiérrez, 2012	Hoja	Hojas de maíz GM con el evento MON810 en Chihuahua	Certifican la técnica de PCR digital para la cuantificación de material genéticamente modificado	PCR digital

Es muy importante establecer protocolos óptimos de muestreo, métodos de análisis en laboratorio y modelos estadísticos (probabilidad) para detectar eventos de modificación genética con altos niveles de confianza (Rimachi, 2011) y para estandarizar los métodos de detección (Hofman, 2010).

Actualmente los métodos que se han utilizado en México para el monitoreo de transgenes se realizan con semillas (Tabla 1) (Cleveland *et. al.*, 2005; Ezcurra *et. al.*, 2001; Gutierrez, 2012; Ortiz -García *et. al.*, 2005(a); Ortiz-García *et. al.*, 2005(b); Piñeyro-Nelson *et. al.*, 2009; Quist & Chapela, 2001; Rocha *et. al.*, 2008; Ruiz, 2012; Serratos-Hernández *et. al.*, 2007; van Heerwaarden *et. al.*, 2012) o con hojas (Castillo, 2012; Rocha *et. al.*, 2008) pero hasta ahora no han sido suficientes.

Van Heerwaarden *et. al.* (2012), con datos colectados por medio de referencias obtenidas de agricultores, simularon a través de un modelo computacional la dispersión y dinámica de semillas entre diferentes campos de cultivos para modelar la difusión, detección y persistencia de transgenes. Mencionan que para alcanzar un 95% de probabilidad de detección de un transgen se requiere muestrear homogéneamente alrededor de 750 mil mazorcas, lo que hace poco factible e improbable llevar a cabo un estudio de este tipo.

Además de establecer un método correcto de muestro en semillas para optimizar las técnicas de detección hay otros inconvenientes que se presentan como el obtener consentimiento de los agricultores para llevar a cabo la colecta de sus semillas u hojas y verificar el estado de humedad de las muestras para evitar la formación de hongos. A pesar de ello, las muestras de tejidos vegetales pueden proporcionar buena cantidad y calidad de ADN sin contaminantes, lo que ayuda a que el protocolo de extracción sea sencillo. Por otra parte, las desventajas como el alto costo económico en pruebas de laboratorio, un número considerable de personas para hacer el trabajo en campo y no contar con un sistema de muestreo no sistematizado (Holst-Jensen *et al.*, 2012), no se han podido superar.

Una alternativa para evitar algunos inconvenientes que se presentan en trabajos con semillas y hojas puede ser el monitoreo de secuencias transgénicas por medio de la captura de granos de polen.

En algunos reportes con modelos matemáticos se ha estimado la dispersión de polen utilizando parámetros físicos (Ripplinger, 2009). Pero para la colecta de los granos es importante la forma de captura, con el fin de obtener un buen análisis en la extracción de ADN. Se han recolectado manualmente al mover las anteras y dejándolos caer en un recipiente que se encuentra cerca de la planta (Wang, 2009) o encerrando las anteras con bolsas de papel (Querci, 2009).

El monitoreo de transgenes se ha realizado en Europa con granos de polen (Folloni *et al.*, 2012; Hofmann *et al.*, 2009) utilizando captadores PMF/Sigma-2, los cuales con el filtro de masa de polen que poseen retienen partículas mayores a 10 micras y presentan alta eficiencia en el número de granos retenidos (Hofmann, 2005).

Hofmann (2010) atrapó más de 100 mil granos durante, aproximadamente, 27 días y Folloni (2012), de cinco a seis mil granos en un periodo de 21 días. En los dos trabajos se empleó un *buffer* de extracción y para la detección del evento MON 810 y MON 89034, la técnica de PCR.

Los granos de polen son un buen material para medir la diversidad genética y estudiar filogenia entre las diferentes razas de maíz (Cervantes *et al.*, 2001).

Conseguir suficientes granos de polen y poder realizar la extracción de DNA a partir de ellos, sin inhibir la técnica de PCR, representan dos grandes desafíos (Chen, 2008).

Debido a que en México no se han desarrollado estudios previos para realizar la detección de transgenes en maíz a través de la captura y análisis de granos de polen, en el presente trabajo se plantearon diferentes objetivos para hacer el primer monitoreo de este tipo.

Objetivos

Objetivo general

- Implementar una nueva metodología y un protocolo de detección de transgenes a través de granos de polen de maíz que permita un monitoreo más eficiente y sistematizado de secuencias transgénicas en sitios de liberación al ambiente de maíz genéticamente modificado.

Objetivos Particulares

- Evaluar la eficacia de trampas volumétricas tipo Hirst (marca Burkard).
- Diseñar y evaluar un protocolo específico de extracción de ADN a partir de muestras de polen capturadas con las trampas volumétricas.
- Analizar muestras de granos de polen con un nuevo protocolo para detectar la presencia de transgenes mediante la técnica de PCR en tiempo real.
- Detectar y analizar las ventajas y desventajas de implementar el protocolo de detección a partir de granos de polen.

Justificación

Vigilar la presencia de transgenes en cultivos de maíz mexicano se hizo imprescindible a partir de 2005 con la publicación de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Hasta ahora, los estudios han estimado su presencia mediante muestreos de semillas y hojas.

El análisis a partir de estos tejidos presenta algunas desventajas en comparación con el realizado a partir de polen. Por ejemplo, las etapas de acondicionamiento o tratamiento de las semillas y hojas son muy laboriosas y susceptibles a contaminación cruzada debido a su manipulación. Por otro lado el muestreo de semillas y tejido foliar en campo tiene un alto costo económico ya que es necesaria la participación de numerosas personas en campo, tener las precauciones necesarias para el traslado adecuado y correcto almacenamiento de las muestras.

Además, el tamaño adecuado de estas para garantizar un muestreo representativo es la etapa del diseño experimental que más se ha cuestionado en las investigaciones previas, sobre todo en los casos donde se espera que los transgenes se encuentren en baja frecuencia.

Estudios similares, hechos en semillas, han arrojado resultados contrastantes entre sí para determinar si existen o no transgenes en variedades nativas del cereal más importante de México. Por ello se hace necesario un sondeo diferente que proporcione ventajas que no se tienen con el análisis de granos. El polen, parte móvil de la planta a través del viento, puede ofrecer atributos diferentes para conocer cómo es el tránsito de secuencias modificadas genéticamente en poblaciones nativas.

Las trampas tipo Hirst capturan el polen a través de la succión del aire y hasta ahora se utilizan para estudios de aerobiología (Belmonte, 2003; Calderón *et al.*, 2002). Este tipo de captador es ideal para partículas mayores a 10 micras cuando la velocidad del viento es baja (Frenz, 1999) y no se había implementado para el monitoreo de polen de maíz transgénico. Capturar y analizar estos granos nos permitiría tener mayor información sobre la dispersión en el ambiente de transgenes entre diferentes cultivos de maíz.

El desplazamiento del polen a diferentes distancias de la planta y la polinización cruzada entre distintos cultivos de maíz permite el intercambio de material genético entre individuos cercanos en el campo de siembra, por ello importante implementar un método de captura de polen (los captadores aerobiológicos parecen ser una buena opción) y un protocolo de laboratorio para la detección de secuencias transgénicas en los granos de polen.

El muestreo a partir de polen de maíz ofrece una mayor cobertura de los ambientes circundantes por lo cual aumenta la probabilidad de detectar la presencia o ausencia de OGM en una población. Esto debido a que en una pequeña cantidad de muestra la diversidad de los individuos de los campos vecinos es más representativa en comparación con el muestreo de otros tejidos no móviles (semilla y tejido foliar), donde los individuos muestreados solo reflejan la diversidad de un sitio delimitado.

Así, con la cuantificación de ADN procedente de polen de maíz y la técnica de amplificación PCR para identificar al componente transgénico se reduce la posibilidad de no detección del material genéticamente modificado.

Hipótesis

Con la captura de granos de polen, que se desplazan en el ambiente dentro de un campo o entre diferentes cultivos, es posible implementar un nuevo sistema de monitoreo de transgenes en plantaciones de maíz para reducir los inconvenientes que se presentan con semillas y hojas.

Método

Descripción de las muestras

Primer ensayo de colecta de granos de polen

Se realizó este primer ensayo para obtener polen y probar el protocolo que generalmente se utiliza para la extracción de ADN, el de CTAB.

En tiras de acetato de cinco centímetros de ancho por dos centímetros de longitud, se aplicó una capa de la mezcla hexano-vaselina y se dejó secar durante toda la noche.

El 24 de agosto de 2010 se colectaron granos de polen en estas cintas en el límite de los municipios de Ecatepec y Tlanepantla, en el Estado de México. De forma manual se movió la espiga para que el polen se dispersara y cayera en cada cinta.

La colecta se realizó cerca del medio día y se hizo a diferentes distancias de la espiga: cinco, 30, y 60 centímetros. A cada muestra se le asignó una clave de identificación (tabla 2) y se guardaron a temperatura ambiente dentro de una caja de cartón.

Tabla 2. Muestras de la primera colecta de polen

Clave de identificación	Distancia de la fuente emisora (centímetros)	Número de muestras
M1	5 cm	5
M2	30 cm	5
M3	60 cm	5

Segundo ensayo de colecta de granos de polen

Los propósitos del segundo ensayo fueron tres: el primero, establecer las condiciones adecuadas para el rompimiento de la cubierta exterior (o exina) mediante el uso del equipo *Fast-Prep*; el segundo, elegir el adherente adecuado para capturar el mayor número de granos sin que interfiriera o inhibiera la reacción de qPCR, y el tercero, probar la eficiencia del muestreador volumétrico.

Establecimiento de las condiciones del equipo Fast-Prep

Las espigas se colectaron el 4 de julio de 2011 en el municipio de Santiago Juchitán, Oaxaca, y se guardaron en bolsas de papel con un pequeño paquete de absorbente de humedad, para evitar la formación de hongos. Estas espigas se utilizaron para determinar las condiciones del equipo *Fast-Prep* y para analizar los adherentes (experimento que se describe más adelante).

Se tomaron tres de esas espigas y se sumergieron en tubos que contenían, aproximadamente, 40 ml de nonidet P40 estéril al 0.1%.

Se agitaron vigorosamente con vórtex por dos minutos para liberar los granos de polen. Se dejaron reposar de cinco a 10 minutos. Transcurrido ese lapso, con una pipeta Pasteur, se tomaron los granos de polen que se encontraban en el fondo y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.

Estos tubos se agitaron en el equipo *Fast-Prep* a diferentes velocidades y diferentes tiempos. El ensayo se inició con dos periodos de 45 segundos a 6 m/s cada uno y con un lapso de dos minutos de enfriamiento en hielo entre cada periodo.

Se analizaron al microscopio las suspensiones de granos de polen para determinar el tiempo y la velocidad óptimos en las que se obtuvo el mayor porcentaje de granos rotos liberados dentro de la suspensión. Para esto se preparó una solución *stock* de granos de polen al 0.1% y se hizo un conteo de la cantidad en una cámara de Neubauer.

Elección del adherente

Para elegir el adherente adecuado se evaluó la cantidad de polen capturado en dos tipos de adhesivos (experimento en el túnel de viento) y se determinó si alguno interfería con las pruebas de qPCR.

a) Experimento en el túnel de viento

El objetivo de este ensayo fue determinar cuál era el mejor adherente para capturar granos de polen. Las opciones fueron dos mezclas: a) silicona con tetracloruro de carbono y b) vaselina con hexano.

A 24 trozos de cinta de celofán (Melinex) se le aplicó una capa de silicona y a otras 24, una de vaselina. Posteriormente se colocaron ocho trozos (cuatro de cada adherente) a la salida de un túnel del viento, que contenía en su interior espigas de maíz con granos de polen.

Se hizo pasar una corriente de aire a 4 m/s durante dos minutos. Posteriormente se retiraron las cintas y se cambiaron por otras, intercambiando los lugares. Finalmente las bandas con granos de polen impactados fueron analizadas al microscopio y se contabilizó el número de granos de polen de maíz capturados en cuatro barridos, lo que dio un total de 96 resultados para cada pegamento.

b) Interferencia de los adherentes en qPCR

Para determinar si los adhesivos interferían en las pruebas de qPCR se utilizaron concentraciones conocidas de granos de polen.

Para ello, se cortaron 14 trozos de celofán Melinex de 48 mm de longitud (lo cual correspondería a un periodo de 24 horas de muestreo). Siete de ellos fueron cubiertos con una capa de vaselina con hexano (1:5) y los otros, con una capa de silicona disuelta en tetracloruro de carbono y se dejaron secar hasta que se evaporó el disolvente y solo quedó la capa adherente inerte.

Posteriormente se preparó una nueva suspensión de granos de polen de maíz. Se cuantificó en cámara de Neubauer y se hicieron diluciones seriadas. Se tomó la cantidad exacta necesaria para obtener las siguientes concentraciones de granos de polen: 10 000, 5000, 1000, 500, 100, 50 y 0 (tabla 3) y se depositaron sobre los trozos de cinta.

Tabla 3. Concentración de granos de polen utilizados en cada muestra. La señalización s* corresponde al uso de silicona como adherente y v*, a vaselina

Muestra	# de granos de polen en cinta	# de granos de polen en 50 µl de suspensión (tomados luego del rompimiento)	Muestra	# de granos de polen en cinta	# de granos de polen en 50 µl de suspensión (tomados luego del rompimiento)
1s*	10 000	2000	1v*	10 000	2000
2s	5000	1000	2v	5000	1000
3s	1000	200	3v	1000	200
4s	500	100	4v	500	100

Muestra	# de granos de polen en cinta	# de granos de polen en 50 µl de suspensión (tomados luego del rompimiento)	Muestra	# de granos de polen en cinta	# de granos de polen en 50 µl de suspensión (tomados luego del rompimiento)
5s	100	20	5v	100	20
6s	50	10	6v	50	10
7s	0	0	7v	0	0

Se dejaron secar al aire y posteriormente se hizo la extracción de ADN.

Tipo de muestreador

Para proyectar la forma en cómo se establecerían las trampas Burkard en campo y cómo se colectaría el polen, se simuló la presencia de granos en el ambiente a través de un mini túnel de viento. Para esto se colocaron espigas con granos de polen dentro de un mini túnel de viento, que mide 90 centímetros de largo por 15 de ancho y 15 de altura, y está unido a una cámara de 35 cm de alto, por 24 cm de largo y 24 cm de ancho donde se acopla un humidificador para control de humedad, y fuera de él se encuentra el ventilador eléctrico. Posee compartimentos para la introducción y colocación de muestras (Figura 1).



Figura 1. Mini túnel de viento con espigas de maíz construido en el taller mecánico del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM

Para la colecta de los granos de polen se utilizaron trampas tipo Burkard que están diseñadas para obtener muestras de partículas que se encuentran en el aire, como esporas de hongos y polen, de forma continúa durante periodos de hasta siete días.

El muestreador succiona 10 litros de aire por minuto y puede funcionar 24 horas durante los 365 días del año con energía eléctrica (figura 2). El tamaño del orificio por donde entra el aire es de dos por 14 milímetros.

Tiene integrado un tambor (figura 3) que gira en dirección con las manecillas del reloj, sobre el cual se adhiere una cinta de celofán (Melinex) que está cubierta con una delgada capa de adherente (vaselina con hexano o silicona con tetracloruro de carbono) donde se impactan las partículas colectadas del aire. Esta cinta se

remueve cada semana y se corta en trozos de 48 mm los cuales corresponden a 24 horas de muestreo (Figura 4).



Figura 2. Trampa de granos de polen Hirst



Figura 3. Tambor interno de la trampa Hirst de granos de polen



Figura 4. Trozo de cinta de celofán Melinex

Cuando las espigas estaban dentro del mini túnel se les aplicó una corriente constante de aire de 4 m/s para que el polen se impactara en la cinta Melinex, la cual estaba en la trampa volumétrica y cubierta con una delgada capa de la mezcla de vaselina con hexano. De esta trampa Hirst se obtuvieron siete muestras por triplicado cada una con la clave correspondiente TV1 a TV7 (figura 5).

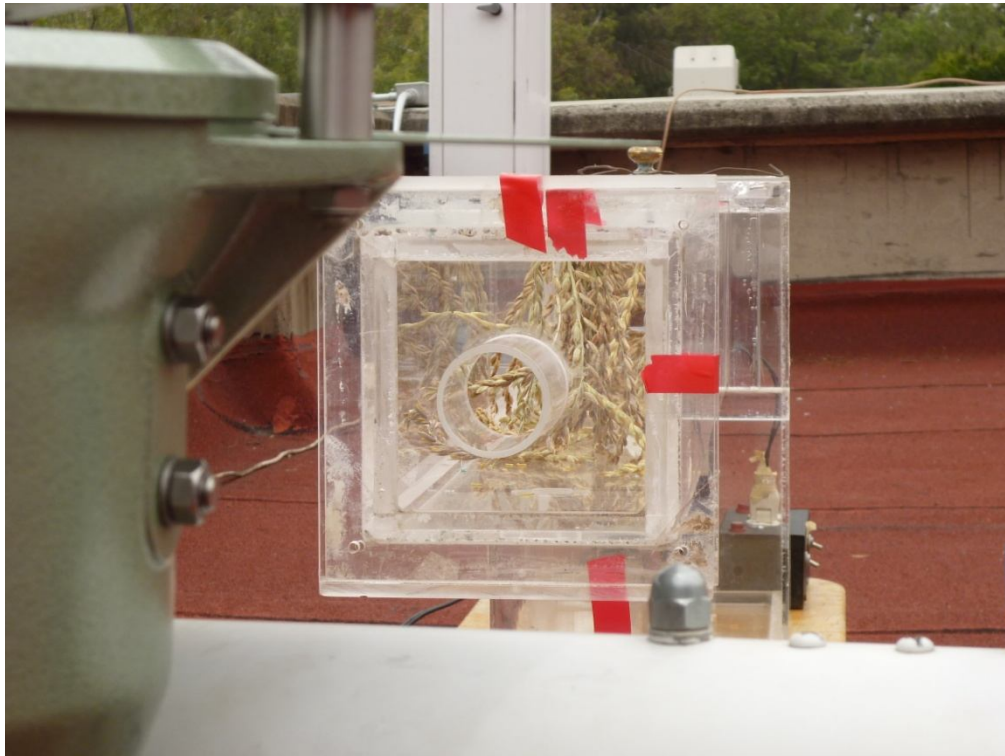


Figura 5. Mini túnel de viento que emite una corriente de aire que arrastra los granos de polen y son capturados en la trampa de esporas Hirst y en el muestreador pasivo

Tercer ensayo de colecta de granos de polen

Previo a la realización del estudio en los campos con maíz GM, se decidió hacer un ensayo piloto en sembradíos de maíz con el fin de ajustar detalles en la metodología. Para ello se eligieron cuatro sitios cerca del Distrito Federal y a cada uno se le asignó una clave (DF1-DF4). Dos de ellos se encontraban cercanos al Ajusco, en el Pueblo de la Magdalena Petlacalco; uno en el poblado de Topilejo, y

el último en el de Parres (figura 6). Estos se eligieron porque forman parte del suelo de conservación del Distrito Federal y en ellos se siembra maíz nativo.



Figura 6. Ubicación de las trampas Hirst cerca de la Ciudad de México

En cada lugar se georeferenciaron todos los campos de maíz situados en un radio de tres kilómetros de las trampas de esporas. En los sitios nombrados como Ajusco 1 (DF1) y Ajusco 2 (DF2) los campos de maíz se encontraban, aproximadamente, a una distancia de 10 metros de la trampa de esporas; la que se estableció en Parres (DF3) se colocó en la azotea del centro de salud del poblado y el cultivo de maíz estaba aproximadamente a tres kilómetros de ella y en Topilejo se encontraba en el techo de una casa que estaba rodeada por varios cultivos de maíz (DF4).

Las trampas de esporas Hirst se dejaron funcionando del 16 de agosto al 21 de septiembre de 2011 haciendo el cambio de la cinta, que tenía el adherente silicona con tetracloruro de carbono, cada dos semanas con el fin de aumentar la cantidad de granos de polen capturados porque la época de floración del maíz estaba en la parte final cuando se colocaron las trampas.

Posteriormente se recogieron las cintas y se cortaron en siete fragmentos, cada uno correspondiente a 48 horas de muestreo. Se obtuvieron 14 muestras para de cada trampa (Tabla 4).

Tabla 4. Muestras del monitoreo de granos de polen en el Distrito Federal

Clave de identificación	Lugar	Número de tiras con 7 muestras cada una
DF1	Ajusco 1	2
DF2	Ajusco 2	2
DF3	Topilejo	2
DF4	Parres	2

Cuarto ensayo de colecta de granos de polen

Después de probar las dos formas anteriores de captura de polen de maíz, fue necesario hacer un ensayo en un campo experimental con siembra de maíz GM para poder establecer un método de monitoreo adecuado, el cual es parte importante de las actividades del Instituto Nacional de Ecología y Cambio

Climático y que realiza el Laboratorio de Biología Molecular para el Análisis de Organismos Genéticamente Modificados.

En un predio cerca del poblado de Culiacancito, Sinaloa, se montó el experimento en un sitio con permiso de siembra de maíz GM.

El campo fue dividido en parcelas (figura 7), en las cuales se sembró alternadamente maíz genéticamente modificado y maíz sin modificación genética. Dentro de este campo se colocaron ocho trampas Burkard, cada una a diferente distancia de las parcelas de maíz GM (figura 8) y la cinta Melinex estaba cubierta con una capa de silicona con tetracloruro de carbono.

Los eventos que se sembraron en las parcelas fueron MON89034 Y MON88017.

El maíz GM con el evento MON89034 proporciona resistencia a lepidópteros gracias a los genes cry2Ab2 y cry1A.105 que expresan toxinas las cuales afectan el intestino medio de los insectos (James, 2013).

El evento MON88017 confiere tolerancia al herbicida glifosato y a insectos coleópteros. Los genes introducidos son el CP4 EPSPS (aroA: CP4) y el cry3Bb1; el primero disminuye la afinidad de unión para el glifosato y confiere una mayor resistencia al herbicida y el gen cry3Bb1 expresa la toxina que ataca

particularmente al gusano del maíz porque daña el revestimiento de su intestino medio (James, 2013).



Figura 7. Distribución de las parcelas en el campo de maíz. Los recuadros rojos corresponden a parcelas donde se había sembrado maíz GM y maíz no modificado genéticamente. Las figuras de colores indican las parcelas que se sembraron con maíz GM. Los rectángulos amarillos indican plantas separadas a 0.5 metros una de otra y los verdes señalan que las plantas se encontraban a 0.75 metros de distancia entre sí. Entre parcelas que tenían el mismo tamaño de surco había una distancia de cuatro metros y la longitud entre los dos grupos diferentes fue de 10 metros. Los polígonos que no son de estos colores representan parcelas de maíz no modificado genéticamente.



Figura 8. Asignación de las ocho trampas de esporas Burkard (estrellas rojas) en campo

Se estimó que la floración del maíz GM ocurriría alrededor del 30 de abril del 2012, por ello se colocaron las trampas de esporas entre los días 23 y 28 de abril.

Las trampas se colocaron a una altura de entre dos y tres metros del suelo orientadas al centro de la parcela GM y con el cabezal fijo y sin veleta para maximizar las posibilidades de capturar granos de polen de maíz GM.

Se realizaron varios análisis a través del modelo HYSPLIT (Drexler, Rolph, 2012), el cual es un sistema de computo de trayectorias de aire y permite simular la

dispersión y deposición de partículas con base en las condiciones meteorológicas de la zona de interés, para ubicar las trampas de partículas de acuerdo a las trayectorias que podrían tomar los granos de polen debido al viento.

Se utilizaron los datos climatológicos del 21 de abril al 15 de mayo de 2011 (referencias del año anterior para estimar las fechas floración) en un horario entre las 12 y 18 horas (mayor liberación de polen) y así se pudo apreciar que las posibles trayectorias abarcaban todo el cuadrante, con una moderada predominancia hacia la dirección S-SE.

Con la ayuda de una rosa de vientos de la zona de estudio se corroboró que la ubicación de cada una de las trampas fuera la adecuada para la captación de polen de maíz GM.

Las cintas se mantuvieron en el colector dos semanas y se renovaron al finalizar este tiempo. Así se obtuvieron dos muestras en cada estación con un total de 16 (con su duplicado). A estas muestras se les asignaron las claves S1-S16 (tabla 5).

Tabla 5. Muestras en Sinaloa

Muestra	Semana de muestreo
S1a	Semana 1 y 2
S1b	Semana 1 y 2
S2a	Semana 1 y 2
S2b	Semana 1 y 2
S3a	Semana 1 y 2
S3b	Semana 1 y 2
S5a	Semana 1 y 2
S6a	Semana 1 y 2
S6b	Semana 1 y 2
S7a	Semana 1 y 2
S7b	Semana 1 y 2
S8a	Semana 1 y 2
S8b	Semana 1 y 2
S9a	Semana 3 y 4
S9b	Semana 3 y 4
S10a	Semana 3 y 4
S10b	Semana 3 y 4
S11a	Semana 3 y 4
S11b	Semana 3 y 4
S12a	Semana 3 y 4
S12b	Semana 3 y 4
S13a	Semana 3 y 4
S14a	Semana 3 y 4
S14b	Semana 3 y 4

Implementación y optimización del método de extracción de ADN a partir de granos de polen

Para la extracción de ADN a partir de granos de polen se realizó una búsqueda de protocolos y se encontró que en la mayoría de los trabajos se realizó a partir de semillas y hojas de maíz. Solo dos equipos la habían realizado con granos de polen: Folloni *et. al.*, (2012) y Hofmann *et. al.*, (2009).

Por ello, se decidió probar el protocolo de bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) (Somma, 2006) y el propuesto por Calderón, 2002.

Método de extracción 1: Ruptura de pared celular con CTAB

Este primer método de extracción consistió en los siguientes pasos*:

1. Cortar en cuadros la cinta Melinex que contenía polen, colocarla en un tubo Eppendorf y agregar 0.8 ml de buffer CTAB y 10 μ L de proteinasa K.
2. Incubar durante 60 min con movimientos suaves continuos a 60° C (grados centígrados).
3. Retirar de la incubadora, esperar de 4 a 5 min y añadir 0.045 ml de fenol/cloroformo/ isoamílico (25:24:1). Mover suavemente para mezclar durante 5 min.

4. Centrifugar a 10 000 rpm durante 5 min.
5. Transferir la capa acuosa a un tubo Eppendorf, añadir 0.045 ml de cloroformo / isoamílico (24:1) y mover lentamente durante 5 min.
6. Centrifugar a 10 000 rpm durante 5 min.
7. Transferir la capa acuosa superior y añadir 50 µl de acetato de amonio 10M.
8. Agregar 50 µl de disolución de acetato de amonio 10 M y mezclar invirtiendo varias veces.
9. Agregar 500 µl de isopropanol el cual se encontraba a -20°C.
10. Dejar que el ADN se precipitara a -20°C durante 2 horas.
11. Centrifugar a 10 500 rpm a 8°C por 5 min.
12. Eliminar el sobrenadante.
13. Agregar 1ml de etanol al 70% que se encontraba a -20°C.
14. Mezclar en vórtex hasta observar que el botón de ADN se desprendía del microtubo.
15. Dejar reposar durante 5 min a temperatura ambiente.
16. Centrifugar a 10 000 rpm a 8°C por 5 min.
17. Eliminar el sobrenadante y tener cuidado de que no se desechara el botón de ADN.
18. Colocar los microtubos en el evaporador y secar el ADN a 500 atm a 55°C por 10 min.
19. Revisar que el botón de ADN se encontrara completamente seco; en caso de que no fuera así se repitió el paso 18 durante el tiempo necesario (5 a 10 min).

20. Resuspender el ADN en 20 μ l de H₂O ultrapura.

*Nota: La preparación de las soluciones se detalla en el Anexo II.

Método de extracción 2: Ruptura de pared celular con CTAB modificado

Se realizó una modificación al protocolo anterior que consistió en lavar previamente la cinta de acetato con tritón 0.1% hasta observar que los granos de polen se desprendieron completamente. Posteriormente, estos se molieron con nitrógeno líquido. Una vez triturados, se colocaron en tubos Eppendorf y se prosiguió con el paso número uno del Método de extracción 1.

Método de extracción 3: Ruptura de pared celular con equipo *Fast-Prep*

Antes de probar el protocolo para el equipo *Fast-Prep* se prepararon los reactivos que se utilizarían (Anexo II) y al hacer la extracción de ADN se utilizaron las condiciones para el equipo que ya se habían establecido previamente en el segundo ensayo de captura de polen.

Los pasos del tercer método de extracción fueron los que se enumeran a continuación:

1. Colocar las cintas en tubos cónicos de 2 ml, agregar 250 μ l de nonidet al 0.1% y 0.2 g de perlas de vidrio estériles.
2. Agitar los granos en el equipo *Fast-Prep* bajo las siguientes condiciones: velocidad de 6m/s y durante un periodo de tiempo de 45 s. Completar 3 ciclos (con cuidado de colocar los tubos en hielo 2 min entre cada ciclo para evitar sobrecalentamiento).
3. Una vez terminados los 3 ciclos, mezclar suavemente cada tubo y retirar la cinta.
4. Tomar 50 μ l del sobrenadante y se transferir a un tubo Eppendorf de 0.5 ml.
5. Agregar al tubo Eppendorf 50 μ l de la mezcla de fenol-cloroformo (1:1).
6. Agitar en vórtex durante 10 s.
7. Centrifugar durante 15 min a 14 000 rpm a 4°C.
8. Tomar el sobrenadante (fase acuosa), con cuidado para no perturbar la interfase, y transferirlo a un tubo que contenía 60 μ l de isopropanol frío, 4 μ l de acetato de amonio 6M y 1 μ l (20 μ g) de glicógeno.
9. Invertir 3 veces los tubos e incubarlos a -20°C durante toda la noche.
10. Centrifugar los tubos durante 10 minutos a 14 000 rpm a 4°C.
11. Descartar el sobrenadante con una micropipeta teniendo cuidado de no tocar el botón de ADN.
12. Adicionar a cada tubo 100 μ l de etanol al 70% frío (el cual estuvo almacenado previamente a -20°C).
13. Invertir los tubos 3 veces de forma sutil y centrifugar 5 min a 14 000 rpm a 4°C.

14. Remover y descartar el sobrenadante utilizando una micropipeta.
15. Secar los tubos con la tapa abierta en campana de flujo laminar.
16. Resuspender el botón en 50 µl de agua mili Q estéril y almacenar en el congelador hasta su uso.

Método de extracción 4: Modificación del Método de ruptura de pared celular con *Fast-Prep*.

Se decidió hacer modificaciones al método de extracción 3 para optimizar la obtención de ADN del polen. Una de ellas consistió en alterar la cantidad de algunos reactivos (nonidet P40, mezcla fenol-cloroformo, isopropanol, acetato de amonio 6M, glicógeno) y la otra, en el tiempo de centrifugación. Por lo que se estableció este protocolo como el definitivo, ya que con este método la cantidad inicial de polen que se necesita se reduce a 10 granos, a diferencia del anterior donde se requieren al menos 50. Esto permite obtener una amplificación positiva cuando la cantidad de granos de polen sea poca. A continuación se enuncian las etapas que fueron modificadas:

Paso 3. Centrifugar a 10 000 rpm y después retirar la cinta de celofán.

Paso 5. Agregar 200 µl de la mezcla fenol-cloroformo (1:1).

Paso 6. Agitar los tubos en el vórtex durante 30 s.

Paso 8. El tubo Eppendorf de donde se transfirió el sobrenadante contenía 900 μ l de isopropanol al 100%, 56 μ l de acetato de amonio a 6M y 3.5 μ l de glicógeno a una concentración de 20 mg/ml.

Paso 10. Centrifugar los tubos durante 15 min a 14 000 rpm a 4°C.

Paso 16. El botón de ADN se resuspenden en 10 μ l de agua estéril.

Evaluación de la eficiencia de extracción de ADN y pureza por espectrofotometría y evaluación de su integridad por electroforesis

Para verificar que en las muestras M1, M2 y M3 de la primera colecta se había logrado extraer ADN se hizo cuantificación con espectrofotometría y posteriormente se realizó un gel de electroforesis para evaluar su integridad.

Los tubos que contenían la solución de ADN se colocaron durante 15 minutos en baño seco a 55°C y se agitó la solución invirtiendo el tubo y con la ayuda de una micropipeta.

Para la cuantificación de la concentración de ADN se utilizó el biofotómetro. La solución de ADN correspondía a 5 μ l y el diluyente, a 95 μ l. La medición se repitió varias veces hasta obtener una lectura constante en cada una de las muestras.

Cuantificación de un gen endógeno de maíz mediante qPCR

Las muestras TV1-TV7, por triplicado, se emplearon para la amplificación de PCR tiempo real. Cada una correspondía a 24 horas de funcionamiento de la trampa de esporas Hirst. Además se preparó una curva estándar con ADN de maíz que se extrajo del material de referencia certificado del evento TC1507 al 10% (Fluka/BioChemika). Se hicieron diluciones seriadas a partir de 20ng de manera que se agregaran por reacción 100ng, 50ng, 10ng y 1ng de ADN.

Para la prueba de qPCR se utilizaron 5 µl de suspensión de ADN.

Las concentraciones (en número de granos de polen) que se obtuvieron de la extracción de ADN se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Concentración de granos de polen (s* indica silicona y v** se refiere a vaselina)

Muestra	# de granos de polen en cinta	# de granos de polen en 50 µl de suspensión (tomados después del rompimiento)	Muestra	# de granos de polen en cinta	# de granos de polen en 50 µl de suspensión (tomados después del rompimiento)
TV1s*	10 000	2000	TV1v**	10 000	2000
TV2s	5000	1000	TV2v	5000	1000
TV3s	1000	200	TV3v	1000	200
TV4s	500	100	TV4v	500	100
TV5s	100	20	TV5v	100	20
TV6s	50	10	TV6v	50	10
TV7s	0	0	TV7v	0	0

Para corroborar que sí se había logrado capturar granos de polen de maíz se realizó la prueba de PCR en tiempo real para el gen endógeno (ADH). En ella se utilizaron 5 microlitros de la última suspensión de agua estéril que contenía el botón de ADN. Los iniciadores y las sondas se muestran en la tabla 7. La prueba se realizó en 40 ciclos a 95°C y durante 40 minutos.

En las muestras DF1-DF4 se analizó el gen endógeno HMG (tabla 8), para las muestras S1-S16, el gen ADH.

Las muestras se corrieron en un equipo ABI PRISM 7500 REAL TIME PCR SYSTEM sequence detection system (Applied Biosystems) con los reactivos y cantidades de la tabla 9 durante 50 ciclos. Dichas condiciones fueron para los dos genes y los eventos transgénicos.

A modo de resumen, en las muestras TV1-TV7 se analizó el gen ADH durante 50 ciclos en la PCR, en las DF1-DF4, el gen HMG por 40 ciclos y en las S1-S16, ADH en 50 ciclos. Para los casos en que después de 40 ciclos de amplificación no se observaban resultados en las gráficas, se decidió modificar el programa del termociclador a 50 ciclos para poder observar posibles amplificaciones tardías (aquellas que ocurren después de 40 ciclos).

Tabla 7. Iniciadores y sondas que se utilizaron en PCR tiempo real para la detección del gen ADH

Primer forward	Adhl primer F	CCA GCC TCA TGG CCA AAG
Primer reverse	Adhl primer R	CCT TCT TGG CGG CTT ATC TG
Sonda	Adhl probe	6FAM CTT AGG GGC AGA CTC CCG TGT TCC CT MGBNFQ

Tabla 8. Primers y sonda para amplificar el gen endógeno HMG (High mobilitygroup) de maíz

	Dirección 5' - 3'
MaiJ-F2	TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA
HMG-Rev	GCTACATAGGGAGCCTTGTCTT
HMG-probe_TAMRA	5'-FAM-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-TAMRA-3'

Tabla 9. Reactivos de PCR

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para una reacción de 25 μ l
Agua ultrapura	--	--	6.5 μ l
TaqMan Universal PCR Master Mix	2X	1X	12.5 μ l
Iniciador reverse	10 μ M	150 nM	0.375 μ l
Iniciador forward	10 μ M	150 nM	0.375 μ l
Sonda	5 μ M	50 nM	0.25 μ l
ADN molde		200 ng	5 μ l
Volumen total	--	--	25 μ l

Amplificación por PCR con albumina sérica bovina (BSH)

Con las muestras S1-S16 se realizó una nueva qPCR con 400ng/ μ l de albumina sérica bovina (BSH), que se agregó a la mezcla de reacción para mejorar la amplificación porque existían agentes que inhibían la PCR (Kreader, 1995).

Detección evento-específico para MON88017 y MON89034 mediante qPCR

Además del gen endógeno ADH, en las muestras S1-S16 se examinaron los eventos GM de maíz (MON88034 y MON89017) con los *primers* y las sondas adecuadas (Tabla 10) y con las condiciones de la tabla 9.

Tabla 10. Iniciadores y sonda de los eventos de maíz GM: MON89034 y MON89017

		MON89034		MON88017
Primer forward	MON89034 primer 2	CGG TAT CTA TAA TAC GGT GGT TTT TAA A	MON88017AR	TCC GGA GTT GAC CAT CCA
Primer reverse	MON89034 primer1	TTC TCC ATA TTG ACC ATC ATA CTC ATT	MON88017AF	GAG CAG GAC CTG CAG AAG CT
sonda	MON89034 probe	6FAM ATC CCC GGA ATT TAT GTT MGBNFQ	MON88017AP	6 FAM TCCCGCCTTCAGTTT AAACAGAGTCTTGT MGBNFQ

Resultados

Primer ensayo de colecta de granos de polen

Para corroborar que se había extraído material genético de las muestras M1-M3 con el método de extracción 1 se hizo la cuantificación en el espectrofotómetro. Sin embargo, para las tres muestras se obtuvo una baja concentración por lo que se decidió no realizar la electroforesis en gel de agarosa ni la PCR.

Con base en los resultados obtenidos, se decidió extraer nuevamente el ADN de las muestras M1, M2 y M3 pero esta vez se utilizó el método de extracción 2. También se hizo la cuantificación. Los datos indicaron una mayor cantidad de DNA con respecto a la primera extracción, por ello se realizó la electroforesis en un gel de agarosa.

En el primer gel (figura 9) se comparó una muestra control (sin tratamiento previo con tritón al 0.1%) con las muestras M1, M2 y M3 (tabla 11). El volumen que se obtuvo de la extracción de DNA de cada muestra se dividió en dos volúmenes iguales y cada réplica se colocó en un carril.

Tabla 11. Condiciones de las muestras analizadas en el primer gel de electroforesis

Carril	Muestra	Condiciones
1	Marcador molecular	
2 y 3	Muestra control	Corresponde a granos de polen colectada directamente de la planta el 21 de septiembre de 2011 por lo que no se dio tratamiento previo con tritón al 0.1%.
4 y 5	M1	El polen se colectó en tira de acetato con mezcla de vaselina-hexano. La colecta fue cerca de la planta
6 y 7	M2	La colecta se hizo a 30 centímetros de la planta en tira de acetato con vaselina y hexano.
8 y 9	M3	Muestra tomada a 60 centímetros de la planta con una antera adherida.

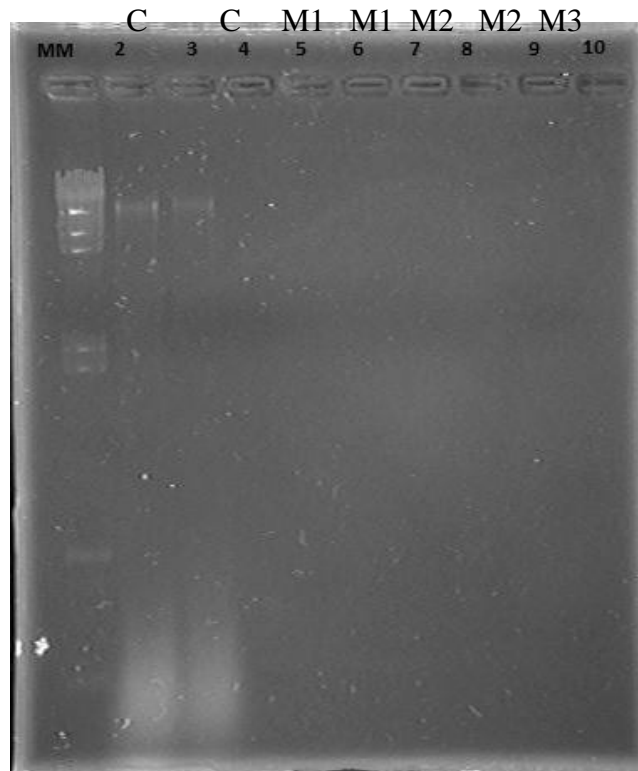


Figura 9. Gel de agarosa (1%) para la técnica electroforesis de ADN de granos de polen. La tinción se hizo en BrEt (0.5µg/ml). El carril 1 (MM) corresponde al marcador molecular; los carriles 2 y 3, a la muestra control (C); el carril 4 y 5, a la muestra M1; el 6 y 7, a la muestra M2 y su réplica, y los carriles 8 y 9, a M3. El carril 10 quedó vacío.

En la figura 9 se aprecian bandas nítidas en los carriles correspondientes a la muestra control. Se utilizó como control porque se capturó un mes después de las muestras que estaban en cintas y tenía un día de haber sido colectada cuando se hizo el ensayo. Por esta razón se consideró que era más fácil que el ADN se observara y sirviera como referencia. Además, la cantidad de granos de polen eran mayores a la colectada en las cintas.

Del carril cuatro al nueve no se observa ninguna banda. Estos corresponden a las muestras M1, M2 y M3.

Segundo ensayo de colecta de granos de polen

Establecimiento de las condiciones del equipo Fast-Prep

Con el análisis de las suspensiones resultantes de los granos de polen se estableció el porcentaje de granos rotos (figura 10 y figura 11)

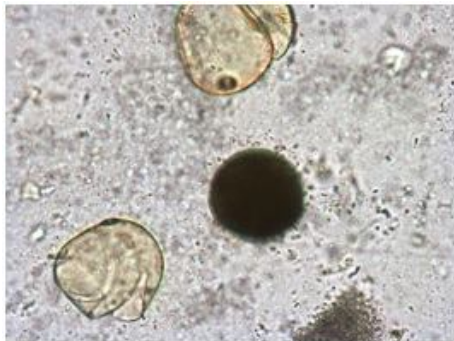


Figura 10. Microfotografía de granos de polen de maíz sometidos a un ciclo de agitación en el equipo *Fast-Prep*. El punto oscuro del centro corresponde a un grano de polen entero y los otros dos granos están rotos



Figura 11. Microfotografía de granos de maíz sometidos a dos ciclos de ruptura en equipo *Fast-Prep*. Todos los granos están rotos

Los resultados de los periodos de ruptura se muestran en la tabla 12, donde se observa un porcentaje de granos de polen rotos cercano al 100% con tres ciclos; razón por la que todos los experimentos donde sea necesario hacer un rompimiento de granos de polen en *Fast-Prep* incluirán tres periodos de agitación a 6m/s durante 45 segundos con un lapso de dos minutos de enfriamiento en hielo entre cada ciclo.

Tabla 12. Porcentaje de granos de polen rotos en equipo *Fast-Prep* de acuerdo a periodos de rompimiento (6 m/s durante 45 segundos)

Periodos de rompimiento o agitación	% granos de polen rotos
1	70 %
2	92 %
3	99 %

Elección del adherente

Para analizar las diferencias entre los dos tipos de adhesivos, se extrajo el ADN de las cintas con el método de extracción 3 y se realizó la PCR para el gen endógeno ADH (figura 12).

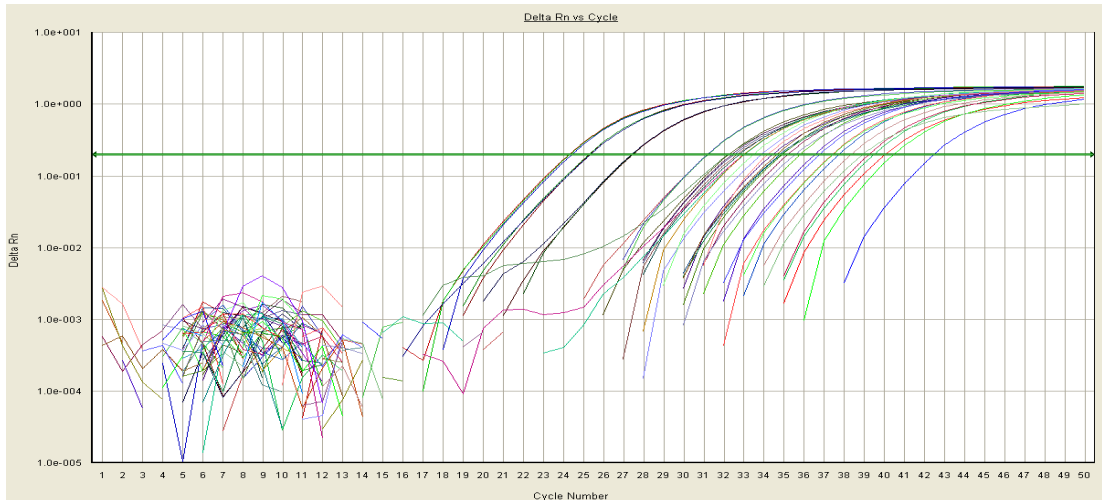


Figura 12. Curva de amplificación qPCR de la curva estándar y de todas las muestras problema

La concentración mínima de granos de polen a la cual se obtuvo amplificación por qPCR las muestras con soporte de silicona corresponde a 50 granos de polen en cinta y un grano en la mezcla de qPCR (figura 13).

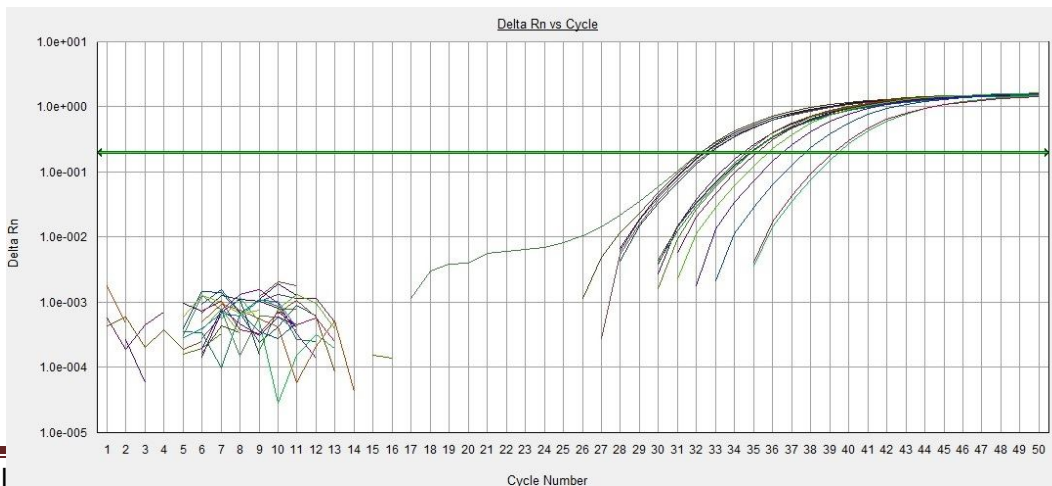


Figura 13. Curva de amplificación de qPCR para las muestras de silicona

Para las muestras con soporte de vaselina el límite mínimo corresponde a 100 granos de polen en cinta y 2 granos en la mezcla de qPCR (figura 14).

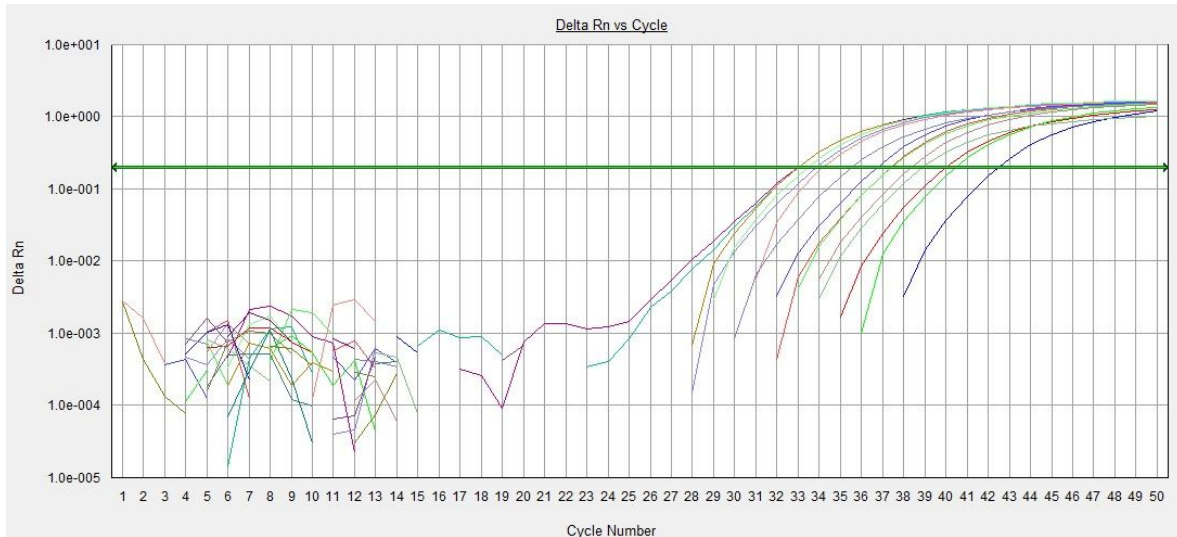


Figura 14. Curva de amplificación de qPCR para las muestras con soporte de vaselina

Tercer ensayo de colecta de granos de polen

Se realizó la extracción de ADN de las muestras DF1, DF2, DF3 y DF4 por el método de extracción 3 y se desarrolló la prueba de qPCR. Los resultados se observan en la figura 15.



Figura 15. Curva de amplificación de qPCR para todas las muestras de granos de polen capturados por las trampas de esporas Hirst situadas cerca de diferentes campos de maíz

Esta figura solo muestra la amplificación de la curva estándar, aunque las réplicas de las muestras DF1 y DF2 parecen evidenciar un crecimiento exponencial cerca del último ciclo (número 40), por ello se decidió cambiar el método de extracción de ADN y las condiciones de la qPCR. Además, la observación al microscopio de algunas muestras reveló que la mayoría de los trozos de cinta contenían menos de 10 granos de polen cada uno.

Con base en estos resultados se realizó otro aislamiento de ADN con el método de extracción 4. Con las modificaciones realizadas al protocolo de rompimiento celular químico se pudo reducir la cantidad necesaria de granos de polen capturados en la cinta para tener una amplificación positiva. Con el método anterior se requerían 50 granos y con el nuevo bastaron 10, aproximadamente.

La prueba de qPCR se desarrolló con las mismas muestras de los campos cercanos a la Ciudad de México y bajo condiciones similares, con la salvedad de que el número de ciclos se incrementó a 50.

En la figura 16, además de la curva estándar hubo amplificaciones de cuatro muestras (sitios cercanos al Ajusco) lo que nos indica que las modificaciones del método fueron correctas.

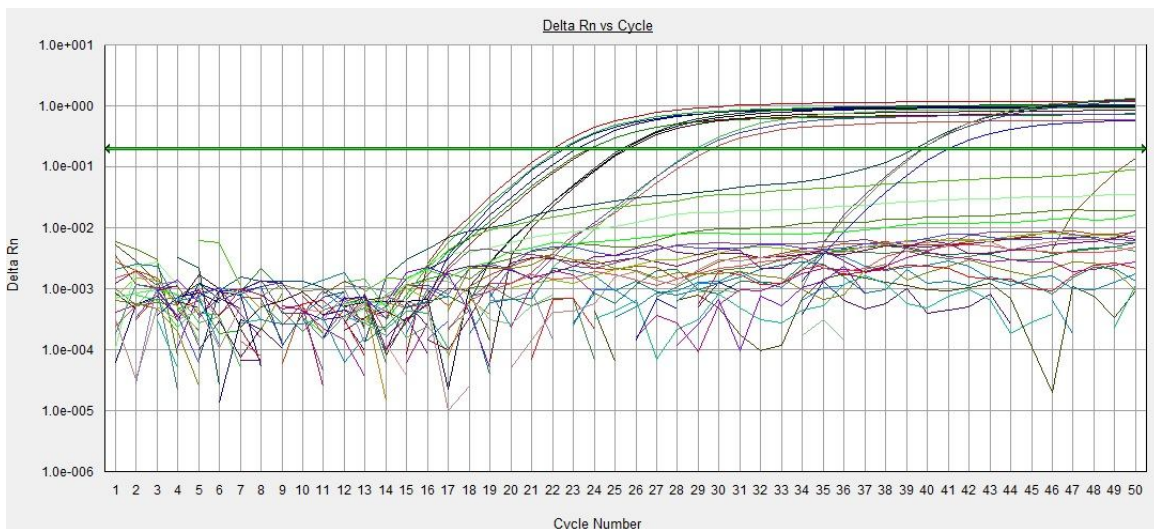


Figura 16. Curva de amplificación de qPCR de todas las muestras de granos de polen capturados por las trampas de esporas ubicadas cerca de campos de maíz con el método de extracción 4

Con base en este método modificado de extracción se analizaron las muestras colectadas en campos de maíz del DF y se realizó la extracción de ADN a la cinta que estuvo una semana capturando polen. En esta prueba ninguna muestra amplificó.



Figura 17. Gráfica que se obtuvo de la PCR de todas las muestras en la cinta de la segunda semana en cultivos del Distrito Federal

Durante la segunda semana de prueba, el polen se capturó en una nueva cinta. Se detectó el gen HMG (figura 17). En la prueba de PCR amplificaron dos de las cuatro muestras: DF1 y su réplica, y DF2 también con su réplica (figura 18).

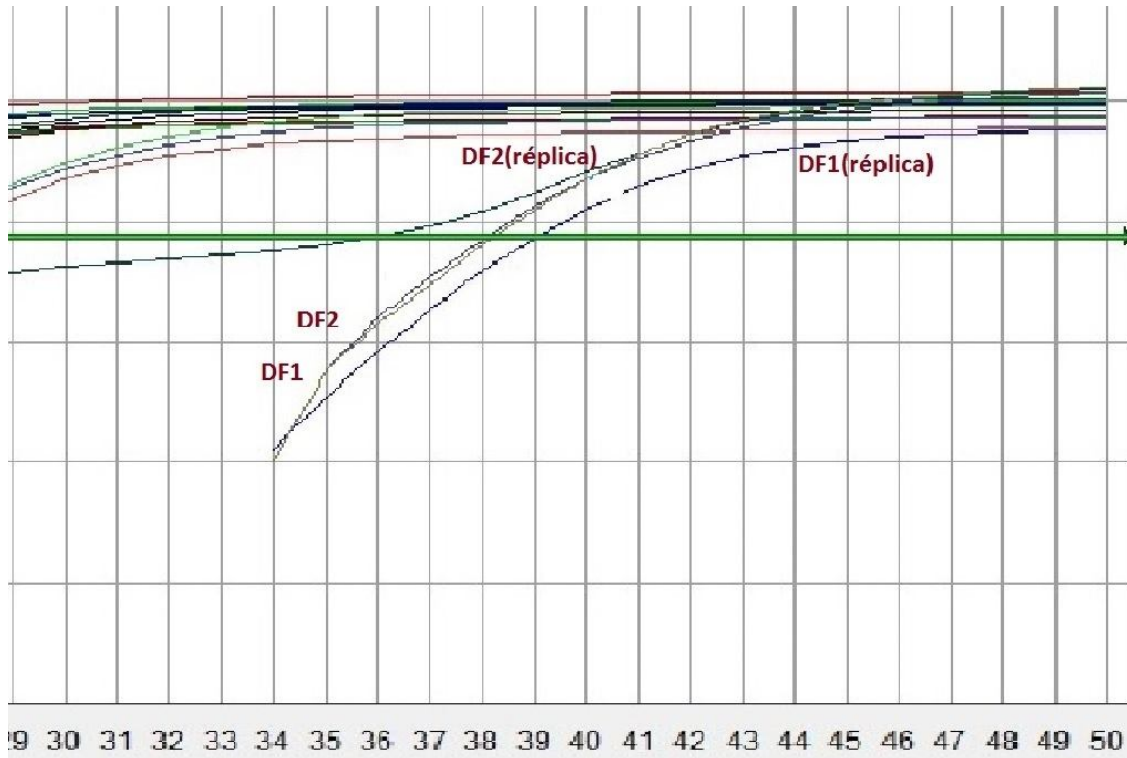


Figura 18. Amplificación de la figura 17 donde se observan las curvas de las muestras que amplificaron (DF1 y DF2 con sus réplicas)

Estos resultados se obtuvieron con un umbral de 0.074. La pendiente fue igual a -3.32 y R^2 , a 0.992. La concentración aproximada que se obtuvo en cada una de las muestras se encuentra en la tabla 13.

Tabla 13. Concentración de ADN de muestras del Distrito Federal

Muestra	Concentración de ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
DF1	5.22 e 004
DF1 (réplica)	2.30 e 003
DF2	4.84 e 004
DF2(réplica)	2.68 e 004

Cuarto ensayo de colecta de granos de polen

En las muestras de los campos de Sinaloa (S1-S16) se hizo una cuantificación con el espectrofotómetro de la cantidad de ADN y se analizó su relación con la distancia a la que se encontraban las trampas del campo de los cultivos modificados genéticamente (tabla 14).

Tabla 14. Relación entre la concentración de ADN y la distancia del campo de maíz GM

Número de trampa	Muestra	Semana de muestreo	Distancia (metros)	Concentración (ng/ul)
2	S1a	Semana 1 y 2	856 m	0.0737
2	S1b	Semana 1 y 2	856	1.66
1	S2a	Semana 1 y 2	57	0.970
1	S2b	Semana 1 y 2	57	0.632
3	S3a	Semana 1 y 2	145	0.07
3	S3b	Semana 1 y 2	145	0.175
5	S5a	Semana 1 y 2	185	0.0716
6	S6a	Semana 1 y 2	380	1.64
6	S6b	Semana 1 y 2	380	1.64
7	S7a	Semana 1 y 2	355	0.294
7	S7b	Semana 1 y 2	355	0.0547
8	S8a	Semana 1 y 2	104	0.171
8	S8b	Semana 1 y 2	104	0.978
2	S9a	Semana 3 y 4	856	0.0923
2	S9b	Semana 3 y 4	856	0.740
1	S10a	Semana 3 y 4	57	0.667
1	S10b	Semana 3 y 4	57	0.216
3	S11a	Semana 3 y 4	145	0.0420
3	S11b	Semana 3 y 4	145	1.22
4	S12a	Semana 3 y 4	160	0.809
4	S12b	Semana 3 y 4	160	0.443
5	S13a	Semana 3 y 4	185	0.0781
6	S14a	Semana 3 y 4	380	0.0294
6	S14b	Semana 3 y 4	380	0.00363
	**Amarillo indica a las trampas que estaban más cerca al cultivo de maíz GM			

Después de asegurarse que se tenía ADN, se hicieron las pruebas de PCR para tener la certeza que se trataba de material genético de maíz.

Amplificación por PCR con albumina sérica bovina (BSH)

En la colecta de las muestras S1-S16 (de cuatro semanas), se detectó el gen endógeno en 10 de las 16 muestras, lo cual demostraba que se había capturado polen de maíz en las trampas Hirst. Se decidió probar si la adición de albúmina sérica bovina (BSH) podría mejorar la amplificación por PCR porque se consideró que pudieran haber agentes que inhibían la PCR (ácidos húmicos presentes en el suelo y que son arrastrados por el viento) (figura 19).



Figura 19. qPCR de la mezcla de reacción que contenía 40 ng de albúmina. La pendiente que se obtuvo fue de -3.89, r2 igual a 0.989614 y el umbral de 0.1393

Se detectó el gen endógeno en 13 de las 16 muestras y las concentraciones aumentaron hasta 10 mil veces (tabla 15).

Tabla 15. Concentración de las muestras con y sin albúmina

Sin albúmina	Concentración de ADH (ng/μl)	Con albúmina	concentración de ADH (ng/μl)
S1a	1.20E-06	S1a	7.37E-02
S1b	4.75E-06	S1b	1.66E-00
S2a	7.10E-05	S2a	9.70E-01
S2b	1.47E-04	S2b	6.32E-01
S3a	1.44E-06	S3a	7.00E-02
S3b	2.49E-05	S3b	1.75E-01
		S5a	7.16E-02
S6a	3.23E-04	S6a	1.64E+00
S6b	3.42E-04	S6b	1.64E+00
S7a	9.99E-06	S7a	2.94E-01
S7b	1.49E-07	S7b	5.47E-02
S8a	7.07E-06	S8a	1.71E-01
S8b	5.56E-05	S8b	9.78E-01
S9a	4.61E-07	S9a	9.23E-02
S9b	5.63E-04	S9b	7.40E-01
S10a	1.03E-03	S10a	6.67E-01
S10b	6.65E-07	S10b	2.16E-01
S11a	2.26E-06	S11a	4.20E-02
S11b	2.60E-05	S11b	1.22E+00
S12a	1.48E-05	S12a	8.09E-01
S12b	1.70E-05	S12b	4.43E-01
		S13a	7.81E-02
		S14a	2.94E-02
		S14b	3.63E-03

Al comparar los resultados que se obtuvieron entre los dos procesos, se observó que la albúmina ayudó a la mejorar la técnica (tabla 16) porque cuando no se agregó las concentraciones fueron menores (tabla 17). En la figura 20 se puede ver la gráfica de esta prueba.

Tabla 16. Cantidad con albúmina

Muestra	Cantidad (%) de ADN de maíz con respecto al total	Número de replicas de las que se obtuvo ADN
S1	0.065	2 de 4
S2	0.853	4 de 4
S3	0.06	4 de 4
S5	38.89	1 de 4
S6	1.94	4 de 4
S7	0.202	4 de 4
S8	0.8895	4 de 4
S9	0.40515	4 de 4
S10	0.692	4 de 4
S11	0.812	4 de 4
S12	0.6265	4 de 4
S13	5.73	2 de 4
S14	0.015795	4 de 4
S15	0.579	2 de 4

Tabla 17. Cantidad en PCR sin albúmina en la mezcla. Se cuantificó menor cantidad porque algunas muestras no amplificaron

Muestra	Cantidad (%) de ADN de maíz con respecto al total	Número de replicas de las que se obtuvo ADN
S1	2.8393E-06	4 de 4
S2	0.00010244	4 de 4
S3	0.00001037	3 de 4
S6	0.0003875	4 de 4
S7	6.5163E-06	3 de 4
S8	4.1843E-05	3 de 4
S9	0.00020785	4 de 4
S10	0.00118319	4 de 4
S11	5.6817E-05	3 de 4
S12	0.00021903	3 de 4

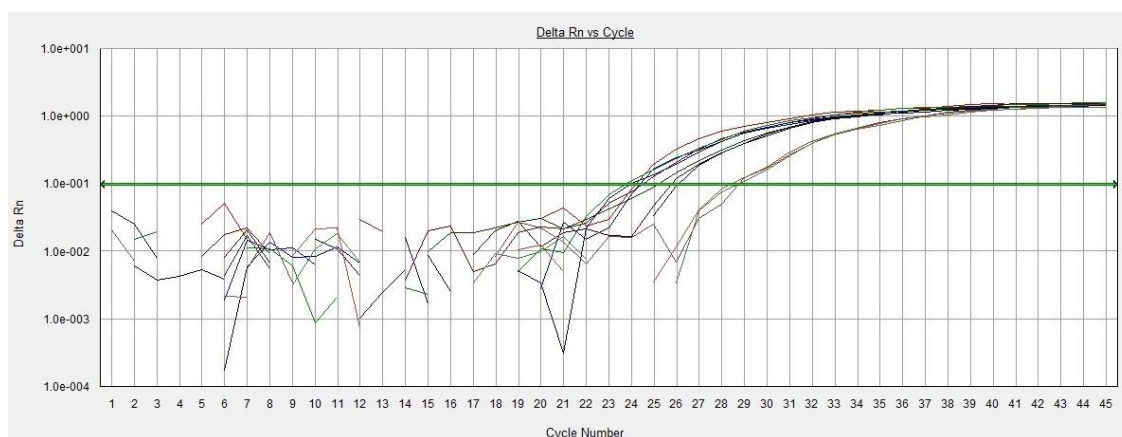


Figura 20. Gráfica de PCR de las muestras donde no se utilizó albúmina

Detección evento-específico para MON88017 y MON89034 mediante qPCR.

Cuando se compararon los resultados, y se verificó que con albúmina en la solución mejoraba la cantidad obtenida, se resolvió agregar esta sustancia a las siguientes soluciones de PCR para identificar el evento modificado genéticamente. Primero se hizo el análisis para el evento MON88017 (figura 21 y figura 22) para detectar su presencia por ello no se realizó una curva estándar y solo se logró amplificar el material de referencia.

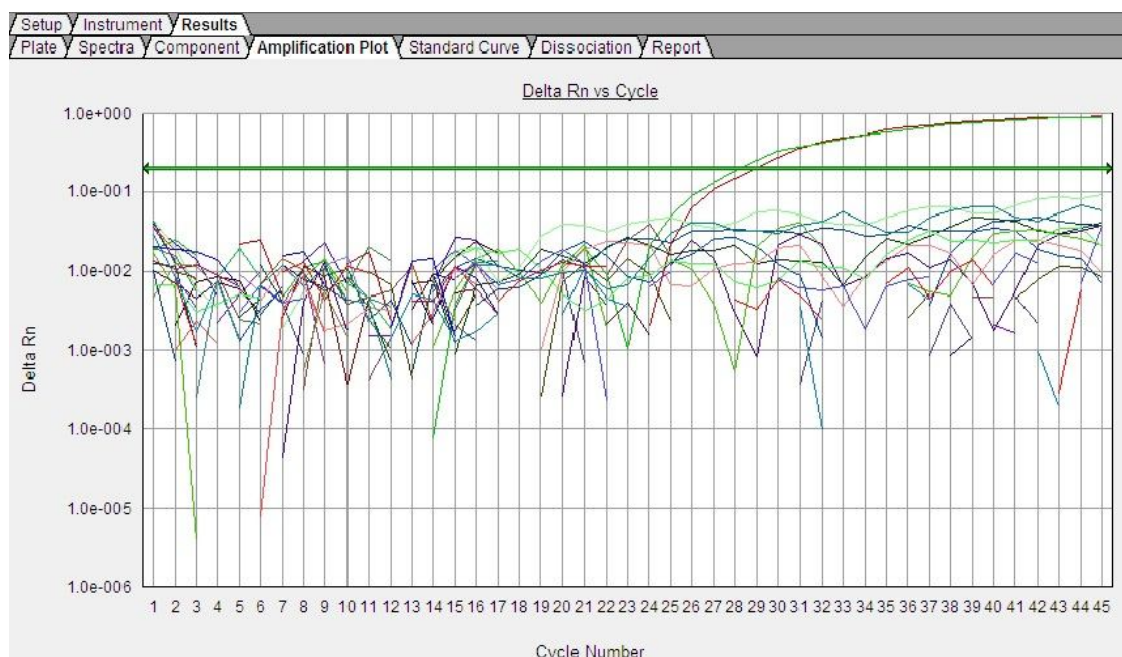


Figura 21. Detección del evento MON88017 en todas las muestras de polen



Figura 22. Amplificación de las curvas exponenciales (línea roja y línea verde) del material de referencia, pero no se pudo detectar presencia o ausencia del evento en ninguna muestra. El umbral fue de 0.0426

Al no obtener un resultado positivo, se decidió hacer la detección del evento (MON89034) (figura 23 y figura 24) esperando que este evento si fuera uno de los que se sembraron pero igual que en el caso anterior, solo amplificó el material de referencia.

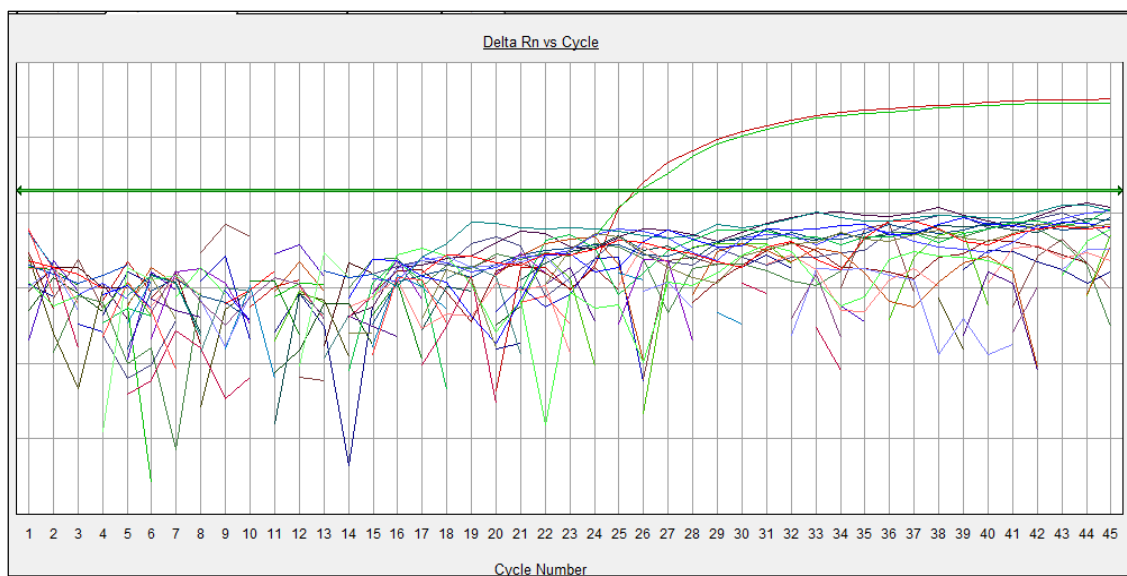


Figura 23. Grafica de qPCR para la detección del evento transgénico MON89034 en todas las muestras de polen



Figura 24. La línea roja y la verde corresponden al material de referencia. No se detectó el evento MON89034. El umbral corresponde a 0.2

No se detectó ningún evento transgénico de los que se buscaron.

Discusión

La Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios ha autorizado, a partir del 2005 ahora 132 solicitudes para la comercialización e importación de OGM a partir del 2005. Los cultivos principales son de maíz y algodón; los fenotipos de interés son en su mayoría con resistencia a insectos plaga y tolerancia a herbicidas (COFEPRIS, 2014), los cuales potencialmente pueden ingresar al proceso regulatorio para obtener permisos de liberación al ambiente.

Para un cultivo de suma importancia, como el maíz, es indispensable hacer una evaluación de los riesgos que se pueden presentar en la coexistencia entre campos de maíz convencional y maíz GM. Problemas como la dificultad de detección de DNA transgénico cuando su frecuencia es de 1% (Mercer y Wainwright, 2008) o el movimiento continuo del flujo génico entre los dos tipos de maíz a lo largo y ancho de la república (Turrent Fernández, 2009) podrían resolverse con el monitoreo de polen ya que hasta ahora solo se han hecho muestreos con semillas y hojas.

El mecanismo de dispersión de polen parece ser una opción adecuada para realizar un rastreo de transgenes entre cultivos de maíz GM y plantas de maíz convencional. Para esto, es indispensable implementar una metodología de

detección de secuencias transgénicas a partir de granos de polen dado que estos son la parte móvil de la planta y pueden proporcionar información sobre cómo y cuánto se "mueven" los transgenes (si los hubiera) entre diferentes cultivos. Por ello, una parte importante de este trabajo se enfocó en la captura de polen y la otra, en encontrar un método adecuado de extracción de ADN.

En el primer ensayo de colecta de granos de polen y la extracción con el primer método 1, las muestras M1, M2 y M3 reflejaron una baja concentración de ADN. Los cocientes A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} registrados en el espectrofotómetro fueron muy bajos lo que indicó que las muestras aún contenían proteínas, hidratos de carbono, péptidos, compuestos aromáticos y todo tipo de residuos (Kosem *et al.* 2008; James, 2012). Esta fue la causa de que se decidiera hacer modificaciones al método para obtener una mayor cantidad de ADN sin residuos.

En la figura 9 (resultado del método de extracción 2) se observa que la muestra control fue la única donde se pudo obtener ADN dado que esta porción contenía mayor cantidad de granos con respecto a las demás. Lo cual indica que el protocolo donde se usó el amortiguador de CTAB con un lavado previo de las muestras con Tritón X-100 al 10% ayuda a extraer ADN a partir de polen de maíz ya que el detergente disolvió algunas proteínas y así fue más fácil que se separara la molécula.

A pesar de que en el primer ensayo se logró obtener ADN, el objetivo principal del trabajo era establecer un sistema de captura de granos que se encontraran en el aire entre campos de maíz vecinos. Por ello, en el segundo ensayo de colecta de polen, se utilizaron trampas Hirst para capturar polen y se decidió realizar la extracción con el equipo *Fast-Prep*. La tabla 12 muestra la razón de por qué se eligieron tres periodos de agitación y las condiciones del equipo para hacer la extracción. Se eligió como adhesivo a la mezcla la silicona con tetracloruro de carbono porque el límite de detección fue de 50 granos de polen por cinta (figura 13). En cuanto al tipo de muestreador, se utilizaron trampas Hirst porque eran con las que se contaba en ese momento.

Generalmente, las trampas Hirst se utilizan en muestreos de Aerobiología para identificar, monitorear y detectar granos de polen en la atmósfera para estimar su distribución, concentración, impactos potenciales en la salud humana y determinar su potencial como bioindicadores de contaminación ambiental (Calderón, 2008; Belmonte, 2003). También se emplean para capturar, contar y reconocer esporas de hongos que afecten a diferentes cultivos (González, 2013).

Con las condiciones establecidas anteriormente, durante el tercer ensayo de colecta se examinaron las muestras DF1, DF2, DF3 y DF4, con el material de referencia certificado del evento TC1507 al 10%, y se observó que solo amplificaba la curva estándar (figura 15). Se hizo una nueva extracción de ADN

pero modificando ese protocolo para tener una amplificación positiva con 10 granos de polen. Las modificaciones consistieron en aumentar el volumen de mezcla fenol-cloroformo para precipitar las proteínas; isopropanol para ácidos nucleicos; acetato de amonio para, ADN, y glicógeno para favorecer la precipitación de toda la solución.

Las muestras DF1-DF4 de la segunda semana se sometieron a la prueba de qPCR (figura 17) y solo cuatro de ellas amplificaron para el gen HMG. Estos resultados muestran que la modificación del protocolo ayudó a la extracción de ADN; aunque no todas las muestras dieron un resultado positivo (figura 18) dado que las trampas se colocaron cuando la floración estaba en su parte final y esto contribuyó a que la cantidad de granos que se capturaron fuera poca. Las muestras positivas (tabla 11) corresponden a los sitios donde las trampas estaban a 10 metros de los campos de maíz y sobre una superficie de cinco metros de altura, aproximadamente, por lo cual el viento pudo favorecer la dispersión de los granos y en consecuencia, que se pegaran a la cinta con mayor facilidad.

Esto contrasta con las muestras DF3 y DF4 (figura 6): la DF3 se encontraba a una altura similar y los campos de maíz estaban lejos; pero en este caso, la dispersión no fue favorecida por el viento. En la muestra DF4 aunque el muestreador Hirst estaba rodeado por varios cultivos de maíz, no se capturó polen, posiblemente porque la etapa de floración estaba por concluir.

Hasta ahora ha sido un problema determinar las distancias de aislamiento entre cultivos de maíz no modificado y maíz GM. Sanvido (2008) propone un área de 20 metros para el silaje del maíz y 50 para el almacenamiento de los granos con el fin de evitar la fecundación cruzada en los bordes de los campos de maíz. Con el tercer ensayo de colecta se percibe que aunque la distancia es importante para el movimiento del polen, las condiciones topográficas y climáticas también influyen en la dispersión, por lo que el objetivo de Ryffel (2011) de cultivar plantas GM que produzcan polen "no funcional", para que estas puedan crecer sin riesgo de fertilización a otras, en este caso sería innecesario.

Este ensayo nos sirvió para hacer dos consideraciones: comprobar la efectividad del método de extracción 4 para establecerlo como el definitivo para el análisis de muestras posteriores y para estimar las condiciones meteorológicas y de ubicación para las trampas en otros campos de maíz.

El establecimiento de las trampas, en el cuarto ensayo de colecta, fue en diferentes direcciones y en tres de los cuatro lados del campo de maíz Bt con el fin de capturar el mayor número de granos (figura 8) según la dirección del viento. Se esperaba que entre más cercano estuviera el muestreador mayor cantidad de polen se atraparía, pero no fue así.

En la tabla 12 se puede observar la relación de la distancia con la concentración de polen que se cuantificó en cada muestra. Con la cuantificación de ADN procedente de polen de maíz y la técnica de amplificación PCR para identificar al componente transgénico se reduce la posibilidad de no detección del material genéticamente modificado.

Las muestras con mayor número de granos de polen se obtuvieron de las trampas 2 y 6 (durante la primera y segunda semana) las cuales se encontraban a 856 metros y 380 metros, respectivamente, y de la 3 (en la semanas 3 y 4) que estaba a 145 metros. Las trampas más cercanas al cultivo de maíz fueron 1 (57 metros), 3 (145 metros), 4 (160 metros) y 5 (185 metros) (figura 8). De todas, solo la muestra S11b correspondiente a la trampa 3, que estaba próxima al cultivo durante la tercera y cuarta semana, presentó una concentración alta de ADN (Tabla 13). Con estos resultados, se puede pensar que en este trabajo la dirección del viento tuvo un papel importante, por lo cual no se pudo corroborar lo establecido por Hofmann (2009) y Folloni (2012) quienes sugieren que la porción de polen capturado decrece con la distancia.

Con respecto a la trampa más cercana y con gran número de granos se puede decir que la dirección del viento tenía una ligera predominancia hacia la dirección S-SE y cuando los vientos dominantes van en esa dirección, se afecta a la fuente de emisión de polen a través por la presencia de vientos cruzados, que intervienen

en un rápido deterioro de la potencia de dispersión con respecto a la distancia de la fuente (Chamecki, 2011). Esto es importante dentro de la polinización entre cultivos de maíz GM y maíz convencional que se encuentren alejados entre sí. García, *et al.* (1998) y Luna *et al.* (2001) mencionan que una polinización efectiva puede ocurrir hasta 200 metros de distancia de la fuente emisora de polen y que a partir de 300 metros se puede detectar entrecruzamiento, pero mientras se controle el flujo de polen el nivel de riesgo es cercano a cero (Ripplinger, 2009).

El tiempo de captura también pudo influir en la colecta. Mientras que en los estudios de Europa, las trampas estuvieron entre 25 y 29 días (Hofmann, 2010) y de 21 a 39 días (Folloni, 2012) en el trabajo en Sinaloa solo permanecieron cuatro semanas (28 días) y cada cinta tenía la muestra de 14 días. Aunado a esto, la forma del campo, un polígono irregular (Figura 7), pudo interferir en la cantidad de polen colectado porque el perfil de la parcelas de maíz GM influyó en la distancia a la que llegaron los granos (Chamecki, 2011).

El tamaño de las parcelas experimentales pudo ser otro factor que influyó en la cantidad de granos capturados. A pesar de que el campo de cultivo era grande, las plantas de maíz GM estaban en pequeños bloques por lo tanto, la cantidad de polen GM era menor en comparación con la de polen proveniente de plantas no modificados genéticamente, lo cual disminuyó la probabilidad de atrapar algún grano con material GM.

El polen de maíz mide en promedio 90-100 μ de diámetro (Raynor *et. al.*, 1972) lo que origina que la cantidad de polen en la atmósfera se reduzca rápidamente ya que la dispersión de esta partícula depende del movimiento del aire y al ser un grano pesado, en relación con otras gramíneas, se limita su movimiento en la atmósfera (Sabban, 2011). Esto explicaría que la cantidad de granos en el ambiente fuera baja.

El análisis de las muestras en el laboratorio para la detección de maíz GM se hizo con base en las etapas que sugiere Rimachi (2011) pero se modificaron algunos:

- 1) Exploración o detección a través de la técnica de PCR para el gen endógeno del maíz (ADH o HMG) esto con la finalidad de corroborar que el método de extracción fuera el adecuado y para saber que las condiciones de las trampas en campo eran óptimas.
- 2) Identificar los eventos transgénicos específicos que fueron reportados en análisis anteriores. En este caso no existían reportes previos por ello se eligieron eventos comunes con antecedentes de liberación en la zona (Senasica, 2011).

En las muestras de Sinaloa, correspondientes a cuatro semanas, se logró identificar el gen endógeno del maíz con la técnica de qPCR y así se corroboró que sí se capturó polen de maíz. Y con la adición de albúmina se mejoró la amplificación (figura 21 y tabla 17). Una vez que se tenía la certeza de contar con

ADN de maíz, el objetivo era detectar algún evento transgénico. Para lo cual, se hicieron los análisis para MON88017 y MON89034 pero no se logró identificar alguno (figura 21-figura 24) esto pudo deberse a que no eran los eventos que se habían sembrado ahí o las trampas Hirst no capturaron la suficiente cantidad de granos para que la probabilidad de atrapar polen de plantas GM fuera mayor o porque la fuente emisora de polen (parcelas con maíz GM) no fue lo suficientemente grande.

Para la identificación de transgenes en muestras de maíz, principalmente semillas, se utiliza comúnmente la técnica de PCR y la de ELISA para tener un menor grado de incertidumbre que si solo se usara una; aunque, sea mayor el costo en tiempo y económico (Vides, 2006).

La técnica de PCR tiempo real ayuda a la amplificación de productos por las sondas y cebadores específicos que se utilizan y que puede duplicar la cantidad de ADN detectado en cada ciclo y durante muchos ciclos (Castillo, 2012). Dadas estas características se puede observar que sí se colectó polen de maíz y el que no se haya podido encontrar transgenes se debe a que se tenía poca concentración de ADN molde (ADN transgénico) por la poca cantidad de ADN.

Otra posible causa de no tener un resultado positivo, probablemente, se debió a que la secuencia del gen endógeno se encontraba en mayor proporción de

número de copias que la secuencia del evento específico. Esto se presentó en muestras de hojas de maíz (Castillo, 2012) las cuales tienen un tamaño mayor a los granos de polen, por lo que el número de copias del gen endógeno puede ser proporcional al tamaño de la muestra. Para cuantificar organismos genéticamente modificados con PCR tiempo real, los ciclos iniciales no son exponenciales, por ello la baja concentración de una secuencia blanco (en este caso, el evento transgénico) no pueden ser detectadas.

La detección de secuencias transgénicas está en relación con la cantidad de granos de polen capturados. Esto se puede afirmar al comparar los resultados este estudio con los obtenidos por Hofmann (2009) y Folloni (2012) que reportan haber atrapado miles de granos de polen.

En el cuarto ensayo de captura de polen, la cantidad de granos es muy poca porque las trampas Burkard atrapan menos polen. Además, debido a su tamaño, la superficie de la cinta no fue suficiente para capturar a una gran cantidad. Incluso, durante las dos primeras semanas de este ensayo se pudieron sumar, aparte de polen de maíz, insectos y partículas del suelo, y lo disminuyó el área de contacto para atrapar polen. También, tenemos que considerar que a partir de la tercera y cuarta semana la cantidad de polen en el ambiente había disminuido.

El uso de una técnica más precisa pudo haber arrojado mejores resultados. Una posible alternativa hubiera sido la PCR digital (dPCR) que permite medir con precisión concentraciones pequeñas de ADN en una muestra contando amplificaciones desde una sola repetición de esta molécula (Corbiser *et. al.*, 2010). Con esta técnica se han cuantificado secuencias genéticamente modificadas en hojas de maíz alcanzando valores más altos a los que se obtuvieron con PCR tiempo real.

La PCR digital es una nueva herramienta que se recomienda sea implementada al hacer detección de OGM en granos de polen de maíz porque permite cuantificar la cantidad de ADN en una muestra desde una sola copia de ADN (Gutiérrez, 2012) como lo que se presentó en esta investigación aunque por el costo económico que representa es poco probable que se utilice en este tipo de estudios.

Si partimos del hecho de que se tenía polen de maíz pero que no se pudo identificar ningún evento transgénico porque la cantidad de ADN era muy poca para ser detectada, la baja proporción pudo ser afectada por la tasa de viabilidad del grano y la tasa de asentamiento, que a su vez están influidas por la presión de vapor de la atmósfera y esto en el medioambiente afectaría la fertilización entre individuos (Marceau, 2012).

Otra causa de que los resultados del monitoreo no fueran los esperados, probablemente, fue que no se tuvo un control total del estudio. Dado que los campos se encontraban en Sinaloa, sitio poco seguro, el viaje no fue fácil para trasladarse, por lo menos una vez a la semana para cambiar las cintas, por ello cada cinta se utilizó dos semanas. A pesar de las diferentes ventajas que ofrece este método (buena observación de granos de polen y el muestreo diario) no fue el más óptimo porque al requerir de energía eléctrica para trabajar y dado que la fuente más próxima estaba por lo menos a 104 metros, la compra de cable eléctrico fue un gasto económico muy alto y su instalación dentro del campo resultó complicada. Sin contar la compra de material para el establecimiento de cada una de las trampas.

A pesar de no haber detectado, se pueden hacer deducciones acerca de cómo se da la dispersión de polen de maíz. Un hecho fundamental para estudios de detección y monitoreo de OGM en el ambiente. Hasta ahora, este ha sido el punto de muchos debates porque no se sabe cómo se presenta la fertilización entre cultivos GM y cultivos de maíz convencional.

Para que se produzca la hibridación entre cultivos GM y no GM, que crecen cerca o dentro uno del otro, se requiere de varios factores: que los dos tipos de plantas sean sexualmente compatibles; que las flores estén presentes al mismo tiempo y que su polen sea viable, para poder utilizarse en la estigmatización; una

fertilización exitosa del embrión; la formación de un cigoto y una semilla; germinación de la semilla; sobrevivencia de los híbridos fértiles, por lo menos un ciclo de vida, y por último que las nuevas generaciones mejoren en su rendimiento hasta incorporar el transgen en su genoma (Sanvido, 2006).

Otros factores que pueden influir en la fecundación cruzada son la distancia entre parcelas, la dirección de las corrientes de viento, la orografía y las condiciones agroecológicas (Álvarez-Buylla, 2008) por lo que es necesario un trabajo experimental para establecer el flujo de genes del maíz transgénico al convencional, las medidas para su gestión y su potencial impacto a largo plazo dentro de las razas nativas (Acevedo, *et al.* 2011). Con la captura de pocos granos, se puede plantear que la autofecundación y la fecundación cruzada dependen, en gran parte, de las características fisiológicas de los granos y su abundancia en el ambiente. Además no se conoce cuántos granos eran viables. Ivanovska *et. al.* (2009) indica que para predecir la fecundación cruzada entre campos cercanos se tienen que relacionar las distancia y el viento como parámetros esenciales.

Para México es esencial implementar un sistema de muestreo de transgenes en el ambiente para acatar lo establecido por la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Europa tiene hasta ahora las regulaciones más estrictas respecto a los Organismos Genéticamente Modificados (Davison, 2010).

La regulación contempla que el análisis de bioseguridad de un organismo genéticamente modificado específico debe hacerse en varios niveles y mínimamente debe incluir las características biológicas de la proteína o las proteínas recombinantes, su toxicidad para el hombre y los animales, la posibilidad de transferencia horizontal de los (trans) genes que las codifican hacia otros organismos y los posibles riesgos de su liberación al ambiente en diversos contextos (Álvarez-Buylla, 2008).

El maíz GM podría aumentar o disminuir la diversidad de razas nativas a través del flujo de genes y reducir la superficie de los cultivos tradicionales porque el flujo de transgenes incluye el gen de interés, el promotor, terminador, los genes marcadores y los genes no transgénicos ligados al genoma que viajan junto con los transgenes. Todo esto puede tener efectos sobre la frecuencia alélica en las variedades criollas al aumentar la diversidad cualitativa, ya que añade uno o más genes (Soleri, 2006; Bellon, 2006). Asimismo, el polen GM impactaría en el ambiente y sobre especies no blanco (Aylor, 2003), que comparados con las consecuencias de aplicar pesticidas a cultivos no GM son menores (Sparrow, 2010), y presentar repercusiones legales en el comercio internacional, y su uso como un vehículo de bioprocesamiento dicta las políticas estrictas de aislamiento para garantizar la contención de rasgos transgénicos no aprobados para la alimentación humana o animal.

Si el material genético del maíz GM se llegara incorporar al del maíz no GM, la introgresión depende principalmente de dos fuerzas evolutivas: la deriva genética y la selección natural.

La deriva puede perder o fijar los transgenes y el impacto de la selección dependerá de las condiciones fisiológicas y de la producción de polen y semillas. Si los transgenes y los genes vinculados a ellos, reducen la aptitud entonces disminuye su frecuencia dentro de la población y persistir en forma neutral hasta que se pierdan por deriva genética (especialmente en poblaciones pequeñas) o perderse totalmente porque las semillas que los contienen tendrán menos probabilidad de ser seleccionadas para que el agricultor las siembre al año siguiente.

Por el contrario, si estos genes incrementan las condiciones de supervivencia de la planta entonces, es muy probable que la cantidad de transgenes aumente con el tiempo (Mercer, 2008) y que se establezcan en las poblaciones por lo que será muy difícil eliminarlos (Soleri, 2006). Sin olvidar que la selección de granos hecha por los agricultores es primordial en este escenario.

Se debe investigar el efecto de la acumulación de transgenes en las razas nativas de maíz a través de un plan de cruzamientos de poblaciones nativas y poblaciones

con transgenes con el fin de evaluarlas de forma fenotípica y genómica (Turrent, 2009). Para acotar la dispersión de transgenes se evalúa el movimiento del polen. Una herramienta para ello es delimitando distancias de aislamiento entre campos vecinos. Las longitudes ideales están basadas en estudios experimentales para estimar la situación de coexistencia entre campos de maíz vecinos, que algunas veces están separados por otros cultivos o por estructuras (Sanvido, 2008). Se ha observado que distancias de más de 500 metros son necesarias para reducir la exposición a insectos, y espacios de más de 1000 metros, para prevenir hasta un 90% el depósito de polen de maíz en otras plantas (Hofman, 2010).

Conclusiones

La problemática acerca de la siembra de maíz GM en el ambiente y sus repercusiones por el flujo génico hacia las variedades nativas de México solo se puede resolver con varios estudios de este tipo para establecer un protocolo adecuado que permita hacer una correcta y oportuna detección de secuencias transgénicas.

El monitoreo de polen en el ambiente es una alternativa para el rastreo de OGM ya que, proporciona la ventaja de, en comparación con colecta de semillas y hojas, abarcar una mayor cobertura geográfica, lo que aumenta la probabilidad de detectar secuencias de modificadas genéticamente y esto está estrechamente vinculado con la necesidad de capturar gran número de granos de polen.

En este trabajo el problema para detectar los eventos transgénicos se debió a la poca cantidad de granos que se capturó. Esto se pudo deber a varios factores: el establecimiento de las trampas no fue el óptimo, ya que esto dependió de la distancia a la que encontraba la fuente de energía eléctrica más cercana; no se pudo tener un control total del estudio para modificar las variables necesarias cuando se observara en el muestreo diario la poca cantidad de polen; la poca superficie de contacto donde el polen se podía adherir; el empleo de trampas Burkard, las cuales no resultaron una buena opción para polen de maíz y deben

seguir utilizándose para estudios de calidad biológica del aire, y la ventana de floración del maíz que estaba por concluir, contribuyó a que las posibilidades de captura de polen disminuyeran. Solo unos pocos granos se adhirieron, a pesar que la solución de silicona con tetracloruro fue un adhesivo adecuado que no interfiere en la técnica de qPCR.

Sería importante probar otro tipo de muestreadores que sean específicos para polen, como los filtros de masa [pollen mass filter (PMF)/Sigma-2] o los de bioaerosoles, y que dentro de campos de liberación experimental de maíz GM se instalen varios de ellos para abarcar la mayor superficie posible y aumentar la probabilidad de atrapar gran cantidad de polen y así poder hacer la detección de eventos transgénicos. Aunado al número de trampas, es necesario trabajar en colaboración con equipos de investigación y trabajo confiables.

Aquí se establecen las condiciones primarias que deben considerarse para iniciar un monitoreo de polen. Si bien es cierto que no se logró un número grande de granos de polen, sí se pudo identificar el gen endógeno del maíz. Lo que demuestra que el protocolo de extracción que se utilizó es eficiente para separa ADN de maíz.

El protocolo donde se emplea CTAB con un lavado previo con tritón y el método con el equipo *Fast-prep* resultaron adecuados para una extracción. Sin embargo,

este segundo es mejor porque permite romper la pared exterior de la mayoría de los granos, lo cual garantiza una mayor cantidad de ADN para la técnica de PCR.

Aunque, se logró identificar ninguno de los dos eventos de modificación genética que se esperaban en las muestras, los análisis posteriores se puede hacer con base en este protocolo y en la técnica de qPCR se recomienda usar albúmina para mejorar la detección, ya que permite que diferentes moléculas no interfieran en la detección.

Referencias

Acevedo F., E. Huerta, C. Burgeff, P. Koleff, S. J. 2011. Is transgenic maize what really needs? *Nature Biotechnology* 29, No.1: 23-24.

Álvarez-Buylla, E., A. Piñeyro. 2009. Riesgos y peligros de la dispersión de maíz transgénico en México. *Ciencias*, No. 92-93:82-96.

Astini J., A. Fonseca , C. Clark, J. Lizaso, L. Grass, M. Westgate, R. Arritt. 2009. Predicting outcrossing in maize hybrid seed production. *Agronomy Journal* 101:373-380.

Aylor D., P. Schultes, E. Shields. 2003. An aerobiological framework for assessing cross-pollination in maize. *Agricultural and Forest Meteorology* 119: 111-129.

Baltazar M. B., J. D. J. Sánchez-Gonzalez, L. De La Cruz-Larios, J. Schoper. 2005. Pollination between maize and teosinte: an important determinant of gene flow in Mexico. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 519-526.

Bellon M. R. 2010. Maize and Biosecurity in Mexico: Debate and practice.

Bulletin of Latin American Research 29, No. 3: 388-390.

Bellon M. R., J. Berthaud. 2004. Transgenic maize and the evolution of landrace diversity in Mexico. The importance of farmers' behavior. *Plant Physiology* 134: 883-888.

Bellon M. R. 2006. Traditional Mexican Agricultural Systems and the Potential Impacts of Transgenic Varieties on Maize Diversity. *Agriculture and Human Values* 23: 3-14.

Belmonte J. 2003. Técnica para captar e identificar los pólenes [en línea], ver.1.0, Zaragoza, España. Universidad Autónoma de Barcelona, fecha de consulta: 26 de marzo de 2013.

Disponible en:

lap.uab.cat/aerobiologia/general/pdf/altres/Tecnica_captar_identificar_polenes.pdf.

Calderón C., E. Ward, J. Freeman, H.A. McCartney. 2002. Detection of fungal spores on rotating-arm and Hirst spore traps using polymerase chain reaction assays. *Journal Aerosol Science* 33: 283-296.

Calderón C.2009. Efectos de cambio climático en la distribución y concentración de polen atmosférico y otros aeroalérgenos y sus impactos potenciales en la salud humana [en línea], ver. 1.0, México, D.F., Centro de Ciencias de la atmósfera, UNAM, [fecha de consulta: 19 de marzo de 2014]. Disponible en: www.facmed.unam.mx/deptos/salud/censenanza/syma/panel/saludycambioclimatico.pdf

Castillo-Durán L. 2012. Validación del uso de la hoja de maíz genéticamente modificado como material de referencia en ensayos cuantitativos mediante la técnica de PCR tiempo real, México, 70 pp. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Cervantes M., D. Louette, J. Moina, T. Cervantes, H. Azpíroz. 2001. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

Dispersión de polen e infiltración genética entre poblaciones contiguas de maíz [en línea]. México, fecha de consulta: 30 de noviembre de 2013. *Agricultura Técnica en México* 1:13-25. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60827102>

Chamecki M., S. C. Gleicher, N. S. Dufault, S. A. Isard. 2011. Diurnal variation in settling velocity of pollen released from maize and consequences for atmospheric dispersion and cross-pollination. *Agricultural and Forest Meteorology* 151:1055-1065.

Cleveland D., Soleri D, Aragón Cuevas F., Crossa J., Gepts P. 2005. Detecting (trans) gene flow to landraces in centers of crop origin: lessons from the case of maize in Mexico. *Environmental Biosafety Research* 4:197-208.

COFREPI (COMISIÓN FEDERAL PARA LA PROTECCIÓN CONTRA RIESGOS SANITARIOS) 2013. México, D.F. [fecha de consulta: 21 de marzo de 2014]. Disponible en: <http://www.cofepri.gob.mx/Paginas/Inicio.aspx>

CONABIO (COMISIÓN NACIONAL PARA EL CONOCIMIENTO Y USO DE LA BIODIVERSIDAD) 2009. 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” [en línea], México, fecha de consulta: 25 de febrero de 2012. Disponible en: www.biodiversidad.gob.mx/genes/proyectoMaices.html

Cuevas G. E. 2009. La esterilidad masculina en plantas, una perspectiva embriológica [en línea], ver. 1.0, Morelia, Michoacán, México, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, fecha de consulta: 12 de noviembre de 2012. Disponible en:

<http://www.biologicas.umich.mx/index.php/biologicas/article/view/58>

Dalton R. 2008. Modified genes spread to local maize. *Nature* 456: 149-149.

Dalton. 2009. Mexico's transgenic maize under fire. *Nature* 462: 404.

Ezcurra E., S. Ortiz, J. Soberón Mainero. 2001. Evidence of Gene Flow from Transgenic Maize to Local Varieties in Mexico.

Folloni S., DM. Kagkli, B. Rajcevic, NC. Guimarães, B. Van Droogenbroeck, FH. Valicente, T. Van den Eede, M. Van den Bulcke. 2012. Detection of airborne genetically modified maize pollen by real-time PCR. *Molecular Ecology Resources*, 12:810-821.

Frenz D. 1999. Comparing pollen and spore counts collected with the Rotorod sampler and Burkard spore trap. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 83, No. 5:341-349.

García C., M. Figueroa, M. Gomez, L. Townsend, J. Schoper. 1998. Pollen control during transgenic hybrid maize development in Mexico. *Crop Science* 6, No.38:1597-1602

González R. Manual operativo de la campaña preventiva contra la roya del café: acciones de vigilancia fitosanitaria en el manejo de la roya del café [en línea]. México. Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria (LANREF)-Colegio de Postgraduados. [Fecha de consulta: 10 de marzo de 2014]. Disponible en:

file:///C:/Users/Igo/Downloads/Manualoperativodelacampa%C3%B1apreventivacontralaRoyaDelCafeto%20(2).pdf

Gutierrez-Angoa L. 2013. Validación de la PCR digital para la cuantificación de maíz genéticamente modificado, México, 2013, 107 pp. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Hofmann F. 2005. Standardized technical pollen sampling for monitoring of GMO -Pollen Mass Filter PMF and Sigma 2 [en línea], ver. 1.0, fecha de consulta: 26 de marzo de 2013. Disponible en:
<http://www.oekologiebuero.de/Poster-3-PMF.pdf>.

Hofmann, F., R. Epp, A. Kalchschmid, W. Kratz, L. Kruse, U. Kuhn, B. Maisch, E. Mueller, S. Ober, J. Radtke, U. Schleichriemen, G. Schmidt, W. Schroeder, W. Von Der Ohe, R. Voegel, N. Wedl, and W. Wosniok. 2010. Monitoring of Bt-Maize pollen exposure in the vicinity of the nature reserve Ruhlsdorfer Bruch in northeast Germany 2007 to 2008. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 22: 229-251.

Holst-Jensen A , Y. Bertheau , M. de Loose, L. Grohmann, S. Hamels, L. Hougs, D. Morisset, S. Pecoraro, M. Pla , M. Van den Bulcke, D. Wulff. 2012. Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. *Biotechnology Advances* 30. No. 6:1318-35.

Ivanovska A., L. Todorovski, M. Debeljak, S. Dzeroski. 2009. Modelling the outcrossing between genetically modified and conventional maize with equation discovery. *Ecological Modelling* 220: 1063-1072.

James C. 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012 [en línea], ver. 1.0, Uthiru, Nairobi, Kenia [fecha de consulta: 30 de enero de 2014].

Disponible en:

http://www.isaaa.org/resources/publications/biotech_country_facts_and_trends/download/Facts%20and%20Trends%20-%20Mexico.pdf

Jugernheimer WR. 1990. Variedades mejoradas métodos de cultivo y producción de semilla. 4ta impresión, México, D. F., Limusa S. A, 834 pp.

Kato T., S. Maqpes, L. Mera, J. Serratos, R. Bye. 2009. Origen y diversificación del Maíz: Una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión para el conocimiento y la biodiversidad, México D.F. 116 pp.

Kleppin L., G. Schmidt, W. Schroeder. 2011. Cultivation of GMO in Germany: support of monitoring and coexistence issues by WebGIS technology. *Environmental Sciences Europe* 23: 4.

Ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados. 2005. En Diario Oficial de la Federación, p. 44, México, 18 de marzo de 2005.

Luna S., J. Figueroa, B. Baltazar, R. Gomez, R. Townsend, J. B. Schoper. 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. *Crop Science* 41:1551-1557.

Marceau A., S. Saint-Jean, B. Loubet, X. Foueillassar, L. Huber. 2012. Biophysical characteristics of maize pollen: Variability during emission and consequences on cross-pollination risks. *Field Crops Research* 127: 51-63.

Meissle M., J. Romeis, B. Franz. 2011. Bt maize and integrated pest management - a European perspective. *Pest Management Science* 67: 1049-1058.

Mercer K., J. Wainwright. 2008. Gene flow from transgenic maize to landraces in Mexico: An analysis. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 123:109-115.

Orellana M. 2006. Maíz mítico. En Mitos del maíz. *Artes de México* 79: 9-11.

Ortiz-García S., E. Ezcurra, B. Schoel, F. Acevedo, J. Soberón Mainero, A. Snow. 2005. Reply to Cleveland *et al.* Detecting (trans) gene flow to landraces in centers of crop origin: lessons from the case of maize in Mexico. *Environmental Biosafety Research* 4, no. 04: 209-215.

Ortiz-Garcia, S., E. Ezcurra, B. Schoel, F. Acevedo, J. Soberon, and A. A. Snow. 2006. Transgenic maize in Mexico. *BioScience* 56: 709-709.

Ortiz-García S., E. Ezcurra, B. Schoel, F. Acevedo, J. Soberón, A. Snow. 2005. Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico (2003–2004). *Proceeding of the National Academy of Sciences (PNAS)* 102: 12338–12343.

Ortiz-Torres E., C. Carballo, O. Muñoz, C. González, 2010. Efecto de la dispersión de polen en la producción de semilla de maíz, en Texcoco, México. *Agronomía Mesoamericana* 21, no. 2: 289-297.

Pineyro-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, E. Álvarez-Buylla. 2009. Resolution of the Mexican transgene detection controversy: error sources and scientific practice in commercial and ecological contexts. Reply. *Molecular Ecology* 18: 4145-4150.

Piñeyro-Nelson A., J. Van Heerwaarden, H. R. Perales, J. A. Serratos-Hernandez, A. Rangel, M. B. Hufford, P. Gepts, A. Garay-Arroyo, R. Rivera-Bustamante, E. Álvarez-Buylla. 2009. Transgenes in Mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Molecular Ecology* 18: 750-761.

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

Quist D. 2002. Maize transgene results in Mexico are artefacts - Reply. *Nature* 416: 602.

Raynor Gs., Ec. Ogden, Jv. Hayes. 1972. Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. *Agronomy Journal* 64:420-427.

Reyes C. P. 1990. El maíz y su cultivo, México, D.F, AGT Editor, 1990, 460pp.

Ricroch A., J.B.Berge, A. Messean. 2009. Literature review of the dispersal of transgenes from genetically modified maize. *Comptes Rendus Biologies* 332: 861-875.

Ricroch A., J. B. Berge, M. Kuntz. 2009. Is the German suspension of MON810 maize cultivation scientifically justified? *Transgenic Research* 19: 1-12.

Ripplinger D. G., D. J. Hayes, A. S. Goggi, K. Lamkey. 2009. Insuring Against Losses from Transgenic Contamination: The Case of Pharmaceutical Maize. *American Journal of Agricultural Economics* 91: 322-334.

Rocha M., B. Michel, A. Juárez, A. Nava, A. Otero. 2008. Manual para la toma y el manejo de muestras de maíz para la detección de OGMs en campo y laboratorio. México, D.F., Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, 13pp.

Ruiz- Maraver O. 2012. Monitoreo y detección de maíz transgénico en el Municipio de Erongarícuaro, Michoacán, México, 130 pp. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Ryffel G. U. 2011. Dismay with GM maize A science-based solution to public resistance against genetically modified crops that could be compatible with organic farming. *Embo Reports* 12: 996-999.

Sabban L.2011. Measurements of pollen grain dispersal in still air and stationary, near homogeneous, isotropic turbulence. *Journal of Aerosol Science* 42:867-882.

Sanvido O., F. Widmer, M. Winzeler, B. Streit, E. Szerencsits, F. Bigler. 2008. Definition and feasibility of isolation distances for transgenic maize cultivation. *Transgenic Research* 17: 317-335.

Sanvido O.,M. Stack, J. Romeis, F. Bigler. 2006. Ecological impacts of genetically modified crops. Experiences from ten years of experimental field research and commercial cultivation. *Swiss Expert Committee for Biosafety*. 108 pp.

Serratos- Hernández J. A. 2009. Bioseguridad y dispersión de maíz transgénico en México. *Ciencias*, no. 92-93: 130-141.

Serratos-Hernandez J.-A., J.-L. Gómez-Olivares, N. Salinas-Arreortua, E. Buendia-Rodriguez, F. Islas-Gutiérrez, A. De-Ita. 2007. Transgenic proteins in maize in the soil Conservation area of Federal District, Mexico. *Frontiers in Ecology and the Environment* 5: 247-252.

Silva. 2005. Maíz genéticamente modificado [en línea], ver.1.0, Bogotá, Colombia, Agro-Bio, fecha de consulta: 06 de noviembre 2011. Disponible en: <http://www.argenbio.org>

Soleri D., D. A. Cleveland. 2006. Transgenic maize and Mexican maize diversity: Risky synergy? *Agriculture and Human Values* 23: 27-31.

Soleri D., D. A. Cleveland, F. A. Cuevas. 2006. Response from Soleri and colleagues. *BioScience* 56: 709-710.

Soleri D., D. A. Cleveland, F. Aragón Cuevas. 2006. Transgenic Crops and Crop Varietal Diversity: The Case of Maize in Mexico. *BioScience* 56: 503-513.

Somma M. Análisis de la presencia de Organismos Genéticamente Modificados en muestras de alimentos [en línea]. Sesión No. 4: Extracción y purificación de ADN. European Commission. Fecha de consulta: 25 de julio de 2013.

Disponible en: gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesi%C3%B3n4.pdf

Tenaillon M. I., A. Charcosset. 2011. A European perspective on maize history. *Comptes Rendus Biologies* 334: 221-228.

Turrent Fernández A., J. A. Serratos Hernández, H. Mejía Andrade, A. Espinosa Calderón. 2009. Commercial liberation of transgenic maize and transgene accumulation in Mexican maize landraces *Revista Fitotecnia Mexicana* 32: 257-263.

Turrent-Fernández A., J. A. Serratos-Hernández, H. Mejía-Andrade, A. Espinosa-Calderón. 2009. Evaluation Proposal of Possible Impact of Transgene Accumulation in Mexican Maize Landraces. *Agrociencia* 43: 257-265.

Van Heerwaarden J., D.Ortega Del Vecchyo, E.Alvarez-Buylla, M.R. Bellon 2012. New genes in traditional seed systems: diffusion, delectability and persistence of transgenes in maize metapopulation. *PLoS One* 7:1-9.

Van Hout R., M. Chamecki, G. Brush, J. Katz, M. B. Parlange. 2008. The influence of local meteorological conditions on the circadian rhythm of corn (*Zea mays* L.) pollen emission. *Agricultural and Forest Meteorology* 148: 1078-1092.

Anexos

Anexo I Reactivos para los métodos de extracción 1 y 2

Acetato de amonio 10 M

Tritón 0.1%

Proteinasa K 20ml/ μ L

Solución amortiguadora CTAB (1% CTAB, 1M Tris-7.5, 5M NaCl, EDTA-1M 8.0, dH₂O, 5% SDS).

Anexo II Preparación de reactivos para el Método de extracción 3: Ruptura de pared celular con equipo *Fast-Prep*

Preparación de reactivos para extracción de ADN

- Acetato de amonio 6M

Se disolvieron 4.63 g de acetato de amonio en 100 ml de agua purificada y se esterilizo en autoclave. Se mantuvo en refrigeración.

- Etanol 70%

Se mezclaron 7 ml de etanol con 3ml de agua y la esterilización fue por filtración con un filtro de 0.22 μ m. La solución se almaceno en congelador a -20°C.

- Isopropanol

No requirió preparación solo se esterilizo por filtración con filtro de 0.22 μ m y se almaceno en congelador a -20°C.

- Fenol-Cloroformo

Se mezcló fenol con un volumen igual de cloroformo y se almaceno en congelador a -20°C.

- Perlas de vidrio

Se colocaron 2.5 cm de perlas de vidrio (*Ballotini beads*) en un matraz y se cubrió con HCl al 50% (50 ml H₂O + 50 ml HCl). Se agregó un agitador magnético y se revolvió durante 4 horas.

Posteriormente se lavaron abundantemente con agua destilada hasta que el pH del agua fue de 7. Se secar en horno a 160°C otras 4 horas. Por último se colocaron en frasco y se esterilizaron en una autoclave.