



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**MONITOREO Y DETECCIÓN DE MAÍZ  
TRANSGÉNICO EN EL MUNICIPIO DE  
ERONGARÍCUARO, MICHOACÁN.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**OSCAR JAVIER RUIZ MARAVER**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. MARTA ADRIANA OTERO ARNAIZ  
2012**

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Ruiz

Maraver

Oscar Javier

57 14 53 65

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

30226312-5

### 2. Datos del tutor

Dra.

Marta Adriana

Otero

Arnaiz

### 3. Datos del sinodal presidente

Dra.

Alma Amparo

Piñeyro

Nelson

### 4. Datos del sinodal vocal

Dra.

Natalhie Beatriz

Campos-Reales

Pineda

### 5. Datos del sinodal suplente

Dra.

Martha Graciela

Rocha

Munive

### 6. Datos del sinodal suplente

M. en C.

Alma Berenice

Zúñiga

Bustos

7. Datos del trabajo escrito

Monitoreo y detección de maíz transgénico en el Municipio de Erongarícuaro, Michoacán.

p. 130

2012

# INDICE

<b>1. Introducción.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Justificación.....</b>	<b>24</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>25</b>
<b>4. Lugar de estudio.....</b>	<b>26</b>
<b>5. Metodología de campo.....</b>	<b>31</b>
<b>6. Metodología de laboratorio.....</b>	<b>34</b>
<b>7. Resultados</b>	
<b>7.1. Encuestas.....</b>	<b>52</b>
<b>7.2. Laboratorio.....</b>	<b>55</b>
<b>7.3. Análisis estadístico.....</b>	<b>56</b>
<b>8. Discusión.....</b>	<b>59</b>
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>68</b>
<b>10. Bibliografía.....</b>	<b>69</b>
<b>11. Anexos</b>	
<b>I. ....</b>	<b>74</b>
<b>II. ....</b>	<b>80</b>
<b>III. ....</b>	<b>81</b>
<b>IV. ....</b>	<b>84</b>
<b>V. ....</b>	<b>85</b>
<b>VI. ....</b>	<b>87</b>
<b>VII. ....</b>	<b>110</b>
<b>VIII. ....</b>	<b>112</b>

## INTRODUCCION

La regulación para el uso y comercialización de los Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) en México, queda circunscrita a la Ley de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) y su reglamento. La liberación de los OGMs al medio ambiente en México, es un proceso que se evalúa en tres etapas: Liberación experimental, Liberación piloto y Liberación comercial (LBOGM, 2005). Todo OGM, necesariamente debe de pasar por estas tres fases de evaluación por parte de las autoridades mexicanas competentes, para su siembra en territorio nacional.

En México, la liberación de maíz transgénico al medio ambiente se encuentra en la fase de liberación experimental, algunos eventos en etapa piloto y se han presentado solicitudes para siembra comercial; hasta 2012 se han otorgado 57 permisos para sembrarlo en 126.3 hectáreas distribuidas en los estados de Baja California Sur, Durango, Nayarit, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas. (CIBIOGEM, 2012).

Sin embargo, la autorización para consumo humano y animal de maíz transgénico en México, se aprobó desde Febrero de 1995 (COFEPRIS, 2011); actualmente, se tiene autorizado la importación de 12 eventos simples y 17 eventos apilados (CERA, 2012). Este movimiento transfronterizo y su comercialización, hace posible la importación y consumo lícito, pero posibilita la siembra potencial de esos granos de manera accidental o intencional por agricultores mexicanos. Esto conlleva a la posibilidad de que el maíz transgénico se encuentre actualmente en el campo mexicano de manera no permitida.

Desde el 2000 se han realizado varios estudios de detección por la incertidumbre que se tiene sobre la posible siembra de maíz transgénico no permitida en el país; aunado al hecho de que esta tecnología debe de ser monitoreada y evaluada para observar su desarrollo en un agro-ecosistema en particular; así como para evitar la dispersión no intencional de ciertas líneas transgénicas/transgenes, a poblaciones nativas en donde no se ha aprobado su siembra con el fin de tomar medidas de contención.

El primer reporte fue descrito por Quist y Chapela (2001), quienes efectuaron un muestreo de 6 mazorcas de maíz criollo en cuatro campos de cultivo en dos localidades de la Sierra Norte de Oaxaca; a más de 20km del camino principal que cruza las montañas y que conecta a las ciudades de Oaxaca y Tuxtepec en el municipio de Ixtlán. Quist y Chapela (2001) reportaron la presencia de OGMs en

muestras de granos de maíz manejados y distribuidos a manera de subsidio para las comunidades rurales por la Comisión Nacional para la Subsistencia Popular (Diconsa).

Sus muestras fueron analizadas mediante pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), para detectar en las muestras de maíz colectadas el elemento común presente en todos los transgénicos del mercado en ese momento: el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S CaMV).

Como control negativo, reportan muestras de maíz azul del Valle de Cuzco, Perú; y 20 semillas obtenidas de una colecta histórica en la Sierra Norte de Oaxaca. Como control positivo, reportan el uso de muestras de maíz Yieldgard® (Bt1; Compañía Monsanto) y maíz Roundup-Ready® (RR1; Compañía Monsanto; Quist y Chapela, 2001).

Los resultados reportados muestran una amplificación positiva de los materiales utilizados como control positivo con el uso de primers específicos para detectar p-35S CaMV: en las muestras de maíz criollo colectadas en los campos de cultivo las bandas de amplificación fueron muy tenues, mientras que en las muestras obtenidas de Diconsa mostraron una intensa banda de amplificación comparable con la de las muestras del control positivo.

Posteriormente, Quist y Chapela utilizaron un sistema de PCR anidada para amplificar y secuenciar las muestras de maíz que resultaron ser positivas al promotor 35S. Esta secuenciación mostró que existía un 98% de homología entre las secuencias de las muestras de maíz de la Sierra Norte y Diconsa con la secuencia de los controles positivos al promotor 35S CaMV.

De la misma manera, pruebas de PCR posteriores con las mismas muestras, mostraron la presencia del terminador de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (T-nos), otro elemento común de los transgénicos en ese momento. Quist y Chapela también hallaron que algunas de las muestras colectadas contenían el gen *cryIAb* de *Bacillus thuringiensis*.

Cada resultado de PCR obtenido, fue confirmado a través de varias repeticiones con la misma prueba de PCR.

Por último y para observar el sitio genómico en el cuál se encontraban insertadas las secuencias del promotor 35S en el genoma de las muestras de maíz colectadas en Sierra Norte y en las de Diconsa,

efectuaron una PCR inversa (iPCR). Por este método lograron identificar las secuencias adyacentes que limitaban con la secuencia conocida del promotor 35S. Encontraron que las secuencias limitantes con la secuencia del promotor eran diversas, sugiriéndoles que el promotor 35S estaba insertado en el genoma del maíz criollo en múltiples loci.

Con estos resultados, Quist y Chapela (2001) concluyeron que: a) efectivamente había maíz transgénico en las dos localidades de la Sierra de Juárez; b) en la zona había un alto nivel de flujo génico del maíz GM hacia el maíz criollo; c) debido a que las muestras eran originarias de áreas remotas y difíciles de acceder, se esperaba que en regiones más accesibles, las tasas de introgresión fueran mayores; d) las altas frecuencias de inserciones del transgen dentro de diversos contextos genómicos, hacía suponer a los autores que los eventos de introgresión son relativamente comunes; e) los transgenes probablemente se mantienen en las poblaciones de una generación a otra.

Después de la publicación del trabajo de Quist y Chapela, varias críticas surgieron entorno a la metodología y conclusiones del mismo. Entre las principales críticas destacan las de Metz y Fütterer (2002) y las de Kaplinsky *et al.* (2002).

Metz y Fütterer (2002), argumentaron que la evidencia de introgresión encontrada por Quist y Chapela estaba basada en errores de observación debidos a ensayos erróneos, aunados a una malinterpretación de la literatura científica para explicar sus resultados.

Según estos autores, Quist y Chapela interpretaron los resultados de la iPCR como evidencia de una alta frecuencia de inserción transgénica dentro del amplio contexto genómico del maíz. Sin embargo, para Metz y Fütterer (2002), los productos de la iPCR parecen ser errores de observación ocasionados por la metodología empleada, ya que examinando las secuencias reportadas de la iPCR de Quist y Chapela (2001), Metz y Fütterer (2002) encontraron que ninguna secuencia contenía características esperadas de un producto legítimo amplificado del ADN adyacente con respecto a la secuencia de anclaje de los primers para p-35S. Esto es, que un producto de la iPCR derivado de la circularización de una sola hebra de ADN debería contener la secuencia interna y externa a partir de la secuencia de anclaje de los primers empleados. También se esperaría que algunos productos del iPCR, sino es que todos, tuvieran más de una secuencia transgénica adyacente al promotor 35S. Y no se encontró ningún producto que contuviera alguna otra secuencia transgénica.

Metz y Fütterer (2002), también notaron que la orientación upstream y downstream con respecto a la secuencia del 35S CaMV, fueron confundidas por Quist y Chapela.

Según Metz y Fütterer (2002), varios mecanismos pueden llevar a la producción de errores de observación de la iPCR.

Productos ilegítimos pudieron haberse generado dependiendo de las condiciones de la iPCR. Por ejemplo, los extremos 3' de los primers usados para amplificar una secuencia en específico, pueden llegar a aparearse directamente con las bases de la secuencia genómica que fue amplificada.

Además, no hubo controles negativos que abordaran la posibilidad de que la amplificación por iPCR de las muestras de maíz no contuvieran ADN transgénico.

Otro factor que tampoco se tomó en cuenta es que la enzima de restricción *EcoRV* genera extremos romos sobre el ADN digerido, propiciando que no exista especificidad por parte de los primers entre la secuencia de anclaje y cualquier fragmento de ADN cortado.

Para considerar cualquier producto de iPCR como una región adyacente legítima, requiere la verificación de que el sitio de anclaje de los primers esté verdaderamente adyacente al genoma de la secuencia recuperada. La confirmación debe implicar un experimento simple: por medio de la PCR y usando un nuevo primer para la secuencia externa sobre el sitio de anclaje y un primer que sea específico al ADN genómico adyacente que amplifique el mismo ADN como en la reacción de iPCR, tan larga como la original fuera legítima. Factor que Quist y Chapela no tomaron en cuenta.

Por tanto, Metz y Fütter (2002), concluyeron que el maíz transgénico podría o no hibridar con el maíz criollo en México.

Afirman que si resultara en introgresión de las características GM al maíz criollo y si tal introgresión aportara efectos negativos sobre la diversidad de los cultivos, era sólo especulación. Además, de que no hay evidencia de que los transgenes se fragmenten y dispersen a través de todo el genoma del maíz como Quist y Chapela lo especulaban.

Por su parte Kaplinsky *et al.* (2002), notaron que Quist y Chapela pudieron haber confundido la región genómica del gen *adh1* con una secuencia intron del gen de 160kb. De hecho, aseguran que la región homóloga *adh1* adyacentes a sus productos de amplificación están ubicadas a 40kb del gen *adh1*. Esta



secuencia es un elemento repetitivo que también está presente en otras dos grandes secuencias genómicas que no corresponden a secuencias genómicas codificantes ni de intrones al gen *adh1*.

Sugiriendo que quizá, los productos del iPCR son amplificaciones inespecíficas de los primers utilizados, debido a que 13 de 15 pares bases del primer iCMV2 pueden ser encontrados en secuencias genómicas de otros genes como en el gen *bronze1*. Adicionalmente, los 10 pares base en el extremo 3' del segundo primer utilizado (iCMV1), se pueden encontrar dentro de la misma región genómica del gen *adh1*. Esto representa a sitios falsos de amplificación (denominados K1 y A3, respectivamente), hechos por Quist y Chapela (2001).

Además, los siete pares de bases finales del primer iCMV2 son idénticos al retro-elemento *Opie* del maíz, el cual es la tercera secuencia del i-PCR amplificada, A2. Estos falsos sitios de amplificación se encuentran entre los límites de los primers utilizados y las secuencias genómicas amplificadas, sugiriendo que los elementos móviles existentes en el genoma del maíz tienen una secuencia similar a la secuencia del CaMV. Sin embargo, esto no muestra que los transgenes están dispersos a través de todo el genoma.

Kaplinsky *et al.* (2002), concluyen que dados los resultados y análisis presentados por Quist y Chapela (2001), ninguna de las secuencias adyacentes contienen secuencias obvias de transgenes, la iPCR es muy propensa a generar errores de observación y debido a los múltiples sitios de amplificación falsos presentes en el maíz, hacen muy probable que los productos de la iPCR obtenidos por Quist y Chapela sean solo errores de observación y no secuencias que correspondan a transgenes.

Para corroborar si los resultados de la iPCR fueron malinterpretados, Quist y Chapela (2002), hicieron una nueva prueba de análisis para las muestras colectadas por medio de una hibridación tipo Southern (ADN-ADN).

Con base en este análisis, corroboraron su primer conclusión: existía la presencia de secuencias transgénicas en el ADN de cinco de seis muestras de maíz colectadas en Oaxaca, México.

Cabe mencionar que durante el periodo de revisión del primer trabajo de Quist y Chapela (2001), el gobierno Mexicano a través del Instituto Nacional de Ecología (INE), la Comisión Nacional para el

Uso y Conocimiento de la Biodiversidad (CONABIO) y la Comisión Intersecretarial de la Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM); efectuaron una investigación independiente (Mercer y Wainwright, 2008). Esta investigación realizada en localidades cercanas al lugar de colecta de Quist y Chapela en Sierra Norte, Oaxaca; también confirmó la presencia de ADN transgénico en el maíz criollo en una abundancia relativamente baja. Quist y Chapela (2001), enfatizan mucho los resultados de este trabajo de monitoreo para apoyar su conclusión principal: la presencia de transgenes en el maíz criollo Mexicano de esta región.

Entre los estudios de monitoreo de presencia de ADN transgénico en maíz se encuentran, los ya mencionados de Quist y Chapela (2001, 2002); Otros estudios por parte del INE/CONABIO, organismos de la SEMARNAT a principios del 2000; los realizados por el INIFAP/SAGARPA y la CIBIOGEM/SAGARPA en el 2002; el efectuado por el CYMMYT de 1997 al 2003; el del grupo ETC durante el 2002-2003; los estudios de Ortiz-García *et al.* (2005a, 2005b); el de ENHRUM/UNAM/ECOSUR en el 2002; y el de Serratos-Hernández *et al.* (2007).

Durante el 2003 y 2004, Ortiz-García *et al.* (2005a) realizaron un estudio para detectar la presencia de transgenes en Sierra Norte, Oaxaca; la misma región en la que Quist y Chapela (2001), hicieron el muestreo de maíz criollo y maíz distribuido por Diconsa.

El principal objetivo de Ortiz-García *et al.* (2005a), fue hacer un muestreo más amplio y colectar una gran cantidad de semillas de varias plantas de maíz no relacionadas genéticamente para estimar las frecuencias locales de transgenes en Sierra Norte, Oaxaca.

Durante el 2003 se analizó el ADN de 50,126 granos de maíz de un total de 164 plantas de maíz. Mientras que para el 2004, se analizaron 103,020 granos provenientes de más de 706 plantas de maíz.

Para el análisis y detección de transgenes en los granos de maíz colectados, las muestras fueron enviadas a dos diferentes laboratorios (Genetic ID y GeneScan). La detección de la posible presencia de transgenes en las muestras de maíz, se efectuó empleando primers para el promotor 35S y el terminador NOS; elementos reguladores genéticos presentes en todos los eventos de transformación del maíz en aquel momento (Ortiz-García *et al.* 2005a).

Ortiz-García *et al.* (2005a) reportan que todos los resultados de las pruebas de detección de transgenes en el maíz criollo colectado resultaron negativos.

Para determinar la probabilidad de haber fallado en el muestreo de maíz criollo para detectar semillas transgénicas en cada localidad y año, dado el esfuerzo de muestreo, Ortiz-García *et al.* (2005a) utilizaron dos aproximaciones estadísticas diferentes.

En la primera aproximación se consideró a todas las semillas de maíz colectadas de la misma mazorca como muestras independientes, suponiendo que, los estilos de las mazorcas recibieron polen de distintas plantas paternas de maíz. Mientras que en la segunda aproximación se consideró a las semillas colectadas de la misma mazorca como eventos no independientes dado que la paternidad de la semilla es desconocida, y las mazorcas fueron consideradas como unidades de observación.

Bajo la segunda aproximación Ortiz-García *et al.* (2005a), calcularon la probabilidad binomial de fallar al incluir a una sola semilla transgénica que ocurriese con una frecuencia ( $q$ ) por debajo de 0.01% para cada muestra de semillas  $i$  colectadas en una localidad y año dado. Multiplicando la probabilidad binomial de las  $i$  localidades, calcularon la probabilidad conjunta de fallar al detectar una sola semilla transgénica  $P_{\text{total}}$  (0 inclusiones  $|q = 0.0001$ ) para todas las localidades de un año dado.

Adicionalmente, calcularon la frecuencia ( $q_{0.95}$ ) a la cual se tendría que incluir por lo menos una semilla transgénica con un nivel de confianza del 95% en todas las localidades en cada año. Estos cálculos también se efectuaron con las plantas maternas de maíz como unidades de observación.

Con los resultados de la detección y análisis estadístico, Ortiz-García *et al.* (2005) concluyeron no haber encontrado evidencia del promotor 35S ni del terminador NOS, por tanto, la introgresión del maíz GM en el maíz criollo en Sierra de Juárez, Oaxaca; era inexistente o insignificante.

Incluso a pesar del hecho de que México importaba granos de maíz transgénico para alimento, forraje y procesamiento, y teniendo en cuenta que algunos de estos granos podrían haber sido plantados en los campos de cultivo de los agricultores; la introgresión de los transgenes en la área muestreada aparentaba ser insignificante durante el 2003 y 2004.

Con respecto a los cálculos estimados cuando todas las muestras de granos de maíz colectadas fueron consideradas como observaciones independientes, la probabilidad conjunta de fallar al detectar una sola semilla transgénica en las localidades fue de 0.00665 en 2003 y 0.00003 en 2004, asumiendo que la verdadera frecuencia de las semillas transgénicas fuera por lo menos de 0.01% [ $P_{\text{total}}$  (0 inclusión  $|q =$

0.0001]; es decir, las probabilidades conjuntas fueron mínimas cuando se consideraron a través de las localidades en el mismo año.

Los autores además concluyen que con el 95% de nivel de confianza que de haber ocurrido la presencia de semillas transgénicas en la región de estudio, su frecuencia no sería mayor a 0.00006 en 2003 y 0.00003 en 2004. En contraste, cuando Ortiz-García *et al.* (2005a) consideraron a las plantas maternas como unidades de observación sin tomar en cuenta el número de semillas, se estimó con un 95% de nivel de confianza que la frecuencia de mazorcas con por lo menos una semilla transgénica era  $<0.0043$  en 2004 y  $<0.0032$  para ambos años combinados.

Según Ortiz-García *et al.* (2005a), la máxima frecuencia de semillas transgénicas reportadas en el estudio, debería caer en algún punto entre los estimados para las semillas y los estimados para las plantas de maíz maternas. Este valor estimado debería estar cercano a 0.0001 (0.01%), ya que se espera que varias semillas de la misma mazorca fueran fecundadas por el polen de diferentes plantas paternas.

Asumiendo que los transgenes estuvieron presentes anteriormente (como lo indica el reporte de Quist y Chapela, 2001); con base en sus propios resultados y estimaciones reportados, Ortiz-García *et al.* (2005a), concluyen que varios mecanismos debieron haber prevenido la persistencia de transgenes en el maíz criollo a frecuencias detectables. Probablemente, las recomendaciones que se les hicieron a los agricultores sobre el maíz transgénico en la misma región de Sierra Norte, al hecho de que los transgenes pudieron haberse retrocruzado con las poblaciones de maíz criollo, a la deriva génica, o incluso, si los transgenes disminuyeron la adecuación de las plantas de maíz receptoras; tanto los agricultores como factores ambientales podrían haberlos seleccionado en contra, de tal forma que para el 2003-2004 sus frecuencias fuesen extremadamente bajas e indetectables.

También concluyeron que es improbable que la presencia de una frecuencia tan baja de transgenes afecte negativamente la diversidad genética de las poblaciones de maíz criollo y aunque los transgenes son raros o estén ausentes en el área muestreada, los resultados no deberían ser extrapolados a otras regiones de México; y por tanto, consideran que es necesario efectuar estudios de monitoreo y detección de maíz transgénico en otras regiones del país (Ortiz-García *et al.* 2005a).

La publicación del trabajo de Ortiz-García *et al.* (2005a), fue criticada por Cleveland *et al.* (2005). Enfocándose principalmente a la metodología estadística y las conclusiones a las que llegaron Ortiz-García *et al.* (2005a).

Cleveland *et al.* (2005), argumentan que si el objetivo del muestreo hubiese sido determinar la presencia/ausencia de transgenes en un área determinada, las poblaciones de maíz criollo deberían haber sido analizadas con una alta probabilidad de contenerlos. Afirmaron que si lo que se requiere es determinar la frecuencia de transgenes dentro de las poblaciones de maíz criollo; entonces, es necesario utilizar una metodología de muestreo que maximice la probabilidad de encontrar alelos raros en la población de referencia, y que el tamaño de muestra debería ser representativo de la población. Argumentaron que para un número dado de semillas colectadas era importante tomarlas de un número máximo de unidades de muestra a cada nivel (parcelas, plantas de maíz, mazorcas).

Cleveland *et al.* (2005) hicieron las estimaciones con base en los informes del INEGI y observaron que la representatividad de las localidades reportadas y muestreadas por Ortiz-García *et al.* (2005a), tan sólo representaban el 0.15%, 2.46% y 9.94% a nivel estatal, regional y de distrito.

En cuanto al número de parcelas muestreadas, Ortiz-García *et al.* (2005a) reportaron 81 parcelas, que representan un 0.02%, 0.23% y 1.14% de todas las parcelas a nivel estatal, regional y de distrito. Además, Cleveland *et al.*, consideran que el número de parcelas, mazorcas y semillas muestreadas por localidad se efectuó de manera desigual, con rangos de 4-8 parcelas/comunidad, 4-13 mazorcas/parcela y 117-206 semillas/mazorca; siendo el Coeficiente de Varianza de 19.7%, 21% y 16.1% respectivamente.

Debido a que en el estudio de Ortiz-García *et al.* (2005a) se muestrearon un gran número de semillas ( $n=103,620$ ) de un pequeño número de mazorcas (765), Cleveland *et al.*, hicieron los cálculos de  $N_e$  para las semillas colectadas de Ortiz-García *et al.* (2005a); notaron que el  $N_e$  de sus muestras (2,972) es mucho más pequeño que el tamaño de muestra ( $n=103,620$ ); esto implica que los cambios aleatorios en la frecuencia alélica que afectan la representatividad genética de la población no podrían ser cuantificados ni predichos de manera efectiva.

Cleveland *et al.* (2005), argumentan que dependiendo del conocimiento que se tenga de la estructura genética de la población de referencia (o en la metapoblación de referencia) se debía de determinar el nivel al cual el tamaño efectivo de población debería ser calculado para la muestra en particular.

Aseguran que a menos que el muestreo este basado en el conocimiento específico de la estructura genética de la meta población,  $N_e$  debe ser calculada para cada población de una metapoblación, estos valores de  $N_e$  por localidad no pueden ser sumados para estimar a la metapoblación tal y como lo hicieron Ortiz-García *et al.* (2005a).

Para Cleveland *et al.* (2005), la estructura de la meta población de Ortiz-García *et al.* (2005), era desconocida, es decir, que el grado de divergencia entre las poblaciones de maíz de las 16 localidades muestreadas en 2004 no fueron evaluadas, y por tanto,  $N_e$  debió ser calculado a nivel de cada localidad por separado, asumiendo que no existía divergencia intra-local significativa. Por tanto, estos autores aseveran que para cada población de referencia, el muestreo de Ortiz-García *et al.* (2005a) debió de haber maximizado el número de unidades (parcelas/localidades, mazorcas/parcelas, etc.) muestreadas a cada nivel, siendo consistente con muestras balanceadas (utilizando la misma cantidad de parcelas, mazorcas y semillas en cada comunidad); y utilizando  $N_e$  y no  $n$ , como base para la estimación de frecuencias de alelos raros en las poblaciones de maíz criollo. Esto es, a favor del argumento de que si  $n$  es usado, los resultados aplican únicamente a la probabilidad de fallar al detectar semillas transgénicas en la muestra de semillas, sin dar resultados sobre la frecuencia de transgenes en las poblaciones, y por tanto,  $n$  no contribuye al entendimiento de la dinámica del flujo de transgenes en las poblaciones de maíz criollo.

Por otra parte, con la hipótesis alternativa de que la frecuencia real de las semillas transgénicas fuese de 0.0001, Ortiz-García *et al.* (2005a) estimaron la probabilidad conjunta de fallar al detectar una sola semilla transgénica en cualquier localidad. El resultado de la estimación fue de 0.00003 para el 2004, considerando que las semillas que analizaron eran observaciones independientes.

Cleveland *et al.* (2005), al hacer los cálculos utilizando  $N_e$ , observan que el rango de probabilidades para fallar al detectar transgenes en las poblaciones de maíz transgénico muestreadas en el 2004 si estuviesen presentes a 0.0001, sería de un rango de probabilidades entre 0.969-0.991 para cada comunidad. Cleveland *et al.*, concluyeron que este es el rango de valores correctos para fallar al detectar por lo menos una sola semilla transgénica por localidad conforme a los datos reportados por Ortiz-García *et al.* (2005a).

Con base en esta observación, Cleveland *et al.* (2005), sugiere que el análisis reportado por Ortiz-García *et al.* (2005a) muestra que los transgenes probablemente no estén presentes en las comunidades

muestreadas a una frecuencia mayor de 1-4%; aún así, declaran que cabe la posibilidad de que varias plantas transgénicas podrían estar aún presentes y sin ser detectadas en dichas comunidades.

Cleveland *et al.* (2005), indicaron que para obtener resultados confiables en los estudios posteriores de monitoreo y detección de transgenes, se debería:

- a) Entender el sistema local de semillas, incluyendo la forma en la que las prácticas de manejo de las semillas por los agricultores afectan la estructura y dinámica de las poblaciones de maíz criollo.
- b) Colectar pequeñas cantidades de semillas de maíz de un gran número de mazorcas para optimizar  $N_e/n$ .
- c) Minimizar la varianza, colectando la misma cantidad de unidades en todos los niveles.
- d) Usar  $N_e$  en vez de  $n$ , para calcular probabilidades binomiales que determinen la presencia/ausencia de transgenes.

La última conclusión de Cleveland *et al.* (2005) fue que aunque los transgenes pudieran estar presentes hoy en día dentro de las poblaciones de maíz criollo, aún no se contaba con evidencia científica contundente para concluir su presencia o ausencia en los últimos años en el estado de Oaxaca, o en la región de Sierra de Juárez. Por tanto, afirmaron que no había justificación para hacer inferencias sobre la frecuencia de transgenes en el maíz criollo de las comunidades muestreadas en Ixtlán de Juárez, en el distrito de Sierra de Juárez, o sobre los posibles efectos que traería la presencia de transgenes en el maíz criollo.

En respuesta a las críticas y preocupados por el hecho de que algunos científicos y agencias de gobierno malinterpreten las conclusiones de su trabajo, Ortiz-García *et al.* (2005b) reiteraron que el monitoreo de maíz criollo en el distrito de Sierra de Juárez, no fue llevado a cabo para monitorear las frecuencias de transgenes. Más bien, declaran que el objetivo del estudio fue inspeccionar elementos transgénicos en el maíz criollo y evaluar la persistencia de los transgenes en las siguientes generaciones en la misma área en la que Quist y Chapela (2001) y las tres agencias del gobierno encontraron transgenes durante el periodo 2000-2001.

Aunque Ortiz-García *et al.* (2005b) están de acuerdo con Cleveland *et al.* (2005) cuando argumentan que el censo de tamaño poblacional de las semillas colectadas era inapropiado para estimar

probabilidades que detectaran alelos raros debido a que el tamaño poblacional ( $n$ ) es mucho más grande que el tamaño efectivo de población de la muestra ( $N_e$ ). Ortiz-García *et al.*, indican que en su análisis intentaron compensar este hecho debido a que desconocían si las semillas de la misma mazorca fueron engendradas por la misma planta paterna, para esto, utilizaron los dos análisis estadísticos reportados (Ortiz-García *et al.* 2005a).

En su primer análisis, Ortiz-García *et al.* (2005b) indican que las semillas tomadas de la misma mazorca fueron consideradas muestras independientes, asumiendo que pudieron recibir polen de diferentes plantas paternas. Reconociendo que este supuesto pudo haber ampliado el tamaño efectivo de población e introducir sesgo en el análisis, efectuaron un segundo análisis, en el que se consideraron a todas las semillas de la misma mazorca como muestras no independientes, dado que su paternidad no era conocida, y usaron a las mazorcas como unidades de observación.

Aunque Ortiz-García *et al.* (2005a) no calcularon  $N_e$ , usaron una prueba estadística robusta para compensar el posible sesgo en la estimación de la población de semillas al usar simplemente el tamaño de población ( $n$ ). Esta segunda aproximación, aunque probablemente fue conservadora, les otorgó un estimado robusto del número mínimo de observaciones independientes en el estudio.

Ortiz-García *et al.* (2005b), admiten que la recomendación de utilizar la varianza del tamaño efectivo de población ( $N_{e(v)}$ ), es excelente para medir la representatividad genética de una muestra dada de semillas; mientras que para contar el parentesco entre las semillas de la misma mazorca, se debería usar la fórmula para la varianza del tamaño efectivo de población derivada de Hernández y Crossa (1993) y Vencovsky y Crossa (1999):  $N_{e(v)} = n / [((n-1)/4m) + 1]$ . Por ello, analizaron su información bajo la recomendación de Cleveland *et al.* (2005); y observaron que por medio de la varianza del tamaño efectivo de población, llegaron a la misma conclusión básica que reportaron anteriormente en Ortiz-García *et al.* (2005a).

Usando  $N_{e(v)}$  y la probabilidad binomial para cada una de las 16 localidades se estimó la frecuencia mínima detectable para cada localidad con un 95% de nivel de confianza. De esta forma, Ortiz-García *et al.* (2005b) argumentaron estar seguros con un nivel de confianza del 95%, de que habrían detectado semillas transgénicas si estas estuviesen presentes a una frecuencia mayor a 1-2% en cada localidad, excepto en una, en la que solo se colectaron 21 mazorcas, siendo el límite de detección para esta localidad de 3.6%.



Cleveland *et al.* (2005), destaca el hecho de que es inapropiado combinar información de múltiples localidades, debido a que la estructura genética de la metapoblación es desconocida, haciendo que sea imposible estimar adecuadamente  $N_{e(v)}$  de todas las localidades en su conjunto. Cleveland *et al.*, concluyen que  $N_e$  debe ser calculado para cada localidad de toda la meta población y que  $N_e$  no puede ser usado para estimar la meta población.

Sin embargo, Ortiz-García *et al.* (2005b), consideran que esto sería muy conservador por dos razones en respuesta a los comentarios de Cleveland, *et al.*:

- a) Los números de una población no pueden ser sumados para estimar a la metapoblación, y por tanto, hay una probabilidad total que no puede ser estimada para todas las localidades en conjunto.

Ortiz-García *et al.* (2005b), multiplicaron las probabilidades de cada localidad para obtener una probabilidad total de fallar repetidamente al detectar semillas transgénicas a frecuencias por debajo de un umbral determinado. Esto se hizo bajo el supuesto de que la probabilidad calculada para cada localidad fue metodológicamente independiente de otras localidades, y en donde todas eran parte del mismo diseño experimental.

- b) Si se aceptase el argumento de que un análisis estadístico conjunto no es adecuado para estimar por separado  $N_{e(v)}$ , otros métodos de meta análisis están disponibles para combinar los resultados de varias pruebas separadas.

Para abordar el asunto sobre la validez de calcular una probabilidad conjunta basada en  $N_{e(v)}$  para todas las localidades, Ortiz-García *et al.* (2005b) reportaron haber usado 2 métodos estadísticos: la probabilidad combinada, en las que las localidades se consideraron para representar sub muestras independientes de la misma muestra, y una prueba más conservativa, la de Fisher, en la que se asume que las localidades derivan de pruebas independientes diferentes.

Para una serie de  $l$  localidades, la probabilidad total combinada  $P$  de fallar repetidamente al detectar un transgen que esta regionalmente presente a una frecuencia  $f$  puede ser estimado como un producto de todas las probabilidades en las localidades:  $P = \prod p_i$ . Asumiendo que las probabilidades individuales provienen de pruebas independientes dentro del mismo diseño de muestreo, esta probabilidad total

puede ser usada como una estimación de la probabilidad combinada que establece ser una hipótesis verdadera (Ortiz-García *et al.* 2005b).

Por el otro lado, la prueba combinada de probabilidad de Fisher, que se deriva de la transformación logarítmica de la probabilidad total ( $L = -2 \ln(P)$ ), y como en todos los estimados de probabilidad logarítmica, es distribuido como  $\chi^2$  con grados de libertad igual a 2 veces el número de localidades.

Ortiz-García *et al.* (2005b) sugieren la prueba de Fisher; prueba que es usada para estimar la relevancia de la probabilidad total cuando pruebas separadas son combinadas y están todas probando la misma hipótesis y en donde un análisis conjunto no es considerado apropiado.

Siguiendo el análisis propuesto por Cleveland *et al.* (2005), Ortiz-García *et al.* (2005b) aplicaron los cálculos basados en  $N_{e(v)}$  a los datos que obtuvieron en el 2004 para diferentes valores hipotéticos de  $f$  y para todas las localidades.

Cuando Ortiz-García *et al.* (2005b), calcularon solamente la probabilidad combinada ( $P$ ) para todas las localidades, los resultados mostraron que si las semillas transgénicas estuviesen presentes en la región a frecuencias mayores de 1 en mil ( $f > 0.001$ ) se hubiesen detectado con un 5% de probabilidades conjuntas de fallar.

Sin embargo, cuando Ortiz-García *et al.* (2005b) asumieron que las localidades no eran independientes y se aplicó la prueba de Fisher con probabilidad algorítmica, el nivel de detección mínimo para semillas transgénicas a lo largo de las localidades fue cercana a 1 en cien (0.0077). Con base en esto, concluyeron que no se tenía el suficiente conocimiento sobre la relación génica de las muestras de diferentes localidades en el área de estudio para juzgar si esta prueba conservativa está garantizada o no.

Las probabilidades de detección estimadas obtenidas usando el tamaño efectivo de población muestra una mayor probabilidad de fallar al detectar transgenes, que los valores obtenidos tomando semillas individualmente como unidades de observación, pero a una menor probabilidad de fallar que la de los umbrales reportados para las plantas maternas (el estimado más conservativo de Ortiz-García *et al.* 2005b).

Los valores obtenidos al usar la probabilidad combinada de la pruebas de Fisher concuerdan con la conclusión inicial de Ortiz-García *et al.* (2005a) de que la máxima frecuencia de semillas transgénicas

en el estudio debería caer en algún punto entre las estimaciones para las semillas y las estimaciones para las plantas.

Con referencia a la crítica de que  $N_e$  (2972) es más pequeño que  $n$  (103,620), Ortiz-García *et al.* (2005b) estuvieron de acuerdo y por este motivo efectuaron el segundo análisis usando las mazorcas como unidades de observación más que como semillas. Aún usando esta aproximación estadística conservativa, Ortiz-García *et al.* (2005b) estimaron con un 95% de nivel de confianza que la frecuencia de mazorcas con por lo menos una semilla transgénica está por debajo de 0.004 para 2004 y menos de 0.003 para ambos años combinados.

A pesar de no haber detectado transgenes en el maíz criollo, admiten la posibilidad de que los transgenes podrían estar aún presentes en la región, aunque a frecuencias muy bajas y por debajo del umbral de detección del muestreo durante el 2003-2004.

Ortiz-García *et al.* (2005b) mencionan que es imposible demostrar que los transgenes están ausentes en una región dada con un nivel de confiabilidad del 100%; y que las consecuencias del maíz transgénico sin detectar, aún a frecuencias extremadamente bajas, podrían traer efectos biológicos y socioeconómicos.

También reconocieron que se requiere mayor información de campo y monitoreo extensivos que ayuden a entender el movimiento de los transgenes y aclarar algunas preguntas existentes sobre la posible persistencia de transgenes en los cultivos de maíz criollo en Ixtlán de Juárez y en otras regiones de México.

Otro esfuerzo de monitoreo y detección de maíz transgénico en México, lo realizaron Serratos-Hernández *et al.* (2007). El objetivo de este estudio fue explorar el estatus del maíz transgénico en el área de suelo de conservación del Distrito Federal y evaluar la viabilidad de su propio monitoreo para la detección de transgenes.

La colecta de muestras la realizaron aleatoriamente de 75 parcelas de maíz dentro del área de conservación de suelo en el DF. Únicamente 42 de 1115 granjeros (3.72%) que comprenden esta área, estuvieron de acuerdo en participar en el estudio. Los agricultores que participaron representaban 25 comunidades y en promedio, el tamaño de sus parcelas era de 1.72 ha.

Dentro de cada parcela, cinco sitios de muestreo fueron elegidos y en ellos se colectaron hojas de plántulas de entre 60-65 días de haber sido sembradas. En total entre 20-25 plantas fueron muestreadas en cada una de las 42 parcelas, dando un total de 208 muestras, que figuraron de 1040 plantas de maíz. Serratos-Hernández *et al.* (2007), también realizaron encuestas a los agricultores para obtener información sobre la producción, manejo, uso del maíz, el origen y destino de la semilla en la región.

El método de detección se llevó a cabo mediante la prueba de inmunoensayo de ELISA para detectar las proteínas de origen recombinante CP4 EPSPS, Cry1Ab/Ac y Cry9C. El evento apilado CML72xCML216 y las líneas parentales no transformadas, fueron utilizados como controles positivos y negativos respectivamente para las pruebas de ELISA.

Una línea de maíz resistente a glufosinato de amonio generado en el CIMMYT, fue utilizado como control negativo adicional, ya que no se esperaba reacción alguna con el análisis de inmunoensayo para esta línea.

Para detectar proteínas transgénicas de los tejidos de las hojas de maíz, los investigadores emplearon kits de AGDIA siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante para detectar: maíz tolerante a herbicidas que contuviesen el transgen CP4 EPSPS que confiere tolerancia al glifosato; las  $\delta$ -endotoxinas Cry1Ab/Ac y Cry9C que proveen resistencia contra lepidópteros.

Como resultado, Serratos-Hernández *et al.* (2007) reportan que los controles negativos fueron consistentemente no reactivos a la enzima de inmunoensayo para la proteína particular analizada. En cuanto a las muestras colectadas no hubo detección positiva de proteínas Cry9C en ninguna de las muestras de maíz; sin embargo, una muestra de la delegación Milpa Alta fue positiva para la proteína Cry1Ab/Ac, y otra muestra de la delegación Magdalena Contreras resulto ser positiva para las proteínas Cry1Ab/Ac y CP4 EPSPS.

Serratos-Hernández *et al.* (2007) concluyen que las pruebas de ELISA no son adecuadas para argumentar conclusiones definitivas, ya que no proveen información sobre las secuencias transgénicas de un cultivo. Sin embargo, también reconocieron que las pruebas de ELISA detectaron exitosamente proteínas Cry1Ab/Ac y CP4 EPSPS.

De igual forma, concluyeron que era necesario efectuar técnicas moleculares complementarias para detectar variedades de maíz transgénico en los laboratorios, tales como la PCR, pues la expresión de

ciertas proteínas puede llegar a inhibirse debido a diferentes factores ambientales en donde crecen los cultivos; lo cual, se traduce en falsos negativos con las pruebas de ELISA.

Ya que existen diversas formas en las que el maíz GM pudo entrar al área de suelo de conservación en el DF, Serratos-Hernández *et al.* (2007) sugirieron que se necesita reexaminar el fenómeno de flujo génico de transgenes en México.

Un trabajo más reciente es el de Piñeyro-Nelson *et al.* (2009). El objetivo de este trabajo fue corroborar presencia de transgenes en el maíz criollo en algunas comunidades de Oaxaca, México colectadas en los años 2001, 2002 y 2004, así como presentar un análisis de los actuales métodos de muestreo y moleculares usados en el monitoreo genético de transgenes, y dar una visión sobre las actuales limitantes durante la detección de transgenes en campo.

Piñeyro-Nelson *et al.* (2009), reportaron haber trabajado con diferentes muestras de maíz colectadas en diferentes años. La primer colección de maíz reportada, corresponde al 2001 y fue colectada por la CONABIO y el INE en 23 localidades: dos en Puebla, una al sur de Oaxaca, 18 de Sierra de Juárez en Oaxaca, una muestra de un mercado de semillas y una muestra de la distribuidora Diconsa.

En cada localidad, se colectaron de una a cinco mazorcas por hogar. Todas las muestras colectadas, excepto las obtenidas de Diconsa, fueron identificadas como maíces criollos.

Otro conjunto de muestras de maíz se obtuvieron durante el 2002, como parte de un estudio socioeconómico en 9 localidades de Sierra de Juárez, Oaxaca; y de 4 municipios más: Ixtlán de Juárez, Santa Catarina Ixtepeji, Tlaxiactac de Cabrera y Calpulalpan.

Las mazorcas fueron colectadas aleatoriamente de plantas en pie (9 mazorcas/parcela), o en su defecto, de mazorcas almacenadas en el hogar del agricultor (6 mazorcas/variedad). En total, 117 lotes de semilla/parcelas fueron muestreados, dando un total de 682 mazorcas.

Los autores realizaron otro muestreo en dos localidades de la región de Sierra de Juárez en 2004 para complementar las colectas. Estas dos localidades fueron muestreadas previamente en el 2001 y se reportaron resultados positivos al promotor 35S en el maíz colectado, motivo por el cual se volvieron a muestrear ambas localidades en 2004.

En cada una de estas localidades, 30 parcelas fueron muestreadas; de cada parcela se escogieron al azar 300 hojas de diferentes plantas de maíz en pie.

Para el análisis molecular de las muestras colectadas en 2001, un número igual de semillas de cada mazorca fue enviada a los laboratorios del IE UNAM y del CINVESTAV-I. Todo el proceso de análisis fue llevado a cabo de manera independiente en cada uno de los laboratorios (siembra y germinación de las semillas de maíz, extracción de ADN a partir de las hojas de las plántulas de maíz y análisis de PCR).

Los primeros análisis de PCR desarrollados de manera independiente en cada laboratorio mostraron que en 10 localidades por lo menos había una plántula positiva al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. El tejido y ADN de las plántulas se agotó en las pruebas, por lo que hubo que sembrar un nuevo conjunto de semillas de las mismas mazorcas previamente analizadas para hacer un segundo análisis.

Piñeyro-Nelson *et al.* (2009), consideraron como positivas a todas aquellas muestras que presentaran bandas claras y definidas para el promotor 35S (banda de 195pb) en por lo menos 3 ensayos independientes (extracción de ADN y reacción de PCR) en una primera y segunda ronda de análisis por cada muestra.

Las muestras de semillas de maíz obtenidas en 2002, fueron enviadas a los laboratorios Genetic ID (GID) y el investigador Paul Gepts (PG) para su análisis molecular. Para los análisis de PCR en los laboratorios de GID y PG se prepararon estándares internos y externos. Los estándares internos se prepararon a partir del evento Bt11 de Syngenta a concentraciones de 0%, 1%, 5%, 10% y 100%; el evento Bt11 contiene los elementos 35S y Nos. Los estándares externos fueron elaborados a partir del evento MON810 y de una línea no transgénica (DK512) a 0%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2% y 5%; los estándares externos solo contenían al promotor 35S.

Las muestras de 2001 se analizaron en el IE UNAM y el CINVESTAV-I, la extracción de ADN se hizo con base en los protocolos de laboratorio del CIMMYT. Los controles positivos fueron los eventos MON810, NK603 y el plásmido pMON18770. Todos estos eventos poseen el promotor 35S y solo el evento NK603 contiene el terminador Nos. Los primers utilizados fueron el p35S (que amplifica una secuencia de 195pb) y NOST (que amplifica una secuencia de 118pb).

En todos los casos, los productos de la PCR se corrieron en geles de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio. Para considerar una muestra como positiva a algún elemento transgénico en el IE UNAM y CINVESTAV-I, las muestras debían de presentar bandas claras y definidas para el promotor 35S y/o el terminador Nos, en por lo menos 2 ensayos independientes (extracción de ADN y reacción de PCR) en una primera y segunda ronda de análisis para las muestras.

Para confirmar todos los resultados positivos de la PCR, se efectuó un análisis de Southern Blot con 20µg de ADN. Mientras que las muestras de 2004, solo se analizaron en la UNAM y no se hizo ningún ensayo de confirmación.

Por su parte, las muestras del 2002 enviadas a los laboratorios PG y GID solo fueron consideradas como positivas, aquellas muestras que presentaran cierta intensidad en la banda del producto de la PCR. De ser positiva la muestra, se comprobó que la amplificación fuese consistente por medio de un duplicado del ensayo.

Conforme a los resultados reportados, se encontró evidencia para la presencia del promotor 35S en 10 muestras de dos localidades de la colecta del 2001. Posteriormente, en el 2004, Piñeyro-Nelson *et al.* (2009), hicieron una nueva colecta en estas dos localidades para observar si había persistencia del promotor 35S en el maíz. Las nuevas colectas consistieron en obtener 300 hojas de plantas de maíz por parcela, en total, se muestrearon 30 parcelas con plantas de maíz por localidad. De esta nueva colecta, se detectó la presencia del promotor 35S en 11 de las 60 parcelas muestreadas.

Con base en estos resultados, Piñeyro-Nelson *et al.* (2009) argumentan haber encontrado evidencia irrefutable de la presencia de transgenes en Oaxaca en el 2001. Con base en los análisis de Southern Blot, aseveraron que su información sugiere que los transgenes estuvieron presentes en su muestra a una frecuencia de 0.0089; que coincide con lo predicho por Ortiz-García *et al.* (2005a; 2005b).

Los análisis de lotes de semillas del 2002 en los laboratorios GID y PG no mostraron evidencia de transgenes en las muestras analizadas. En contraste, un muestreo dirigido en el 2004 de 60 parcelas en dos de las mismas localidades que dieron resultados positivos a transgénicos en el 2001, proporcionaron evidencia de persistencia de transgenes o reintroducción en 11 parcelas. Aunque se cree que la reintroducción es menos probable que la persistencia de los transgenes en el maíz criollo (Piñeyro-Nelson *et al.* 2009).

Al haber comparado sus resultados con los de Quist y Chapela (2001) y los de Ortiz-García *et al.* (2005a), Piñeyro-Nelson *et al.* (2009) sugieren que existen tres factores principales que contribuyen a la variación de los resultados en la detección de transgenes:

- a) Los falsos negativos en las pruebas de laboratorio que influyen en los resultados, aun cuando los transgenes están presentes en las muestras analizadas.
- b) El diseño del muestreo, como la fuente más probable para hacer que los resultados en la detección difieran.
- c) Existen simulaciones con base en la fenología del maíz que explican porque la distribución de transgenes en una metapoblación no es homogénea.

Finalmente, Piñeyro-Nelson *et al.* (2009) concluyen que sus resultados sugieren que los transgenes están presentes a frecuencias relativamente bajas y que es necesario efectuar una mayor investigación que permita entender la dinámica de las diferentes metapoblaciones de maíz presentes en diferentes regiones de México con diferentes estrategias de manejo de los acervos de semillas de maíz, así como conocer a detalle la fenología de estas metapoblaciones, con el fin de elaborar esquemas de muestreo que permitan estimar de manera más confiable la frecuencia de transgenes en el maíz criollo mexicano.



## Justificación

El monitoreo de OGMs abarca todas aquellas actividades encaminadas a establecer su presencia así como los efectos que pueda ocasionar la liberación deliberada, involuntaria o accidental de estos organismos sobre la diversidad biológica, el medio ambiente, la sanidad animal, vegetal y acuícola, tomando también en consideración aspectos socioeconómicos y aspectos de la salud humana (LBOGM, 2005). El monitoreo realizado por Quist y Chapela (2001), sugiere que al haber presencia de transgenes en el maíz criollo en una región remota y de difícil acceso, hace más probable su presencia en zonas de fácil acceso en nuestro país. Por su parte, el monitoreo de Ortiz-García *et al.* (2005a), sugiere que aunque los transgenes estén ausentes en una región determinada, dichos resultados no deben ser extrapolados a otras regiones de México; de igual forma, no se debe afirmar que la ausencia de transgenes en una región determinada se mantenga a lo largo del tiempo. Ortiz-García *et al.* (2005b) consideran importante aumentar el esfuerzo de monitoreo, a la par del aumento de los eventos de maíz GM desarrollados, especialmente cuando México aún no haya aprobado su liberación al ambiente en etapas distintas a la experimental. Por estas razones, es importante seguir realizando estudios de monitoreo y detección de maíz GM en poblaciones de maíz en diferentes puntos espaciales y temporales de México.

Recientemente se han dado permisos para la experimentación con maíz transgénico en el norte del país, en los estados de Sonora, Sinaloa y Tamaulipas. Por el momento, son cerca de 14 ha en las que se está experimentando con esta tecnología. Sin embargo, para otros estados como Michoacán de Ocampo, es de relevancia conocer la situación actual del maíz, dado que hay 29 eventos maíz GM autorizados para su comercialización y consumo en México; ya que estos granos podrían utilizarse como semillas por los productores de maíz (CIBIOGEM, 2012), a través del sistema informal de semillas y los mercados de grano, como se describe en la dinámica de semillas descrita por Dyer *et al.* (2009).

El presente trabajo se llevó a cabo en las comunidades del municipio de Erongarícuaro, Michoacán. Tiene como finalidad apoyar al Instituto Nacional de Ecología (INE, SEMARNAT), en los proyectos de monitoreo de maíz transgénico en el país para detectar introducciones accidentales o intencionales de transgenes en el maíz criollo. Ya que por principio precautorio, en la legislación nacional se prohíbe la siembra de maíz GM sin previo permiso de las autoridades competentes. La relevancia de este estudio de monitoreo y detección es significativa, no solo por lo mencionado anteriormente, sino también por ser el primer estudio de este tipo que se realiza en el estado de Michoacán.

## **Objetivos**

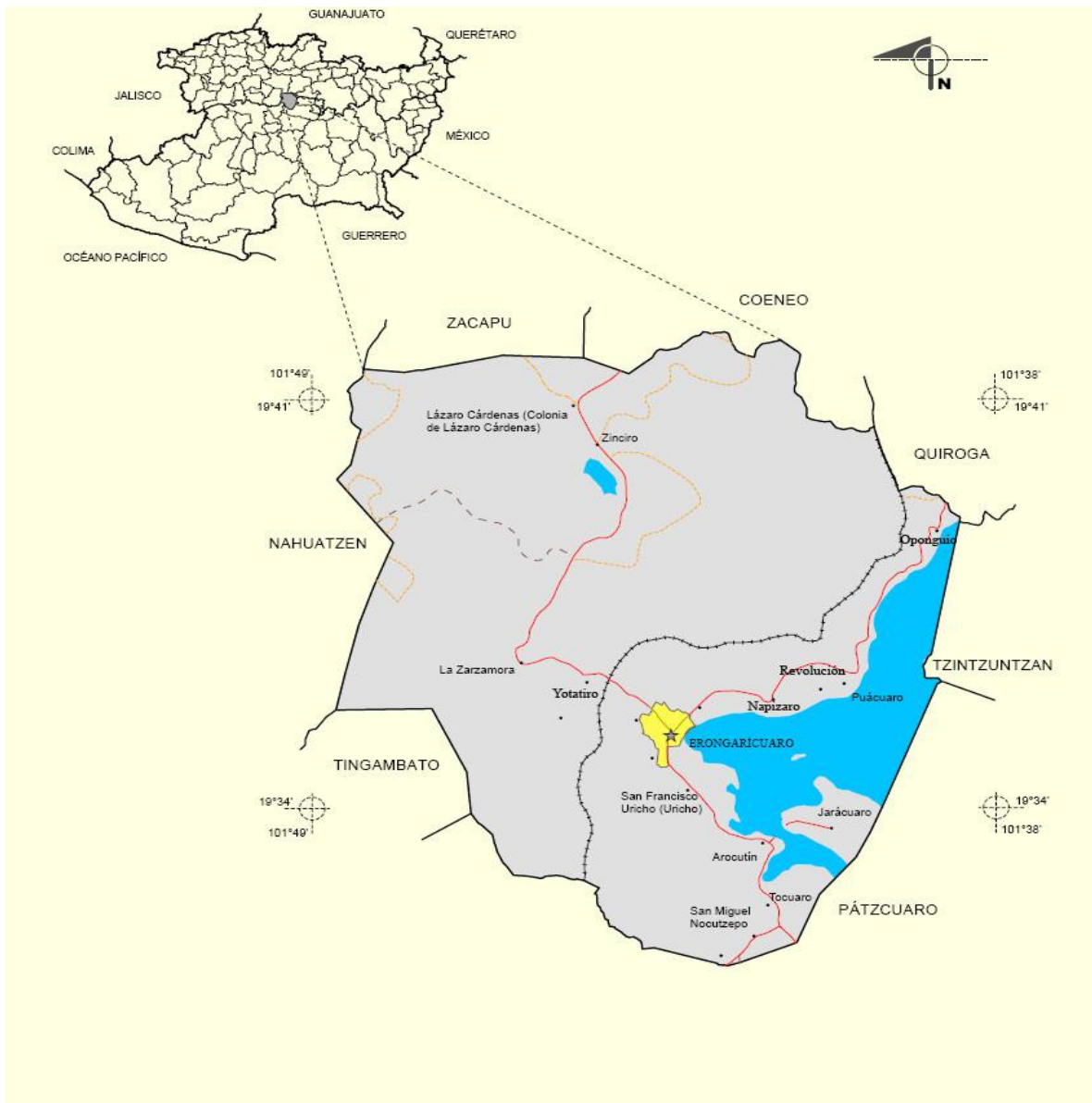
Objetivo general:

- Detectar la presencia/ausencia de maíz transgénico en granos muestreados de las comunidades que comprenden al municipio de Erongarícuaro, Michoacán.

Objetivos particulares:

- Inferir las posibles vías de introducción de maíz potencialmente transgénico, así como los métodos de su dispersión por la acción humana, a partir de encuestas a agricultores que siembran maíz en la región.
- Conocer las prácticas de manejo agrícola que existen en el municipio.
- Verificar la posible presencia/ausencia de secuencias GM mediante colecta de campo y análisis en laboratorio.

## Lugar de estudio



El municipio de Erongarícuaro se ubica al norte del estado de Michoacán de Ocampo, en las coordenadas  $19^{\circ} 36' 00''$  de latitud norte y  $101^{\circ} 43' 00''$  de longitud oeste, a una altura de 2,100 metros sobre el nivel medio del mar.

El municipio colinda al norte con los municipios de Zacapu, Coeneo; al este con los municipios de Quiroga, Tzintzuntzan y Pátzcuaro; al sur con el municipio de Pátzcuaro; y al oeste con los municipios de Tingambato y Nahuatzen.

Las comunidades que conforman al municipio de Erongarícuaro son: Erongarícuaro (cabecera municipal), La Tenencia Lázaro Cárdenas, Zinciro, La Zarzamora, Yotatiro, San Francisco Uricho, Arocutín, Tocuaro, Jarácuaro, San Miguel Nocutzepo, Napizaro, Oponguio, Puácuaro y Colonia Revolución. El municipio de Erongarícuaro ocupa el 0.42% de la superficie del estado; y tiene una población total de 12, 686 habitantes.

## **Características físicas**

### **Topografía**

El INEGI (2009), reporta que la fisiografía del municipio de Erongarícuaro corresponde a la provincia del eje Neovolcánico (100%), y a la subprovincia Neovolcánica tarasca (100%). El sistema de topoformas consiste de una Sierra volcánica con estrato volcanes o estrato volcanes aislados con llanuras (87.87%), Vaso lacustre (3.99%) y llanura aluvial (0.17%). En cuanto a altitud, el punto más bajo en el municipio es de 2100msnm y el punto más alto es de 3200msnm.

Su geología corresponde al periodo Plioceno-Cuaternario (62.61%), Cuaternario (21.98%) y Neógeno (3.63%). El tipo de roca que predominan son rocas ígneas extrusivas, conformadas por: basalto (63.30%), basalto-brecha volcánica básica (8.45%), brecha volcánica básica (6.36%) y basalto-toba básica (2.01%).

### **Clima**

El INEGI (2009), define el clima del Municipio como templado subhúmedo con lluvias en verano. El rango de temperaturas oscila entre los 5 a 26 grados centígrados. El municipio tiene una precipitación pluvial promedio anual de 1,040.8 milímetros cúbicos.

## **Hidrología**

Los lomeríos y las depresiones topológicas del municipio aunadas a las lluvias de verano conforman el cauce para ríos intermitentes, como el Huinchu, que desembocan en el lago de Pátzcuaro.

El 10.88% del lago de Pátzcuaro corresponde al municipio de Erongarícuaro como el único cuerpo de agua perenne.

El municipio de Erongarícuaro pertenece a la región hidrológica de Lerma-Santiago, a la cuenca del lago Pátzcuaro-Cuitzeo y el Río Lerma-Chápala. A su vez pertenece a la subcuenca del lago de Cuitzeo y el río Angulo (INEGI, 2009).

## **Suelo**

El INEGI (2009), reporta que los tipos de suelos que conforman al municipio de Erongarícuaro son: Andosol en un 61.10%, Durisol en un 9.38%, Cambisol en un 6.27%, Leptosol en un 5.74%, Luvisol en un 2.97%, Gleysol en un 1.39% y Planosol en un 0.48%.

Aguilera (1989), describe estos tipos de suelos de la siguiente manera:

Los andosoles son suelos derivados de cenizas volcánicas recientes, muy ligeros y con alta capacidad de retención de agua y nutrientes; aunque son altamente susceptibles a la erosión.

Los durisoles son suelos endurecidos debido a la acumulación secundaria de sílice. La mayoría de los durisoles solo pueden ser utilizados pastizales extensivos.

Los cambisoles son suelos con horizonte A pálido o sómblico y B cámbico. El uso a que pueden destinarse es el forestal preferentemente.

Los leptosoles son suelos con espesor delgado y presentan una potencialidad muy limitada para cultivos arbóreos o para pastos.

Los luvisoles son suelos que cuando su drenaje interno es adecuado, presentan una gran potencialidad para un gran número de cultivos debido a su moderado estado de alteración y su alto grado de saturación.

Los gleysoles son suelos con horizonte gléyico a menos de 50cm de profundidad que en condiciones naturales pueden destinarse a actividades agropecuarias con cultivos que toleran exceso de agua.

Los planosoles son suelos pobres. Suelen ser utilizados para plantas forrajeras o pastizales extensivos, sin embargo, muchos no pueden ser usados con fines agrícolas.

## **Características biológicas**

### **Uso del suelo**

En cuanto al uso potencial de la tierra en el municipio, se tiene contemplado que para la agricultura, el 2.5% de la tierra tiene aptitud para la agricultura mecanizada continua; el 30.20% para la agricultura con tracción animal estacional; el 47.34% para la agricultura manual estacional; el 19.96% no es apta para la agricultura.

Mientras que para el uso potencial de la tierra para actividades pecuarias, el 2.5% son aptas para el desarrollo de praderas cultivadas; el 77.34% son aptas para el aprovechamiento de la vegetación natural diferente al pastizal; el 6.77% para el aprovechamiento de la vegetación natural únicamente por el ganado caprino; y el 13.39% no es apta para el uso pecuario (INEGI, 2009).

### **Vegetación**

El tipo de vegetación dominante en el municipio es el bosque de Pino y el bosque de *Quercus* (INEGI, 2009). Según Rzedowski (1981), dentro de las zonas de clima templado y subhúmedo, los pinares y encinares constituyen dos tipos de vegetación prevalecientes y que compiten entre sí. Esta vegetación es dominante en el municipio debido a que tanto el clima como el tipo de suelo ofrecen condiciones ecológicas similares para su desarrollo. Como resultado, el bosque de Pino y el bosque de *Quercus* forman intrincados mosaicos y complejas interrelaciones sucesionales, presentándose como bosque mixto.

## **Agricultura**

Según el INEGI (2009), la superficie total sembrada en el Municipio es de 3,929 hectáreas. La superficie sembrada que corresponde al cultivo de la alfalfa verde es de 400 hectáreas; la superficie sembrada con avena forrajera es de 1,040 hectáreas; 479 hectáreas son sembradas con cultivos como la calabaza y el frijol; 150 hectáreas son sembradas con trigo; la superficie sembrada con pastos comerciales corresponde a 370 hectáreas; el cultivo de la papa es sembrada en una superficie de 565 hectáreas; mientras que 925 hectáreas corresponden a la superficie cultivada con maíz.

## METODOLOGIA DE CAMPO

### **Información sobre las prácticas de manejo**

Para obtener dicha información, se aplicaron encuestas directamente a cada uno de los agricultores de maíz del Municipio. Las encuestas proporcionaron información con respecto al tipo de propiedad, las variedades de maíz sembradas, la productividad del maíz, el manejo agrícola y la economía familiar del productor.

A todos los agricultores que hubiesen sembrado maíz durante el 2009 se les aplicó una encuesta, elaborada por el INE. Para ver el formato de la encuesta, véase el Anexo I; para el del formato de toma de muestra, véase el Anexo II.

### **Presencia de OGMs**

Para el presente trabajo, se utilizó la metodología descrita en el manual para la toma y el manejo de muestras de maíz para la detección de OGMs en campo y laboratorio, elaborado por Rocha *et al.* (2008). La metodología en campo, fue la siguiente:

A) El primer paso para la colecta de muestras de maíz en campo, fue presentar el proyecto de trabajo al presidente municipal y comisarios ejidales para solicitar autorización y apoyo para con cada una de las autoridades de las diferentes comunidades que constituían al municipio. De igual forma se presentó el proyecto de trabajo a los productores de maíz; es decir, se les explicó que es el maíz transgénico, sus características, los posibles riesgos, la importancia que tiene la colecta de maíz en su comunidad y el procedimiento a seguir durante la colecta.

B) Las colectas de maíz se llevaron a cabo únicamente bajo el consentimiento de aquellos agricultores que decidieron participar en el proyecto. En total fueron 79 productores de maíz de 8 localidades.



C) A todos los productores de maíz que dieron su consentimiento para llevar a cabo la colecta de muestras, se les tomaron sus datos para llenar el formato de toma de muestra del INE. Una vez que el agricultor hubo firmado dicho formato, ya tenía conocimiento sobre el maíz transgénico y sobre el objetivo de la colecta de maíz en su comunidad.

D) Una vez con el permiso del agricultor, se procedió a hacer la colecta de 100 mazorcas de maíz al azar por productor a principios de enero de 2010, fecha en la que las mazorcas ya habían sido cosechadas y almacenadas.

E) De cada mazorca, se colectaron 10 granos de maíz, dando un total de 1000 semillas de maíz por productor. Los granos de maíz colectados, se tomaron del mismo surco de cada mazorca, como se muestra en la figura 1.



Figura 1: 10 granos tomados de una mazorca a partir del mismo surco.

F) Posteriormente, se colocaron las 1000 semillas en una bolsa de plástico\* etiquetándolas con una tarjeta identificadora que correspondía con el folio de la encuesta y del formato de toma de muestras que se les aplicaron a cada uno de los productores que participaron en el proyecto.

G) Al terminar la colecta en una localidad, se agradeció a los productores por su cooperación; se pasó a la siguiente comunidad y se prosiguió con la colecta bajo el mismo procedimiento en los siguientes sitios.

\*Fue muy importante verificar el estado de humedad de las muestras, pues las que aún se encontraban húmedas se dejaron secar al sol sobre bolsas de papel, esto para evitar que crecieran hongos en las muestras. Una vez que estuvieron completamente secas las muestras, se les pudo colocar en bolsas de plástico.

## METODOLOGIA DE LABORATORIO

Los transgénicos son Organismos Genéticamente Modificados que se pueden identificar tanto por el ADN nuevo que portan (transgen o secuencias asociadas), como por las proteínas que derivan de estos transgenes (Anklam, 2002).

Las proteínas codificadas por los transgenes pueden detectarse mediante ensayos inmunológicos, estos ensayos se basan en la unión específica entre un antígeno expresado y un anticuerpo diana (JRC, 2010a).

Los ensayos inmunológicos que detectan transgenes a partir de la unión de proteínas específicas son principalmente pruebas de ELISA, tiras de flujo lateral y análisis de Western blot.

En contraste, el ADN se detecta por medio de pruebas que identifican secuencias específicas de ADN que conforman al transgen insertado en el genoma de una planta.

Las principales pruebas de detección de ADN transgénico son: las técnicas de Southern blot, PCR de punto final, PCR competitivo cuantitativo (QC-PCR) y el PCR de tiempo real (RT-PCR) (CIBIOGEM, 2008).

En el presente estudio se optó por trabajar con el ADN de las muestras de maíz, ya que diversos factores lo hacen más estable que las proteínas. Factores como la concentración iónica, valores extremos de pH y el número de pares bases G-C; influyen en la temperatura de fusión ( $T_m$ ) a la cual se desnaturaliza una doble cadena de ADN (Anklam *et al.* 2002; Lodish *et al.* 2007). En cambio, la estructura terciaria de una proteína puede ser modificada fácilmente debido a los débiles enlaces no covalentes que las estabilizan (Lodish *et al.* 2007); y cualquier modificación en la conformación de la estructura terciaria de una proteína, hace que las pruebas de inmunoensayo sean inefectivas (Anklam *et al.* 2002; Fagan, 2007). El ADN es menos susceptible a la desnaturalización que las proteínas (Anklam *et al.* 2002; Fagan, 2007). Y por otro lado, las secuencias de ADN transgénico siempre estarán presentes en el cultivo de interés, aunque las proteínas no se expresen (Holst-Jensen *et al.* 2003; Fagan, 2007).

Además, las pruebas de detección para proteínas son ineficientes en el área de cuantificación (Fagan, 2007). Aunque no es imposible, es muy difícil traducir la masa de una proteína transgénica a partir de

un extracto de muestra a porcentaje de OGM. La dificultad surge en la precisión con la que este valor puede extrapolarse a un porcentaje de OGM y reflejar así el contenido GM en los materiales de estudio. Esto se debe al hecho de que no existe una relación constante entre la masa de una proteína transgénica extraída y la masa de un grano de maíz, debido a varios factores:

En primer lugar, el nivel de expresión de una proteína transgénica no es constante. Esto es ocasionado por condiciones ambientales como el tipo de suelo y el clima; así como a las prácticas de manejo de los agricultores. Por tanto, el nivel de expresión de una muestra siempre difiere del de los materiales de referencia, y no es válido estimar el contenido de OGM de la muestra por medio de la comparación entre ambos parámetros.

También se debe tomar en cuenta que los diferentes eventos de transformación están desarrollados para expresar las mismas proteínas recombinantes a diferentes grados de expresión.

Por ejemplo, los eventos de transformación Bt176, Bt11 y MON810 del maíz, expresan la proteína Cry1Ab a diferentes niveles: la proteína Cry1Ab está presente en un 0.09  $\mu\text{g}/\text{mg}$  en el evento 176, en el evento MON810 a 0.31  $\mu\text{g}/\text{mg}$  y en el evento Bt11 a 4.767  $\mu\text{g}/\text{mg}$  (Fagan, 2007). Bajo este mismo ejemplo, si una prueba por inmuno-análisis indica que el contenido de una muestra de maíz transgénico es de 0.09  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ; indicaría que la muestra analizada contiene 100% del evento 176, 29% del evento MON810, o bien 1.9% del evento Bt11 o cualquier combinación de los tres.

Por tanto, no se puede saber con exactitud si una muestra está comprendida por un solo evento o por varios. Por esta razón es difícil, en la práctica, determinar el porcentaje de OGM para los eventos del maíz utilizando pruebas analíticas a nivel de proteínas.

Otra limitante de los ensayos inmunológicos es, que las proteínas transgénicas expresadas en algunos cultivos GM transgénicos no son detectables por los análisis inmunológicos. Esto se debe a que algunas de las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas nativas y transgénicas del maíz son tan similares entre sí, que los anticuerpos son incapaces de diferenciarlas y terminan por unirse a ambos tipos de proteínas sin especificidad alguna, pudiendo dar lecturas de falsos positivos (Fagan, 2007). Además, no existen pruebas de ELISA para detectar todas las proteínas recombinantes (CERA, 2012).

## PCR

Dos técnicas son usadas comúnmente para la detección cualitativa de secuencias específicas de ADN transgénico: el análisis por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y los análisis tipo Southern blot (CIBIOGEM, 2008; JRC, 2010c).

Para este estudio, se hicieron pruebas de PCR para la detección de secuencias de ADN transgénico en las muestras de trabajo. Las razones por la que se empleó la PCR fueron su alta especificidad y su alta sensibilidad (Anklam *et al.* 2002; Holst-Jensen *et al.* 2003; Fagan, 2007).

La especificidad de la PCR se debe a que las interacciones entre los primers y la secuencia de ADN genómico, son altamente selectivas. La PCR es capaz de detectar cualquier evento de transformación de cualquier cultivo GM, siempre y cuando se conozcan las secuencias del transgen de interés o las secuencias asociadas al transgen (Anklam, 2002). Por otro lado, es una técnica muy sensible porque permite la amplificación de segmentos específicos de ADN presentes incluso a bajas frecuencias (una sola copia del transgen) dentro de una solución o mezcla compleja con otras secuencias de ADN. Debido a esta alta sensibilidad, tan solo se requiere utilizar pequeñas alícuotas de material vegetal para el análisis.

Otra ventaja que tiene la PCR, radica en el área de cuantificación. A diferencia de las pruebas de inmunoanálisis, la PCR-TR si es capaz de determinar el número total de copias de un transgen y compararlo con el número total de copias de un gen endógeno del cultivo de interés. De esta forma, la proporción entre estos dos valores puede ser usada para calcular acertadamente el porcentaje de las secuencias GM presentes en el genoma del cultivo de interés (Fagan, 2007).

## **MOLIENDA DE GRANOS DE MAIZ**

El primer paso para la detección de maíz transgénico fue la molienda de los mil granos de maíz de cada una de las 49 muestras colectadas. En algunos casos, quedaron remanentes de granos de maíz sin moler finamente, por lo que, cada una de las muestras colectadas fue cernida hasta que se obtuvo una harina fina.

A partir de la harina de maíz de cada muestra colectada, se conformó la muestra de trabajo, que consistió en la toma de 5 gramos de harina de maíz homogeneizada, misma que se almacenó en tubos para centrifuga para ser analizada posteriormente. Del mismo modo, se tomaron 50 gramos de harina de maíz homogeneizada por cada muestra colectada, con la finalidad de conformar la muestra de archivo. La muestra de archivo fue almacenada en el cuarto frío del laboratorio; esta muestra se preservó en caso de que se perdiera la muestra de trabajo o para la comprobación de los resultados realizados con las muestras de trabajo.

El método de detección de maíz transgénico empleado en el presente estudio es una modificación del protocolo validado por el Centro de Investigación Conjunta (Joint Research Centre) de la Comisión Europea a través del Instituto de Salud y Protección al Consumidor (IHCP) y su Laboratorio de Referencia para Alimento y Forraje GM de la Unión Europea (EURL-GMFF) (JRC, 2010a; JRC, 2010b; JRC, 2010c; JRC, 2010e).

## **EXTRACCION y PURIFICACION DE ADN POR MEDIO DE CTAB**

Después de la molienda de los granos de maíz, se efectuó la extracción de ADN a partir de la harina de maíz.

La calidad y la pureza del ADN son dos de los elementos más importantes en las pruebas de detección de secuencias GM en los cultivos, por esta razón fue fundamental optimizar la extracción del ADN para garantizar la presencia, pureza y calidad del ADN extraído.

Aunque en la actualidad existen diversos kits de extracción de ADN, se extrajo el ADN por medio del método CTAB; método muy versátil que ha demostrado su idoneidad para varias matrices diferentes y que se encuentra validado por la Comisión Europea. Con este método se evitó la implicación directa de empresas comerciales, disminuyendo los costos de la extracción de ADN.

El método del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB), es un método eficiente para extraer ADN de especies vegetales ya que está especialmente diseñado para eliminar polisacáridos y compuestos polifenólicos presentes en las células vegetales (Lipp *et al.*, 1999; 2001; JRC, 2010b). El CTAB es un detergente catiónico que en soluciones de alta concentración precipita proteínas y polisacáridos permitiendo la recuperación de precipitar ácidos nucleicos. De igual forma, este detergente provoca la lisis de la membrana celular y nuclear, y captura los lípidos que integran a las membranas celular y nuclear, debido a que la composición química del detergente es similar al de estos lípidos.

Para mayor detalle del protocolo de extracción de ADN genómico, véase el anexo III.

## **CUANTIFICACION DE ADN GENOMICO**

Habiéndose extraído y purificado el ADN de maíz, el siguiente paso fue cuantificarlo. La cuantificación tuvo el propósito de determinar la concentración y el grado de pureza del ADN extraído de cada una de las muestras de trabajo.

Los valores de ADN puro para el cociente  $A_{260}/A_{280}$  es de 1.8 nm aproximadamente, mientras que los valores de las muestras puras para el cociente  $A_{260}/A_{230}$  está dentro del rango 2.2 nm a 1.9 nm.

Como puede observarse en el cuadro 14 (Anexo VII), los cocientes  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$  de cada muestra de trabajo, se encuentran dentro de los valores de pureza esperados, tanto para proteínas como para cualquier reactivo que se empleó para extraer el ADN.

Estos valores son importantes pues indican que el ADN es puro y no existe el riesgo de que las reacciones bioquímicas de la PCR sean inhibidas por algún contaminante presente en las muestras; por tanto, las probabilidades de que los resultados fueran falsos negativos debido a una mala extracción de ADN, quedan descartadas.

Para una mayor referencia sobre el protocolo de cuantificación de ADN genómico, ver el anexo IV.

## **DILUCION/CONCENTRACION DE MUESTRAS PARA LA HOMOGENEIZACION DE CONCENTRACIONES**

Para el análisis de las muestras de ADN por PCR, fue necesario normalizar los extractos de ADN de manera que todas estas se encontraran a la misma concentración. De esta forma, se llevó a cabo una dilución o concentración de cada una de las muestras de trabajo, según lo que fuera requerido, para obtener una concentración final estandarizada a 50ng/μl.

Para obtener la concentración estándar para cada una de las muestras de trabajo, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{[\text{Concentración final}] [\text{Volumen}]}{\text{Concentración inicial}}$$

Dónde:

La concentración final corresponde a 50 ng/μL, siendo esta una concentración preestablecida.

El volumen por alícuota corresponde a 100μL.

La concentración inicial, es la concentración que resultó de la lectura del biofotómetro (ver cuadro 14, Anexo VII).

La fórmula se aplicó a cada uno de los resultados del biofotómetro por cada muestra; el resultado de cada operación, mostró la cantidad en volumen/microlitros que se debía de tomar de cada muestra de



ADN. Para obtener la cantidad de agua ultrapura que se debía agregar, se tomó el valor arrojado por la formula y se le resto a los 100 $\mu$ L del volumen.

Por último, se agregaron ambas cantidades tanto de ADN como de agua ultrapura en un tubo de microcentrífuga y se homogeneizaron repetidamente con una micropipeta. Así se obtuvo la concentración final de 50 ng/ $\mu$ L para cada muestra.

## **ELECTROFORESIS DE INTEGRIDAD DEL ADN GENOMICO**

A continuación, para corroborar que el ADN se encontrará integro, es decir, para determinar que el ADN de las muestras cuantificadas no se encontrara degradado o fragmentado, se realizó la electroforesis de las muestras de ADN diluidas a 50ng/ $\mu$ l.

Para mayor detalle del protocolo seguido en la electroforesis y sistema de adquisición del gel de integridad del ADN genómico, véase el anexo V.

## **AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE REFERENCIA POR EL MÉTODO DE PCR (ZEINA)**

Con objeto de evitar los falsos negativos debidos a la presencia de inhibidores de la PCR en la muestra, la Comisión Europea (JRC, 2010a; JRC, 2010c), recomienda efectuar un experimento de control de la inhibición de la PCR, que suele hacerse mediante una PCR específica de un gen endógeno de la especie de interés.

El propósito de haber llevado a cabo una PCR de punto final para este gen endógeno, fue con el objeto de determinar si el ADN extraído amplificaba correctamente, y que efectivamente este corresponde a ADN de maíz, es decir, que no hubiera agentes inhibidores que obstruyeran la reacción de la PCR; y bajo otras circunstancias, la amplificación de una secuencia de gen endógeno de un organismo determinado, sirve para corroborar el taxón que se está analizando.

Un gen endógeno, es un gen que se encuentra en un organismo en condiciones naturales y cumple una función necesaria en su metabolismo. Para el caso, la Zeina es un gen endógeno que se encuentra en el maíz y el producto de este gen es una proteína que forma su semilla (JRC, 2010d). Las secuencias de los iniciadores empleados para el gen endógeno Zeina fueron:

Zein 3: 5'-AGTGCGACCCATATTCCAG-3'

Zein 4: 5'-GAC ATT GTG GCA TCA TCA TTT-3'

Cuadro 1: Mezcla común para la reacción de PCR Zeina.

Reactivo	Concentración	1 Rx ( $\mu$ L)	51 Rx ( $\mu$ L)
<b>Taq polimerasa</b>	5,000/ml	0.125	6.375
<b>Buffer PCR</b>	10x	2.5	127.5
<b>dNTP's</b>	10mM	0.5	25.5
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	10x	2.5	127.5
<b>Zein 3</b>	20mM	0.625	31.875
<b>Zein 4</b>	20mM	0.625	31.875
<b>Agua Inyectable</b>		15.125	771.375

Se agregaron 22 $\mu$ L de la mezcla común en diferentes tubos de PCR. A cada uno de estos tubos con la mezcla común, se les agregó 3 $\mu$ L de ADN de las muestras de trabajo con concentración de 50ng/ $\mu$ L.

Utilizando agua para la muestra blanco y ADN del evento Mon 863 con un porcentaje en peso reportado de [9.9%] para el control positivo en tubos separados con 22 $\mu$ L de la mezcla común.

Posteriormente, todos los tubos de PCR se sometieron a centrifugación para que el contenido de los tubos se mezclara y se asentaran en el fondo del tubo.

El termociclador procesó las muestras durante 40 ciclos, en los cuales, se amplificaron exponencialmente las secuencias de ADN de interés. Como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2: Condiciones de los ciclos de la PCR Zeina. ZEINA

<b>ETAPA</b>	<b>PASO</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>TIEMPO</b>	<b># DE CICLOS</b>
<b>1</b>	Desnaturalización inicial	95°C	0:07:00	1
<b>2</b>	Desnaturalización	95°C	0:00:40	40
	Alineamiento	62°C	0:00:40	
	Extensión	72°C	0:00:40	
<b>3</b>	Extensión final	72°C	0:05:00	1

Para evidenciar la presencia de los productos de la PCR Zeina por electroforesis en gel, se preparó un gel de agarosa al 2%. Para mayor detalle del protocolo de electroforesis de la PCR Zeina, véase el anexo V.

## PCR 35s

Al haberse comprobado que el nivel de desempeño de la PCR fuera óptimo, se procedió a hacer el análisis cualitativo para la detección de elementos transgénicos presentes en las muestras de trabajo de maíz.

Para el presente estudio se efectuó la prueba de análisis de PCR cualitativo para detectar a uno de los elementos más comunes en el maíz transgénico: el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (Bonfini *et al.* 2002; Elenis *et al.* 2008). Las secuencias de los iniciadores empleados para el promotor 35S CaMV, fueron:

35S-1: 5'-GCT CCT ACA AAT GCC ATC A-3'

35S-2: 5'-GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA-3'

Cuadro 3: Mezcla común para la reacción de PCR 35S

Reactivo	Concentración	1Rx ( $\mu$ L)	52Rx ( $\mu$ L)
Hot star plus Taq	5 unidades/ $\mu$ L	0.125	6.5
Buffer PCR	10x	2.5	130
dNTP's	10mM	0.5	26
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1.0	52
Primer 35S-1	20mM	0.5	26
Primer 35S-2	20mM	0.5	26
Sol Q	5x	5	260
Agua c.b.f.		11.875	617.5

Conforme a los reactivos descritos en el cuadro 3, se agregaron 22 $\mu$ L de mezcla común en diferentes tubos de PCR. A cada uno de estos tubos con la mezcla común, se les agregó 3 $\mu$ L de ADN de las muestras de trabajo con concentración de 50ng/ $\mu$ L.

Usando nuevamente agua, ADN del evento Mon863x Mon810 [9.9%] y ADN del evento MON 863 [0%], en tubos separados con 22µL de la mezcla común; se obtuvieron la muestra blanco, el control positivo y el control negativo, respectivamente.

Posteriormente, todos los tubos de PCR se sometieron a centrifugación para que el contenido de los tubos se mezclara y se asentaran en el fondo del tubo.

El termociclador procesó las muestras durante 40 ciclos, en los cuales, se amplificaron exponencialmente las secuencias de ADN de interés, como se presenta en el cuadro 4.

Cuadro 4: Condiciones de los ciclos de la PCR 35S.

<b>ETAPA</b>	<b>PASO</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>TIEMPO</b>	<b># DE CICLOS</b>
<b>1</b>	Desnaturalización inicial	95°C	0:15:00	1
<b>2</b>	Desnaturalización	94°C	0:00:20	40
	Alineamiento	55°C	0:00:55	
<b>3</b>	Extensión	72°C	0:05:00	1

Para correr los productos de la PCR 35S, se preparó un gel de agarosa al 2%. Para mayor detalle del protocolo de electroforesis y sistema de adquisición de imagen de la PCR 35S, véase el anexo V.

## PCR T-NOS

De igual forma en el presente estudio se efectuó la prueba de análisis de PCR cualitativo para detectar a otro de los elementos más comunes en el maíz transgénico: el terminador nos de *Agrobacterium tumefaciens* (Bonfini *et al.* 2002; Elenis *et al.* 2008). Las secuencias de los iniciadores empleados para el terminado nos, fueron:

Ha Nos S: 5'-GCA TGA CGT TAT TTA TGA GAT GGG-3'

Ha Nos F: 5'-GAC ACC GCG CGC GAT AAT TTA TCC-3'

Cuadro 5: Mezcla común para la reacción de la PCR de T-nos.

Reactivo	Concentración	1Rx (μL)	52Rx (μL)
Hot star plus Taq	5 unidades/μL	0.125	6.5
Buffer PCR	10x	2.5	130
dNTP's	10mM	0.5	26
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1.0	52
Primer Ha Nos S	20mM	0.5	26
Primer Ha Nos F	20mM	0.5	26
Sol Q	5x	5	260
Agua c.b.f.		11.875	617.5

Se agregaron 22μL de la mezcla común en diferentes tubos de PCR. A cada uno de estos tubos con la mezcla común, se les agregó 3μL de ADN de las muestras de trabajo con concentración de 50ng/μL.

Usando agua, ADN del evento Mon863x Mon810 [9.9%] y ADN del evento MON 863 [0%], en tubos separados con 22µL de la mezcla común; se obtuvo la muestra blanco, el control positivo y el control negativo, respectivamente.

Posteriormente, todos los tubos de PCR se sometieron a centrifugación para que el contenido de los tubos se mezclara y se asentaran en el fondo del tubo.

El termociclador procesó las muestras durante 40 ciclos, en los cuales, se amplificaron exponencialmente las secuencias de ADN de interés.

Cuadro 6: Condiciones de los ciclos de la PCR T-NOS.

<b>ETAPA</b>	<b>PASO</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>TIEMPO</b>	<b># DE CICLOS</b>
<b>1</b>	Desnaturalización inicial	95°C	0:15:00	1
<b>2</b>	Desnaturalización	94°C	0:00:20	40
	Alineamiento	55°C	0:00:55	
<b>3</b>	Extensión	72°C	0:05:00	1

Para correr los productos de la PCR T-nos, se preparó un gel de agarosa al 2%. Para mayor detalle del protocolo de electroforesis y sistema de adquisición de imagen de la PCR T-nos, véase el anexo V.

## PCR Tiempo Real

Para confirmar los resultados obtenidos en la PCR de punto final, se recomienda hacer 3 tipos de análisis de confirmación: a) Hibridación Southern Blot de los productos de la PCR por medio de una sonda conocida que sea homóloga al amplicón de interés; b) por medio del rompimiento de los productos de la PCR en fragmentos de tamaño esperado, usando enzimas de restricción; c) o por secuenciación (Fagan, 2007).

Sin embargo, Anklam *et al.* (2002), Bonfini *et al.* (2002), Holst-Jensen *et al.* (2003) y Fagan (2007); afirman que un análisis de confirmación por medio de la PCR de tiempo real, es una cuarta opción para analizar las muestras positivas obtenidas en la PCR de punto final.

Por esta razón se decidió realizar el análisis por la PCR de tiempo real como un ensayo de confirmación de los resultados obtenidos en la PCR de punto final para el promotor 35S. Para este análisis se utilizaron los primers y las sondas para el gen endógeno *mhmg* del maíz y para el promotor 35S. El gen endógeno *mhmg*, codifica para el grupo de proteínas de alta movilidad del maíz, una clase de proteínas del cromosoma no histónicas; que abundan en el núcleo celular (JRC, 2010e).

Las secuencias de los iniciadores empleados para el gen endógeno *mhmg*, fueron:

Iniciador MaiJ-F2: 5'-TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA-3'

Iniciador *mhmg*-rev: 5'-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-3'

Las secuencias de los iniciadores empleados para el promotor 35S CaMV, fueron:

Iniciador s-F: 5'-CGT CTT CAA AGC AAG TGG ATT G-3'

Iniciador s-R: 5'-TCT TGC GAA GGA TAG TGG GAT T-3'



Cuadro 7: Mezcla común para la reacción de PCR tiempo real del gen endógeno mhmg.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen para una reacción de 25µL</b>	<b>Volumen para 50 reacciones (µL)</b>
<b>Agua ultrapura</b>	---	---	7.5	375
<b>TaqMan</b>	2x	1x	12.5	625
<b>Universal PCR Master Mix</b>				
<b>Iniciador MaiJ-F2</b>	10µM	150nM	0.375	18.75
<b>Iniciador mhmg-rev</b>	10µM	150nM	0.375	18.75
<b>Sonda mhmg</b>	5µM	50nM	0.25	12.5
<b>ADN molde</b>	50ng/µL	200ng	4	---

Cuadro 8: Mezcla común para la reacción de PCR tiempo real del promotor 35S.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen para una reacción de 25µL</b>	<b>Volumen para 50 reacciones (µL)</b>
<b>Agua ultrapura</b>	---	---	7.5	375
<b>TaqMan</b>	2x	1x	12.5	625
<b>Universal PCR Master Mix</b>				
<b>Iniciador s-F</b>	10µM	150nM	0.375	18.75

<b>Iniciador s-R</b>	10 $\mu$ M	150nM	0.375	18.75
<b>Sonda 35SP</b>	5 $\mu$ M	50nM	0.25	12.5
<b>ADN molde</b>	50ng/ $\mu$ L	200ng	4	---

Como parte de la confirmación del método reacción de PCR en tiempo real para cuantificación del promotor 35S y el gen endógeno mhmg, se realizó el siguiente ensayo:

- Blanco de reactivos: Se preparó adicionando los componentes de la mezcla de reacción y en lugar de ADN templado, se adicionaron 4 $\mu$ L de agua inyectable. El blanco de reactivo sólo se colocó una vez en la placa.
- Blanco de método: El día de extracción de los materiales de referencia certificados (MRC) que se emplearon en la prueba, se trabajó un tubo sin contener muestra de ADN, pero que se trató en conjunto y de igual manera que las muestras. El blanco de método se colocó en la placa una sola vez.
- Curva de calibración: La curva estuvo comprendida de 4 puntos que representan las siguientes concentraciones: 9.8%, 5%, 1% y 0.1% (g/g). Cada punto se preparó mediante diluciones seriales a partir del evento TC1507 al 9.8%. Cada punto de la curva se colocó en la placa por triplicado.
- Estándar de verificación: Se empleó como estándar de verificación el evento MON810 5%. Se colocó sólo una vez en la placa.
- Muestra adicionada: Se preparó con 10 $\mu$ L de la muestra 358/10 y 10 $\mu$ L del MRC TC1507 al 9.8%. La muestra adicionada sólo se colocó una vez en la placa.
- Muestras problema: se cargaron por duplicado en la placa todas aquellas muestras de la PCR de punto final que requerían ser confirmadas.

Cuadro 9: Condiciones de los ciclos de la PCR-RT del promotor 35S.

ETAPA	PASO	TEMPERATURA	TIEMPO	# DE CICLOS
1	Desnaturalización inicial	94°C	0:09:00	1
2	Desnaturalización	95°C	0:00:20	40
	Alineamiento	60°C	0:01:00	
	Extensión	72°C	0:00:30	

#### OBTENCIÓN DE LA GRÁFICA DE AMPLIFICACIÓN

La cinética de amplificación de la PCR de tiempo real, consta de tres fases: la geométrica, la lineal, y la estacionaria.

- Fase Geométrica: En esta fase, todos los reactivos de la reacción se encuentran en abundancia; la eficiencia de amplificación es cercana al 100%, y la cinética de amplificación tiene un comportamiento de  $2^n$ , en donde a partir de cada molécula de ADN se generan 2 moléculas de ADN.
- Fase Lineal: En esta fase los dNTP's, los primers y las enzimas comienzan a ser factores limitantes además se genera pirofosfato e inicia el decaimiento de la actividad enzimática que afecta la eficiencia de amplificación de manera constante.
- Fase Estacionaria: En este punto se detiene la amplificación, la cantidad de producto obtenida es constante sin importar cuantos ciclos más se prolongue la reacción.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Existe la probabilidad de haber fallado al detectar semillas transgénicas debido a incertidumbres asociadas al proceso de muestreo y variabilidad u homogeneidad de los materiales. Ya sea porque el tamaño de muestra no fue suficiente o porque las semillas colectadas se encuentran altamente relacionadas genéticamente; disminuyendo la representatividad de la variabilidad genética en las muestras; es indispensable conocer esta probabilidad.

Para conocer la verdadera varianza de las frecuencias génicas en la población y conocer el grado de relación genética entre las semillas de las muestras, se utilizó el estadístico de varianza del tamaño efectivo de la población  $ne=n/[(n-1)/4m+1]$ ; desarrollado por Hernández y Crossa (1993), y Vencovsky y Crossa (1999).

Después de haber obtenido la varianza del tamaño efectivo de población, se calculó para cada comunidad el umbral mínimo de detección para semillas transgénicas dentro de la población. Para calcular dicho umbral se obtuvo la probabilidad binomial  $p$  de fallar al detectar un transgen si estuviese presente a una frecuencia dada  $f$ :  $p = (1-f)^{ne(v)}$ . Factorizando  $f$ , la ecuación fue tomada como  $f = 1 - p^{(1/ne)}$ , donde  $f$  se interpreta como la frecuencia mínima detectable en una localidad teniendo en cuenta una probabilidad de error en la detección ( $p$ ). La probabilidad binomial se calculó para cada comunidad con un nivel de confianza del 95% ( $\alpha=0.05$ ) y otras frecuencias (0.01, 0.001, 0.0001 y 0.00001).

Por último, se analizó toda la información de manera conjunta de todas las comunidades del Municipio, para estimar la verosimilitud de fallar repetidamente al detectar semillas transgénicas bajo un umbral determinado. Ya que la estructura genética de la metapoblación es desconocida, no es posible estimar adecuadamente una  $N_e$  regional al juntar los valores individuales de cada localidad. Por ende, para analizar la información en conjunto, se utilizó una prueba de probabilidad combinada.

Se trabajó con la prueba de probabilidad combinada para análisis de datos entre localidades considerándolas como sub-muestras independientes de la misma muestra y por lo tanto pruebas diferentes e independientes (localidades) dentro del mismo diseño de muestreo.

Para calcular los valores bajo este método estadístico se tomó para una serie de  $l$  localidades, la similitud total combinada  $P$  de fallar repetidamente al detectar un transgen que estuviera regionalmente presente a cierta frecuencia  $f$ , puede ser estimado como el producto de todas las probabilidades diferentes que conforman al Municipio:  $P = \prod_i p_i$ , donde a su vez,  $p_i = (1-f)^{n_i}$  es la probabilidad binomial de cada localidad  $i$  de fallar al detectar un transgen dado un error nivel  $f$  y un tamaño efectivo de población  $n_i$ . La ecuación final se puede reducir a  $P = (1-f)^{\sum n_i}$ .

## RESULTADOS

### a) Encuestas

#### Tipo de propiedad

Los resultados de las encuestas muestran que para el régimen de propiedad de las parcelas en el Municipio de Erongarícuaro, en su mayoría es comunal (47.7%) y de pequeña propiedad (41.8%), quedando en menor medida el uso de parcelas rentadas (3.6%) y prestadas (6.9%) para el cultivo del maíz. (Véase figura 2, Anexo VI).

En cuanto al sistema de siembras que rige mayoritariamente en el municipio es el sistema de monocultivo del maíz con un 63.5% y tan sólo el 36.5% reside en la siembra del maíz por policultivo. (Figura 3, Anexo VI).

En la figura 4 (anexo VI), se aprecia el tipo de agricultura practicado en el Municipio, que corresponde en un 78.4% a siembra de temporal, mientras que el 4% corresponde a un sistema de siembra por riego y el 17.6% a un sistema de siembra por humedad.

#### Variedades de maíz

Con respecto a las variedades de maíz sembradas, el maíz blanco es la variedad mayormente sembrada en el Municipio de Erongarícuaro con un 52.8%, las razas sembradas para esta variedad son: Purépecha-Chalqueño, Purépecha-Pepitilla, Cónico y Cacahuacintle. El maíz amarillo es sembrado un 16.2% con respecto a las demás variedades y las razas que componen a este tipo de maíz en el Municipio son: Purépecha-Chalqueño y Cónico. El maíz Pozolero se siembra un 9.5% con respecto a las demás variedades sembradas, las razas sembradas en el municipio son: Purépecha-Elotes Occidentales, Cónico-Elotes Occidentales, Elotes Occidentales. Por su parte, el maíz pinto se siembra en un 9.5% con respecto a las demás variedades, debido a que es un híbrido entre cualquier raza y variedad, las razas parentales podrían corresponder a cualquiera de las sembradas en el Municipio. El maíz híbrido sembrado en el Municipio con respecto a las demás variedades está en 8.1%, las variedades comerciales que se siembran en el Municipio están denominadas como Halcón y su característica es que en cada yema axilar de las hojas, se produce una doble inflorescencia (2 mazorcas). Según los productores que lo siembran, son los únicos híbridos que han podido en cierta medida adaptarse a las condiciones agroecológicas del Municipio. El maíz negro por su parte, es

sembrado un 2.7% y está representado por las razas: Cónico-Elotes Occidentales y Purépechas-Elotes Occidentales.

Por último, el maíz que se reporta traído de EUA, se siembra en un 1.2%. No es posible determinar la raza de la que proviene este maíz, pues se desconocen las variedades y razas sembradas en Carolina del Norte, EUA. (Véase figura 5 y cuadro 12, Anexo VI).

Las variedades y razas descritas arriba fueron identificadas con ayuda de cada uno de los productores de maíz encuestados, mientras observaban el catálogo de maíces criollos de la cuenca de Pátzcuaro y Zirahuén, elaborado por Astier y Barrera-Bassols (2006).

La gran mayoría de los agricultores (84.6%) siembran sus variedades de manera separada, es decir, que cada una de sus variedades son sembradas en parcelas diferentes de manera que no se crucen entre si y se mezclen las variedades. Por otro lado, el 15.4% de ellos siembran sus variedades de manera mezclada en la misma parcela, a fin de obtener maíz pinto (figura 6, Anexo VI). Esta información es relevante porque lleva a pensar que la selección artificial está manteniendo a las variedades aun cuando el flujo génico por polen pueda llegar a darse entre ellas.

### Productividad

En cuanto al rendimiento de maíz por localidad en el Municipio, tenemos que para el 2009: Arocutín mostró un rendimiento de 1.8 t/ha, Erongarícuaro produjo 2.5 t/ha, el rendimiento de La Zarzamora fue de 2.1 t/ha, Lázaro Cárdenas produjo 2.7 t/ha, Napizaro mostró un rendimiento de 1.6 t/ha, el rendimiento de Nocutzepo fue de 2 t/ha, el de San Francisco Uricho fue de 2 t/ha, y Yotatiro tuvo 1.4 t/ha como rendimiento (Figura 7, Anexo VI).

Mientras que observando las cifras cosechadas por variedad en todo el Municipio de la figura 8 (Anexo VI), tenemos que: para el maíz blanco el rendimiento fue de 2 t/ha, para el maíz amarillo fue de 1.8 t/ha, el rendimiento del maíz negro fue de 1.3 t/ha, mientras que para el maíz pozolero fue de 2 t/ha, para el maíz pinto fue de 2.5 t/ha, el rendimiento del maíz híbrido fue de 2.8 t/ha, y para el maíz de EUA fue de 2.5 t/ha (ver fig. 8). En resumen, la comunidad que presentó un mayor rendimiento kg/ha en la producción de maíz durante el 2009, fue Lázaro Cárdenas; mientras que el tipo de maíz que más rindió fue el maíz híbrido (halcón), seguido del maíz pinto y el maíz de EUA. En las figuras 9 a 15 (Anexo VI) se observa la comparación del rendimiento (expresado en kg/ton) de cada variedad de maíz por comunidad.

Por otra parte, se encontró que de los agricultores encuestados, el 89.2% han dejado de sembrar la misma cantidad de maíz en los últimos años, mientras que, solamente el 10.8% ha sembrado regularmente la misma cantidad de maíz. (Figura 16, Anexo VI). De las personas que han dejado de sembrar la misma cantidad de maíz, muchas lo han dejado de hacer por cambio a otros cultivos más rentables que el maíz (65.2%), el 33.3% porque dejaron descansar sus tierras y sólo el 1.5% comenzó a incrementar su cultivo por la adquisición de nuevas tierras (figura 17, Anexo VI).

El 95.9% de los productores no han notado cambios en el rendimiento de los granos de maíz, mientras que tan sólo el 4.1% si han observado cambios. Dicho cambio en el rendimiento, según los agricultores, es negativo. (Figura 19, Anexo VI), sin tener una explicación para esta percepción. Las gráficas 20-26 (Anexo VI), corresponden a los usos en porcentajes que se les da a cada variedad de maíz sembrada en el Municipio de Erongarícuaro.

Se encontró también que, el sistema de labranza más empleado en el municipio es la mecanizada en un 87.2%, la yunta con 8.8% y la manual con sólo el 4%. (Véase figura 27, Anexo VI).

#### Manejo Agrícola

El uso de herbicidas en el Municipio, también es frecuente, de hecho el 78.4% utilizan herbicidas, mientras que únicamente el 21.6% no lo hace. Este 78.4% de agricultores, utilizan los herbicidas: Bandel, Gesaprin, Hierbamina, Marbel y Tordon. De ellos, el herbicida más empleado en el Municipio es el Gesaprin con un 66.7%, seguido por el Tordon con 14.8%, la Hierbamina con 13.6%, el Marbel con 3.7% y el Bandel empleado con solo el 1.2%. (Véase figuras 28 y 29, Anexo VI).

Con respecto al uso de fertilizantes (Véase figuras 30-33, Anexo VI), el 60.8% de los agricultores utiliza fertilizantes inorgánicos, el 24.3% usa fertilizantes orgánicos, el 8.1% de ellos utiliza tanto fertilizantes orgánicos como inorgánicos en sus parcelas y solo el 6.8% no utiliza ningún tipo de fertilizante. Del 68.9% que utilizan fertilizantes inorgánicos, sólo el 44.6% de ellos, utilizan más de dos tipos diferentes de fertilizante en sus parcelas. Los tres tipos de fertilizantes inorgánicos utilizados en el Municipio son: la Urea, siendo usada un 36.2%; el fertilizante 1846 con un uso de 34.9%; y el sulfato en un 28.9%. Por su parte, los fertilizantes orgánicos más empleados son: abono de ganado en un 73.9%, la composta siendo utilizada en un 17.4% y la lombricomposta con tan sólo el 8.7% de ser utilizada por los agricultores.

## Economía Familiar

La venta del maíz en el Municipio es en general pobre y la mayoría de los productores no vende maíz (60.8%), debido a que no es rentable (figuras 34-36 del Anexo VI). Del 39.2% que si lo comercializa, el maíz más vendido es el blanco (35.59 ton), seguido del maíz híbrido (15 ton), el maíz amarillo (4.25 ton), el maíz pinto (4 ton) y por último el maíz pozolero (3 ton). Por último (figura 37, Anexo VI), la gran mayoría de su comercialización se efectúa en los mercados comunales (57.9%), seguido por el mercado municipal (36.8%) y en menor medida en el mercado estatal (5.3%).

Muchos agricultores (62.2%) cuentan con apoyos al campo, financiados por el gobierno federal y estatal. Los principales apoyos al campo son los de Procampo (76.1%) que son de carácter federal y los apoyos conocidos como Cruzada del Maíz (2.2%) de carácter estatal. Solo el 21.7% de los agricultores, cuentan con ambos tipos de apoyo (véase figuras 38 y 39, Anexo VI).

Muchos agricultores (51.4%), de igual manera, tienen familiares viviendo en E.U.A, de los cuales el 47.4% reciben remesas de ellos. Sin embargo, ninguno de ellos ha recibido semillas de maíz traídas de E.U.A. De los agricultores encuestados, el 86.4% no pertenecen a ningún grupo étnico ni hablan ninguna lengua indígena, mientras que sólo el 6.8% hablan purépecha como lengua indígena y otro 6.8% pertenecen al grupo étnico de los purépechas (véase figuras 40-42, Anexo VI).

### **b) Laboratorio**

Las lecturas de biofotómetro que se realizaron para las muestras de ADN extraídas del maíz colectado, se realizaron con el fin de medir el grado de pureza de las muestras. Los resultados indican que las muestras de ADN extraídas se encuentran libres de agentes inhibidores y sustancias como proteínas, hidratos de carbono, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias empleadas durante la extracción del ADN (véase cuadro 14, Anexo VII).

El gel de integridad de ADN (figura 43, Anexo VIII), salió en perfectas condiciones, lo que indica que el ADN extraído de las muestras de maíz no está degradado ni fragmentado por el método de extracción CTAB.



En cuanto al gel de electroforesis de PCR Zeina (figuras 44-46, Anexo VIII), todas las muestras sin excepción, muestran la banda de 277pb. Esto asegura que la PCR de punto final amplifica de manera correcta las secuencias de ADN específicas de los primers y que, efectivamente, el ADN analizado es de maíz.

El gel de electroforesis de PCR para el promotor 35S fue un ensayo que se repitió seis veces, esto se debió a que en los primeros cinco ensayos, tanto la muestra blanco como el control negativo presentaron contaminación de ADN del promotor 35S. El sexto gel de electroforesis, ya sin indicios de contaminación, mostró bandas positivas de 195pb, correspondientes a las secuencias amplificadas por los primers 35S-1 y 35S-2 (véase figuras 47-50, Anexo VIII). Esto, sugirió la presencia del promotor 35S como elemento regulador de transgenes en las muestras de maíz colectadas. No obstante, en este mismo ensayo, los geles de electroforesis también presentaron múltiples bandas de ADN que no correspondían a la banda esperada de 195pb para el promotor 35S.

Por su parte, los geles de electroforesis de la PCR para el terminador NOS, no mostraron la amplificación esperada de la banda de 118pb (véase figuras 51-54, Anexo VIII). Por esta razón, quedó descartada la presencia del terminador NOS de *Agrobacterium thumefanciens* en las muestras de maíz y no fue necesaria la confirmación de los resultados con una PCR-RT.

En los resultados de la PCR-RT (como se observa en las figuras 55-57, Anexo VIII), la amplificación del gen endógeno *mhm*g se efectuó de manera correcta, lo que demostró, que no existe ningún agente inhibidor en el ADN ni en los reactivos de la PCR-RT, que impidan la adecuada amplificación de la PCR-RT; mientras que los resultados de la PCR-RT del promotor 35S fueron negativos (Véase figuras 58-60, Anexo VIII).

### **c) Análisis estadístico**

En cuanto al análisis estadístico, el análisis de varianza del tamaño efectivo de población para cada localidad, muestra una aproximación de la representatividad genética que tienen las semillas colectadas ( $n$ ) para cada localidad del Municipio (ver valores de  $N_{e(v)}$  del cuadro 10). Debido a que los valores de  $N_e$  son más pequeños que los valores de  $n$ , se efectuó un segundo análisis usando las mazorcas de maíz ( $m$ ) como unidades de observación en vez de las semillas.

Localidad	Plot	$n$	$m$	$n_e$	Frec. detec. basada		Probabilidad binomial (Pi) calculada de P (Ne(v)) para fallar en detectar semillas transgénicas a frecuencias (f):			
					Ne(v) P 0.5	$f(m)$ P 0.5	0.01	0.001	0.0001	0.00001
Arocutín	6	6000	600	1714.490	1.75E-03	4.98E-03	3.302E-08	1.800E-01	8.425E-01	9.830 E-01
Erongarícuaro	13	13000	1300	3714.490	8.06E-04	2.30E-03	0.000E+00	2.433E-02	6.898E-01	9.635E-01
La Zarzamora	9	9000	900	2571.633	1.16E-03	3.32E-03	5.999E-12	7.636E-02	7.733E-01	9.746E-01
Lázaro Cárdenas	9	9000	900	2571.633	1.16E-03	3.32E-03	5.999E-12	7.636E-02	7.733E-01	9.746E-01
Napizaro	3	3000	300	857.347	3.49E-03	9.93E-03	1.817E-04	4.243E-01	9.179E-01	9.915E-01
Nocutzepo	5	5000	500	1428.776	2.09E-03	5.97E-03	5.849E-07	2.396E-01	8.669E-01	9.858E-01
Uricho	4	4000	400	1143.061	2.62E-03	7.46E-03	1.026E-05	3.187E-01	8.920E-01	9.886E-01
Probabilidad Combinada para P (Ne(v))							0.00000	0.0000082	0.247	0.869
Probabilidad combinada para semillas P (n)							0.00000	0.00000	0.00744	0.61262
Probabilidad Combinada para plantas P (m)							0.00000	0.00743	0.61261	0.95218

Cuadro 10: En este cuadro se observan las variables obtenidas tanto en campo como las calculadas. La variable  $n$  representa el número de semillas colectadas por localidad, mientras que  $m$  es el número de mazorcas de las que se tomaron las semillas.  $N_e$  es la verdadera representatividad genética de las muestras tomando en cuenta la varianza alélica de cada comunidad. Mientras que  $f(Ne(v))$ , es la frecuencia individual por comunidad a la cual se falla al detectar una semilla transgénica con el 95% de nivel de confianza; y  $f(m)$  es la frecuencia de las mazorcas consideradas como unidades de observación en las que se detectan transgenes con un error del 5%.

Los resultados para determinar el umbral mínimo de detección de transgenes, basados en el tamaño efectivo de población realizado a partir de la probabilidad binomial, indican que las frecuencias de encontrar semillas y mazorcas transgénicas en el muestreo por localidad con un nivel de confianza del 95% en cada localidad, son muy bajas (ver valores de  $f(N_e)$  y  $f(m)$  del cuadro 10).

Cuando se calculó la probabilidad combinada ( $P$ ) para todas las localidades, los resultados mostraron que si las semillas transgénicas estuvieran presentes en el municipio a frecuencias más grandes de una en mil ( $f > 0.001$ ), hubiesen sido detectados con un nivel de confianza del 95% ( $\alpha = 0.05$ ).

La probabilidad de detección para el tamaño efectivo de muestra ( $N_e (v)$ ) presenta una alta probabilidad de fallar para detectar transgenes en comparación con los valores obtenidos al evaluar las semillas individuales como unidad de observación, pero una baja probabilidad de fallar para detectar transgenes en comparación con los valores obtenidos para las plantas maternas. Estos valores pueden corroborarse en las pruebas de probabilidad combinadas (ver cuadro 11).

La estimación de la frecuencia mínima detectable fue de 0.000484 usando la probabilidad combinada (ver cuadro 11).

<b>Unidad de análisis</b>	<b>Probabilidad Combinada</b>
<b>Tamaño efectivo de población (<math>N_e (v)</math>)</b>	0.000484
<b>Semillas (<math>n</math>)</b>	0.000209
<b>Plantas maternas (<math>m</math>)</b>	0.001131

Cuadro 11: En este cuadro se muestran los valores obtenidos para la probabilidad conjunta, tanto para las plantas maternas (mazorcas) como para las semillas colectadas en el Municipio.

## DISCUSIÓN

Existen varias condiciones que aumentan la probabilidad de encontrar maíz GM en un lugar determinado. Por tal motivo, se esperaba que al conocer las prácticas de manejo de las semillas de maíz con las encuestas se encontraran indicios sobre la posible presencia de maíz GM en las parcelas de los agricultores. Las hipótesis que harían pensar si algún agricultor estuviese sembrando maíz GM (de manera intencional o accidental), se basan principalmente en la procedencia de la semillas que se están sembrando en una parcela determinada, o bien, por sus características y su rendimiento.

Esto es, dependiendo de si se ha intercambiado o comprado semillas en otros lugares ajenos al Municipio, si el mismo agricultor o algún pariente han traído semillas de EUA; pueden indicar la posibilidad de que semillas de maíz hayan sido sembradas en la zona de estudio. Por el otro lado, si los mismos agricultores han observado que algunas características hayan cambiado como la coloración, sabor, olor, textura, calidad de la masa, dureza de la semilla, mala germinación y/o tiempo de cocción, etc.; pueden también ser indicios de la presencia de semillas GM. Por estas razones, haber efectuado encuestas a los agricultores del Municipio fue relevante para generar hipótesis sobre la posible presencia de maíz GM en la zona de estudio. Dichas encuestas mostraron información sobresaliente sobre los factores biológicos, sociales y económicos implicados en la siembra del maíz.

En cuanto al sistema de siembras que rige mayoritariamente en el municipio es el sistema de monocultivo del maíz y de manera minoritaria se siembra en conjunto con otros cultivos. En el policultivo, el maíz es sembrado en la misma parcela con cultivos como el frijol, la calabaza y en menor medida el chayote. Estos cultivos son destinados principalmente para el autoconsumo y en menor medida son para obtener ingresos económicos.

Existen varios estudios en los que se reportan ventajas del sistema de policultivo sobre el de monocultivo, al comparar rendimiento, efectos sobre el suelo, aspectos económicos y en el control de plagas, enfermedades y malezas (Altieri y Nicholls, 2000).

Una de las principales razones por las cuales se reporta en la literatura la preferencia por policultivos, es porque frecuentemente se puede obtener mayor rendimiento. Liebman (1999), ha observado en varios experimentos, que el rendimiento de cada especie cultivada en policultivo, se reduce por competencia del cultivo asociado; sin embargo, el rendimiento total del policultivo, por unidad de superficie, es mayor comparado con el de los monocultivos.

Sin embargo, la gran mayoría de los agricultores en el Municipio de Erongarícuaro ha optado por el monocultivo debido a que en algunas comunidades prefieren el rendimiento por cultivo que el rendimiento de superficie, además prefieren el monocultivo porque implica un menor esfuerzo de trabajo y muchos de los productores de maíz en el municipio ya son personas de la tercera edad. Estos cultivos son destinados principalmente para el autoconsumo y en menor medida son para obtener ingresos económicos.

El tipo de agricultura practicado en el municipio corresponde en su gran mayoría a la siembra de temporal, mientras que un grupo muy reducido de productores practica un sistema de siembra por riego y otro tanto practica el sistema de siembra denominado de humedad. Aunque la siembra de humedad puede considerarse dentro de la categoría de una siembra de temporal, es importante diferenciarla. La siembra de temporal es aquella que consiste en la siembra de maíz meses previos a la temporada de lluvias, para asegurar que los granos de maíz sembrados germinen, y las plántulas aprovechen las lluvias desde su inicio, favoreciendo el desarrollo vegetativo del maíz (Reyes, 1990). Mientras que la de humedad, como su nombre lo indica, la humedad del suelo es tan alta, que permite adelantar la fecha de siembra hasta por dos meses de lo definido por la temporada de lluvias en una región determinada. Cabe resaltar que en el municipio de Erongarícuaro, los lugares en donde se practica el sistema de siembra de humedad, se encuentran a una altura de 400m superior al del resto de las localidades en donde se efectúa la siembra de temporal y la temperatura es inferior 4°C (INEGI, 2009).

En cuanto a variedades de maíz utilizadas, se observa que la mayoría son criollos y menos del 10% son híbridos (Cuadro 12, Anexo VI). Estas 5 variedades de maíz son sembradas en el Municipio por razones de tradición, razones culturales y su rendimiento. El maíz híbrido y el de EUA, son sembrados únicamente por razones de rendimiento y propósitos de venta.

Es importante destacar que el maíz negro, a diferencia de otras variedades, es sembrado únicamente por su valor cultural y por ser una tradición que viene de generaciones, aun cuando el rendimiento no es alto comparado con el rendimiento de otras variedades (ver figura 8, Anexo VI).

Aquí es importante destacar que algunos agricultores siembran más de una variedad de maíz en la misma parcela. La gran mayoría siembran sus variedades de manera separada, es decir, que cada una de sus variedades son sembradas en parcelas diferentes de manera que no se crucen entre sí y se mezclen las variedades. Pero algunos de los productores siembran sus variedades de manera mezclada en la misma parcela, a fin de obtener el denominado maíz pinto.

En cuanto al rendimiento de maíz por localidad en el Municipio, tenemos una variación entre 1.4 a 2 t/ha para el 2009 (ver fig. 7, Anexo VI), mientras que la variación en rendimiento por variedad no es muy diferente, va de 1.3 a 2.8 t/ha (ver fig. 8, Anexo VI).

La comunidad que presentó un mayor rendimiento kg/ha en la producción de maíz durante el 2009, fue Lázaro Cárdenas; mientras que el tipo de maíz que más rindió fue el maíz híbrido (halcón), seguido del maíz pinto y el maíz de EUA.

Comparando las cifras obtenidas en el Municipio de Erongarícuaro, estudios de Financiera Rural (2009) indican que la producción de maíz a nivel nacional de 2000 a 2007 para el maíz sembrado bajo temporal, no supera las 2.3 t/ha; mientras que el maíz sembrado bajo riego alcanza un rendimiento de hasta 7.1 t/ha.

Por otro lado, las cifras presentadas por el SIAP (2011) en la siembra bajo temporal para el año 2009, muestra un rendimiento para el maíz de 2.6 t/ha en el estado de Michoacán; sin embargo, el estado con mayor rendimiento fue Jalisco con 5 t/ha y el estado con el menor rendimiento para el mismo año fue Yucatán con 0.4 t/ha.

En contraste, la agricultura del maíz bajo riego muestra que para el 2009, el rendimiento en el estado de Michoacán fue de 3.4 t/ha; siendo el estado de Sinaloa el de mayor rendimiento con 10.5 t/ha y Coahuila el de menor rendimiento con 1.7 t/ha (SIAP, 2011).

Estas cifras indican que el rendimiento del maíz en el Municipio es medio, comparado con los rendimientos del maíz de temporal; en contraste, comparándolo con el rendimiento del maíz de riego a nivel nacional, el rendimiento del maíz del Municipio tiene un rendimiento bajo (véase cuadro 13, Anexo VI). Aunque parece que la siembra de maíz bajo riego aumenta el rendimiento, habría que hacer estudios agroecológicos de cada región para saber si el riego es el único factor que influye en el rendimiento del maíz sembrado.

En los últimos 5 años, la gran mayoría de los productores han notado cambios en el rendimiento de los granos de maíz. Dicho cambio en el rendimiento, según comentan los agricultores, es negativo.

Este cambio negativo en el rendimiento del maíz, puede deberse a múltiples razones. En las encuestas, los productores de maíz, creen que una razón por la cual el rendimiento ha disminuido se debe al cambio del sistema de labranza. Afirman que generaciones anteriores a ellos, sembraban el maíz manualmente y con yuntas; haciendo la escarda de la tierra. Aunque estos sistemas requerían un mayor esfuerzo físico, eran más eficaces y rentables, pues los productores invertían menos en la producción

del maíz y obtenían más ingresos que en la actualidad. Esto lo ven reflejado en la cifras: actualmente, el sistema de labranza más empleado en el municipio es la mecanizada en un 87.2%, la yunta con 8.8% y la manual con el 4%. Esta percepción de los agricultores puede estar relacionada con la erosión de la tierra que causa la labranza, por lo que quizás habrá que promover la prueba de sistemas de cero labranza.

Otra posible causa del bajo rendimiento del maíz en el municipio, puede ser el cultivo continuo de las parcelas practicados por algunos agricultores del municipio y al uso constante de herbicidas y fertilizantes en las parcelas.

Pues como lo indica López-Martínez *et al.* (2000), la estructura del suelo es el factor principal que condiciona la fertilidad y la productividad de los suelos agrícolas; someterlos a un intenso laboreo y compresión mecánica tiende a deteriorar su estructura. A su vez, los nutrientes del suelo son empleados continuamente en cada temporada de siembra, impidiendo que se acumulen nuevamente en el suelo de manera natural.

Esto podría explicar porque el maíz ha perdido rendimiento y siendo también posible que por esta razón se haya tenido que incrementar el uso de fertilizantes y herbicidas en los suelos de este Municipio. Para conocer mayores efectos de los fertilizantes inorgánicos véase Laird y Rodríguez (1965); Ruda *et al.* (2004); y Cueto *et al.* (2006).

De ser que el bajo rendimiento del maíz y otros cultivos se deba a que la estructura del suelo este deteriorada, López-Martínez *et al.* (2000) recomiendan emplear abonos orgánicos para aquellas tierras sometidas a cultivo intenso, con el objeto de mantener y mejorar la estructura del suelo, aumentar la capacidad de retención de humedad y facilitar la disponibilidad de nutrientes para los cultivos.

Aunque los herbicidas mejoran el rendimiento de las cosechas, pueden ocasionar un impacto negativo del medio ambiente. El principal impacto que se reporta es la introducción de estos compuestos en corrientes de aguas superficiales o en mantos freáticos por esorrentía o lixiviación (Caseley, 1996).

La persistencia de los herbicidas en el suelo depende de las características físico-químicas del compuesto, de las condiciones ambientales y de las prácticas de manejo de los agricultores (Martínez, 1996). Para el caso del Municipio de Erongarícuaro, podría hacerse un estudio sobre la situación actual del suelo en relación con los herbicidas y evaluar el mejor modo de empleo de los mismos, promoviendo el uso de herbicidas de menor nivel toxicológico, la cero labranza y siembra directa.

En general, el número de productores que han sembrado la misma cantidad de maíz en los últimos 5 años en el Municipio de Erongarícuaro es relativamente baja, debido a diversos factores (ver fig. 17, anexo VI). La gran mayoría ha dejado de sembrar la misma cantidad de maíz ya que ha destinado sus tierras a la siembra de otros cultivos, tales como, la papa, la alfalfa, la avena forrajera, el trigo y pastos comerciales. El principal factor que ha suscitado este fenómeno es a que los precios del maíz por tonelada son muy bajos y el agricultor termina invirtiendo más dinero y esfuerzo, que las ganancias netas por sembrar maíz. El precio del maíz oscila por temporada y va desde los \$2500-\$4500 por tonelada. De igual manera, aseguran ellos que la siembra del maíz comparado con la siembra de papa, avena, alfalfa y pastos comerciales, es más laboriosa.

Otro factor por el cual se ha dejado de sembrar la misma cantidad de maíz es porque han dejado descansar sus tierras los últimos años; sin embargo, más la mitad de estos productores piensan dejar de sembrar maíz para destinarlas a la siembra de otros cultivos más rentables, una cuarta parte piensa seguir sembrando maíz y la otra cuarta parte piensa dejar de sembrar definitivamente en esas tierras.

A pesar de que más de la mitad de los productores cuenta con apoyos del gobierno, la inversión económica en la producción de maíz es mucho mayor que las ganancias netas obtenidas por su venta. Una tercera parte de los productores, no cuenta con ningún tipo de apoyo por parte del gobierno por no contar con los requisitos necesarios para que se les otorgue el apoyo. En este caso, no cuentan con un documento que acredite la propiedad o posesión del predio, debido a que la herencia de algunas propiedades se hace por medio de la palabra. Otro documento con el que estas personas no cuentan es la Clave Única de Registro de Población (CURP) para ser acreedores a dichos programas.

Otro factor por el cual los productores del Municipio han dejado de sembrar es porque muchos de los habitantes del municipio (principalmente los jóvenes y adultos jóvenes), han migrado a los Estados Unidos de América, abandonando las prácticas agrícolas. En casos muy reducidos son las mujeres y los adultos mayores quienes se encargan de la siembra y cosecha de maíz.



Detección de la presencia de maíz GM.

El cruzamiento, manejo, reemplazo/intercambio de semillas que cada productor lleva a cabo con sus propias semillas son esenciales para la dispersión y persistencia de nuevos alelos en una población de semillas de maíz. A este proceso se le denomina sistema de semillas y en México se reconocen dos sistemas diferentes: el sistema formal y el informal (Dyer *et al.*, 2009).

El sistema formal, pertenece a la agricultura industrializada, que se caracteriza principalmente porque en cada ciclo de siembra/cosecha la semilla es reemplazada en su totalidad y en ausencia de intercambio. En tanto, el sistema informal, es propio de la agricultura tradicional, en donde los productores de maíz guardan semillas a través de los ciclos de siembra/cosecha y la intercambian entre ellos, el reemplazo también se da pero de manera discontinua a lo largo de los ciclos (Dyer *et al.*, 2009; van Heerwaarden *et al.*, 2012).

Tanto Dyer *et al.* (2009) como van Heerwaarden *et al.* (2012), indican que las dinámicas de las semillas tienen influencia sobre la estructura de la población a lo largo de los ciclos y las localidades; alterando la frecuencia local de alelos, especialmente a través del sistema de semillas informal y mercados de grano.

En el municipio de Erongarícuaro la gran mayoría de los productores encuestados, han obtenido sus semillas de maíz desde hace 5 años a partir de otros productores del mismo municipio (intercambio a nivel local). Solamente 4 productores obtuvieron nuevas semillas de municipios colindantes (Aranza y Pátzcuaro) al municipio de Erongarícuaro; otro productor la obtuvo de productores de Sinaloa; y uno más trajo semillas de maíz de Carolina del Norte, EUA.

Esta adquisición de semillas es relevante para la frecuencia de alelos en las poblaciones de maíz del municipio de Erongarícuaro, especialmente cuando hay 29 eventos de maíz transgénico aprobados para su comercialización y consumo (CIBIOGEM, 2012); aunado a que en el norte de México, se maneja la agricultura industrializada, en donde el reemplazo y dispersión de las semillas es constante en cada ciclo de siembra. Bajo estos hechos, Dyer *et al.* (2009), toma al Norte de México como una posible fuente de transgenes que por el sistema de agricultura que maneja, lo convierte en un potencial dispersor de maíz GM; especialmente a la región centro de México, incluyendo Michoacán.

Después de haber realizado las encuestas y de haber obtenido las muestras de maíz de los productores, estas muestras fueron llevadas al laboratorio de biología molecular del INE en CENICA para ser

analizadas. Especialmente por estos 6 agricultores que incorporaron nueva semilla a sus parcelas; principalmente, por el agricultor que declaró haber sembrado maíz traído de Carolina del Norte, EUA, desde hace 5 años.

Con las pruebas de PCR de punto final, no se obtuvo evidencia de la presencia de la banda de 118pb esperada para el elemento regulador T-nos de *A. tumefaciens* de ninguna de las muestras colectadas tal como se observa en los resultados (Fig. 51-54, Anexo VIII). De igual manera, queda descartada la posibilidad de falsos negativos, por la razón de que no existen ningún tipo de agente inhibidor de la PCR que estuviera en las muestras de ADN y/o provocados por los reactivos empleados en la extracción del ADN, tal como se muestra en el cuadro 14 (Anexo VII).

Los resultados de la PCR de punto final para el p35S CaMV, reportan quince muestras presuntamente positivas; esto da un estimado de frecuencia putativa de transgenes de  $15/49 = 0.306$ . Sin embargo, estos hallazgos fueron corroborados profundizando el análisis por métodos moleculares de mayor sensibilidad y especificidad, resultando ser éstos falsos positivos ocasionados por contaminación de muestras debida a su manipulación.

Existen varios métodos de confirmación para muestras positivas a elementos transgénicos: el Southern blot, la secuenciación a partir de las muestras positivas en el gel de Agarosa y la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-RT, por sus siglas en inglés) (Fagan, 2007; JRC, 2010d; JRC, 2010e); de todos ellos, se optó por la PCR-RT.

El Southern blot se descartó debido a que es un método considerado menos sensible que la PCR, ya que requiere más copias del gen a diferencia de la PCR en donde el número de copias es amplificado (CIBIOGEM, 2008); además, es una técnica de larga duración y son frecuentes los artefactos (Elenis *et al.*, 2008). En cuanto a la secuenciación directa de las muestras a partir del gel de agarosa, hubiera sido un método de confirmación más exacto, desafortunadamente los geles de agarosa se perdieron antes de poder haber sido analizados por las autoridades pertinentes y que dieran su recomendación para emplear el método de secuenciación.

Por esta razón se determinó utilizar la PCR-RT como método de confirmación. La ventaja de la PCR-RT es que monitoriza la reacción a medida que tiene lugar. Esto es, que la PCR-RT se acopla a la emisión de una señal fluorescente proporcional a la cantidad de producto de la PCR producido en ciclos posteriores. Esta señal se intensifica proporcionalmente a la cantidad de producto de la PCR generando

en cada ciclo de reacción sucesivo. Así, registrando la cantidad de emisión fluorescente en cada ciclo, es posible monitorizar la PCR durante la fase exponencial (JRC, 2010e).

Con la PCR-RT se corroboró que para las muestras de maíz colectadas y analizadas en el municipio de Erongarícuaro no se detectan secuencias GM correspondientes al promotor 35S CaMV, contrario a lo que se especuló con las pruebas de PCR de punto final para este mismo elemento regulador. Dando así, una frecuencia igual a 0.

De 52 eventos GM existentes para maíz al momento de realizar el presente estudio, 51 de ellos (98.08%) son detectables por medio de primers que identifiquen y amplifiquen secuencias del promotor 35S CaMV y del terminador nos de *A. tumefaciens* (Holden *et al.* 2009; CERA, 2012), tal y como se efectuó en el presente trabajo.

De manera más específica, 13 de los eventos de maíz transgénico (25%) contienen el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; 3 eventos (5.77%) contienen el terminador nos de *A. tumefaciens*; 35 eventos (67.31%) contienen ambos elementos reguladores (P35S CaMV y T-Nos) en la misma construcción; y sólo un evento (1.92%) no contiene ninguno de estos elementos reguladores génicos (CERA, 2012). Dicho evento, incapaz de detectarse por medio del promotor 35S y el terminador nos, es el evento LY038 (CERA, 2012), este evento ha sido autorizado como forraje por parte de la SSA en México desde 2007 (CIBIOGEM sistema nacional de información de OGMs), por lo que es posible su presencia sin que la misma sea posible de detectar mediante este estudio.

La probabilidad conjunta mostró que si las semillas transgénicas estuvieran presentes en el municipio a frecuencias más grandes de una en mil ( $f > 0.001$ ), hubiesen sido detectados con un nivel de confianza del 95% ( $\alpha = 0.05$ ); esto al ser tomadas en cuenta las plantas maternas (mazorcas) como unidades de observación. En cambio, si se toma en cuenta el tamaño efectivo de población tenemos que las semillas transgénicas se hubiesen detectado a una frecuencia cercana de 1 en 10,000 ( $f > 0.000484$ ) también con un nivel de confianza del 95% ( $\alpha = 0.05$ ). Y para el caso de las semillas, como unidades de observación sería también cercana a 1 en 10,000 ( $f > 0.000209$ ).

Sin embargo, aún si la frecuencia de semillas GM fuera de 1 en 10,000 o menos, cientos de plantas transgénicas podrían estar presentes en el municipio sin ser detectadas. Debido a que es imposible demostrar con un 100% de certeza que los transgenes estén ausentes en el municipio, por eso la necesidad de seguir elaborando proyectos de monitoreo y detección de maíz transgénico; además de

que se necesita conocer la frecuencia alélica de la población a través de la dinámica y el sistema informal de semillas para elaborar mejores diseños de muestreo en el municipio.

Por último, el presente trabajo podría mejorar en la parte de las encuestas al incluir preguntas como: Si cuando se compra semilla nueva para siembra se reemplaza o se mezcla con la semillas guardadas en cada ciclo, esto, para ir conociendo un poco más el sistema de semillas y el impacto del sistema informal de semillas.

De igual forma, tal como sugiere Cleveland *et al* (2005), considero importante mejorar las técnicas de muestreo, lo que implica el conocer más a fondo el sistema de semillas en el municipio y la región; así como tomar un número aún más pequeño de semillas de una mayor cantidad de mazorcas para optimizar aún más  $N_e/n$  para cuantificar y predecir mejor los cambios en la frecuencia alélica que afecta la representatividad genética de la población de semillas de maíz.

## CONCLUSIONES

- Actualmente existe una gran preocupación por los posibles riesgos de la introducción y flujo génico del maíz transgénico en nuestro país. Sin embargo, como lo señalan las encuestas, debería ser más preocupante el deterioro que sufre actualmente el campo mexicano; pues con o sin la biotecnología moderna del ADN recombinante, los problemas del campo no se solucionarán por sí solos.
- Es indispensable conocer la dinámica y los sistemas de semillas que se presentan en el municipio para entender mejor su impacto sobre las frecuencias alélicas de la población de maíz. De igual forma, para cualquier región en la que se desee hacer proyectos de monitoreo y detección de maíz transgénico.
- Es importante conocer la frecuencia de alelos y la estructura genética de la metapoblación del municipio, o en su defecto el de la región, para elaborar un muestreo más eficiente y óptimo que el diseñado en el presente estudio; siempre buscando optimizar  $Ne/n$ . Siendo este el mismo caso para cualquier otra región en la que se pretenda llevar a cabo estudios de monitoreo y detección de maíz transgénico.
- Aunque no se encontró evidencia alguna de los dos elementos reguladores más comunes del maíz GM en las muestras analizadas, existe la posibilidad de que los transgenes puedan estar presentes en el municipio a frecuencias muy bajas y por debajo de la capacidad de detección de los métodos estadísticos aquí presentados. Por tanto, es necesario repetir este tipo de proyectos en el municipio en diferentes intervalos de tiempo, principalmente porque se desconoce cómo afecta la dinámica y el sistema informal de semillas a la frecuencia alélica en las poblaciones de maíz del municipio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, H. N. 1989. Clasificación de suelos. pp 97-150. En: Aguilera, H.N. (Ed). Tratado de Edafología de México. México, D.F. 225 pp.
- Altieri, M. y C. I. Nicholls. 2000. Bases Agroecológicas para una Agricultura Autosustentable. pp 13-44. En: Altieri, M. y C. I. Nicholls (Eds). Agroecología: Teoría y práctica para una agricultura autosustentable. México, D.F. 250 pp.
- Anklam, E., F. Gadani, P. Heinze, H. Pijnenburg y G. Van den Eede. 2002. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived foods products. Eur. Food. Res. Technol. 214: 3-26.
- Astier M., y Barrera-Bassols. (2006). Catálogo de Maíces Criollos de la Cuenca de Pátzcuaro y Zirahuén. Instituto de Ecología-SEMARNAT, UNAM y GIRA. pp 55.
- Bonfini, L., H. Petra, K. Simon y G. Van den Eede. 2002. Review of GMO Detection and Quantification Techniques. European Comisión: Joint Research Centre. Italy. 68 pp.
- Caseley, J. C. 1996. Herbicidas. pp 181-224. En: Labrada, R., J.C. Caseley, C. Parker (Eds). Manejo de malezas para países en desarrollo (Estudio FAO producción y protección vegetal-120). Roma. 384 pp.
- Center for Environmental Risk Assesment (CERA). 15/11/2012. 21:20hrs.  
[http://ceragmc.org/index.php?hstIDXCode%5B%5D=1&stCode%5B%5D=MX&auDate1=&auDate2=&action=gm\\_crop\\_database&mode=Submit](http://ceragmc.org/index.php?hstIDXCode%5B%5D=1&stCode%5B%5D=MX&auDate1=&auDate2=&action=gm_crop_database&mode=Submit)
- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, SSA (COFEPRIS). 15/11/2012.  
<http://www.cibiogem.gob.mx/OGMs/Documents/COFEPRIS-Salud/lista-evaluacion-inocuidad.pdf.14:30>.

- Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM). 2008. Bioseguridad en la aplicación de la biotecnología y el uso de los organismos genéticamente modificados. México, D.F. 383 pp.
  
- Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM). 15/11/2012. Registro Nacional de Organismos Genéticamente Modificados. [http://www.cibiogem.gob.mx/OGMs/Paginas/Solicitudes\\_Reg\\_OGMs.aspx](http://www.cibiogem.gob.mx/OGMs/Paginas/Solicitudes_Reg_OGMs.aspx)
  
- Cleveland, D.A., D. Soleri, F. Aragón-Cuevas, J. Crossa y P. Gepts. 2005. Detecting (trans) gene flow to landraces in centers of crop origin: lessons from the case of maize in Mexico. *Environ. Biosafety Res.* 4: 197-208.
  
- Cueto, W. J. A., D. G. Reta, J. L. Barrientos, G. Gonzales y E. Salazar. 2006. Rendimiento de Maíz Forrajero en respuesta a fertilización Nitrogenada y densidad de población. *Rev. Fitotec. Méx.* 29 (2): 97-101.
  
- Dyer G.A., J.A. Serratos-Hernández, H.R. Perales, P. Gepts, A. Piñeyro-Nelson, *et al.* (2009) Dispersal of Transgenes through Maize Seed Systems in Mexico. *PLoS ONE* 4(5): e5734. doi:10.1371/journal.pone.0005734.
  
- Elenis, D.S., D.P. Kalogianni, K. Glynou, P.C. Ioannou y T.C. Christopoulos. 2008. Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Anal. Bioanal. Chem.* 392: 347-354.
  
- Fagan J. 2007. Monitoring GMOs released into the environment and the food production system. pp 521-553. En: Traavik, T. y L.L. Ching (Eds). *Biosafety First-Holistic Approaches to Risk and Uncertainty in Genetic Engineering and Genetically Modified Organisms*. Norway. 612 pp.
  
- Haynes, S. R. 2003. Nonradioactive Cycle Sequencing of PCR-amplified DNA. pp. 75-86. En: Dieffenbach, C. W. y G. S. Dveksler (Eds). *PCR primer: a laboratory manual*. New York. 505.

- Hernández S. C. M. y J. Crossa. 1993. A program to estimate the optimum simple size for germplasm conservation. *J. Hered.* 84: 85-86.
- Holden, M.J., M. Levine, T. Scholdberg, R.J. Haynes y G.R. Jenkins. 2009. The use of 35S and *Tnos* expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials. *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (6): 2175-2187.
- Holst-Jensen, A., S.B. Ronning, A. Lovseth y K.G. Berdal. 2003. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal. Bioanal. Chem.* 375: 985-993.
- [http://www.aserca.gob.mx/artman/publish/article\\_183.asp](http://www.aserca.gob.mx/artman/publish/article_183.asp)
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2009. Prontuario de información geográfica Municipal de los Estados Unidos Mexicanos: Erongarícuaro, Michoacán de Ocampo. Clave geoestadística: 16032. 9 pp.
- Joint Research Center (JRC). 2010a. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos: Presentación del manual, métodos de trabajo e introducción al curso. Comisión Europea y Organización Mundial de la Salud, oficina regional de Europa. 11 pp.
- Joint Research Center (JRC). 2010b. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos: Extracción y purificación de ADN. Comisión Europea y Organización Mundial de la Salud, oficina regional de Europa. 18 pp.
- Joint Research Center (JRC). 2010c. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Comisión Europea y Organización Mundial de la salud. Oficina regional de Europa. 34 pp.
- Joint Research Center (JRC). 2010d. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos: Características de los sistemas cualitativos de PCR



descritos en el manual. Comisión Europea y Organización Mundial de la salud. Oficina regional de Europa. 11 pp.

- Joint Research Center (JRC). 2010e. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos: PCR cuantitativa para la detección de OGMs. Comisión Europea y Organización Mundial de la Salud, oficina regional de Europa. 21 pp.
- Kaplinsky, N., D. Braun, D. Lisch, A. Hay, S. Hake y M. Freeling. 2002. Maize transgene results in Mexico are artefacts. *Nature*. 416: 601-602.
- Kasem, S., N. Rice y R.J. Henry. 2008. DNA Extraction from Plant Tissue. pp 219-271. En: Henry, R.J. (Ed). *Plant Genotyping II: SNP Technology*. USA. 285 pp.
- Laird R. J. y J. H. Rodríguez G. 1965. Fertilización de maíz de temporal en regiones de Guanajuato, Michoacán y Jalisco. *SAG*. 50: 1-71.
- Ley de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM). 2005. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión Secretaría General. Secretaría de Servicios Parlamentarios. Dirección General de Bibliotecas. 44pp.
- Liebman, M. 1999. Sistemas de policultivos. pp 191-202. En: Altieri, M. y S. Hecht. *Agroecología: Bases para una agricultura sustentable*. New York. 338 pp.
- Lipp, M., P. Brodmann, K. Pietsch, J. Pauwels y E. Anklam. (1999). IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International* 82: 923–928.
- Lipp, M., A. Bluth, F. Eyquem, L. Kruse, H. Schimmel, G. Van den Eede y E. Anklam. (2001). Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research Technology*. 212: 497-504.

- López-Martínez, J. D., A. Díaz E., E. Martínez R. y R. D. Valdez C. 2001. Abonos Orgánicos y su Efecto en propiedades Físicas y Químicas del Suelo y Rendimiento en Maíz. *Terra*. 19 (4): 293-299.
- Martínez, P. L. 1996. Estudio del comportamiento en el medioambiente de los herbicidas empelados en el maíz. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas, Madrid. 219 pp.
- Metz, F. y J. Fütterer. 2002. Suspect evidence of transgenic contamination. *Nature*. 416: 600-601.
- Ortiz-García S., E. Ezcurra, B. Schoel, F. Acevedo, J. Soberón y A.A. Snow. 2005a. Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico (2003-2004). *Proceedings of the National Academy Sciences*. 102: 12,338-12,343.
- Ortiz-García S., E. Ezcurra, B. Schoel, F. Acevedo, J. Soberón y A.A. Snow. 2005b. Reply to Cleveland et al.'s "Detecting (trans) gene flow to landraces in centers of crop origin: lessons from the case of maize in Mexico. *Environ. Biosafety Res.* 4: 209-215.
- Piñeyro-Nelson, A., J. Van Heerwaarden, H.R. Perales, J.A. Serratos-Hernández, A. Rangel. M.B. Hufford, P. Gepts, A. Garay-Arroyo, R. Rivera-Bustamante y E.R. Alvarez-Buylla. 2009. Transgenes in Mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Molecular Ecology*. 18: 750-761.
- Quist, D. e I.H. Chapela. 2001. Transgenic DNA introgressed into landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature*. 414: 541-543.
- Quist, D. e I.H. Chapela. 2002. Communications arising (reply): Suspect evidence of transgenic contamination/Maize transgene results in Mexico are artefacts. *Nature*. 416: 602-602.
- Reyes C., P. 1990. El maíz y su cultivo. AGT-editor S.A. México, D.F.

- Rocha, M., B. Michel, A. Juárez, A. Nava y A. Otero. 2008. Manual para la toma y el manejo de muestras de maíz para la detección de OGMs en campo y laboratorio. INE, SEMARNAT. 13 pp.
- Ruda de S.E., A. Mongellio y A. Acosta. 2004. Fertilizantes. pp 19-38. En: Ruda de S.E., A. Mongellio y A. Acosta (Eds). Contaminación y salud del suelo. Argentina. 83 pp.
- Rzedowski, J. 1981. Vegetación de México. Ed. Limusa. México. 432 pp.
- Serratos-Hernández, J.A., J.L. Gómez-Olivares, N. Salinas-Arreortua, E. Buendía-Rodríguez, F. Islas-Gutiérrez y A. de-Ita. 2007. Transgenic proteins in maize in the soil conservation area of Federal District, Mexico. *Front Ecol Environ.* 5 (5): 247-252.
- Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 8: 12 pm 30/08/2011. [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=214](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=214).
- van Heerwaarden J., Ortega Del Vecchio D, Alvarez-Buylla ER, Bellon MR. 2012. New Genes in Traditional Seed Systems: Diffusion, Detectability and Persistence of Transgenes in a Maize Metapopulation. *PLoS ONE* 7(10): e46123. doi:10.1371/journal.pone.0046123.
- Vencovsky R. y J. Crossa. 1999. Variance effective population size under mixed self and random mating with applications to genetic conservation of species. *Crop Sci.* 39: 1282-1294.

# ANEXO I



## Encuesta a productores de maíz sobre sus prácticas de manejo 2009



Nombre del Encuestador: \_\_\_\_\_ Colecta: \_\_\_\_\_  
 Estado: \_\_\_\_\_ Celda de Muestreo: \_\_\_\_\_ Municipio: \_\_\_\_\_  
 Fecha: \_\_\_\_\_ Comunidad: \_\_\_\_\_  
 Coordenadas de la Localidad: \_\_\_\_\_ "N"; \_\_\_\_\_ "W"  
 Num. de Encuesta: \_\_\_\_\_ Folio: \*ES/MU/COM/CEL/FE/NI/Num \_\_\_\_\_  
\*E= Número de Encuesta; Est= Estado; MU= número de muestra; COM= Número de Encuesta con Validación; CEL= Número de Encuesta CELDA de Muestreo a la que pertenece la muestra

### Datos Generales

Nombre del Productor: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_  
 Experiencia: \_\_\_\_\_ Nivel de Educación: \_\_\_\_\_  
 Dirección: \_\_\_\_\_  
 Es su principal actividad la producción agrícola: \_\_\_\_\_ Si

### 1. Características de la Siembra

1.1 En cuantas parcelas se cultiva maíz? ..... | | |  
Cantidad

1.2 Favor de proporcionar las características de cada una de sus parcelas

Número y nombre de parcela	Área (has)	Régimen de propiedades de parcelas	Sistema de siembras de parcelas	Tipo de agricultura de las parcelas	Localización/Coordenadas		
					X	Y	
1.-	1.	1. Comunal..... <input type="checkbox"/>	Monocultivo <input type="checkbox"/>	1. Temporal..... <input type="checkbox"/> 2. Riego..... <input type="checkbox"/> 3. Otro..... <input type="checkbox"/> especificar _____	1.		
2.-	2.	2. Propio..... <input type="checkbox"/>				2.	
3.-	3.	3. Prestado..... <input type="checkbox"/>	Poli cultivo <input type="checkbox"/>		3.		
4.-	4.	4. Rentado..... <input type="checkbox"/>				4.	
5.-	5.	5. Otro..... <input type="checkbox"/> especificar _____				5.	

1.3 Favor de indicar el tipo de maíz y variedades que tiene sembrado (o sembró en el último ciclo) en cada una de sus parcelas

No. de Parcela	Criollo	Mejorado (Híbrido/alto rendimiento)	Otro (especificar)	¿Por qué selecciona esta variedad?	Si siembra más de una variedad, preguntar si esas variedades son:	
					Mezcladas	Separadas
Parcela 1						
Parcela 2						
Parcela 3						

1.4 ¿Qué cantidad, cuándo lo sembró y cuál es el rendimiento promedio de cada variedad de maíz en cada parcela?

Numero o nombre de la Parcela	Nombre de la Variedad por el cual usted lo identifica	Cantidad Sembrada (kilogramos por semilla)	Fecha	Rendimiento en kilogramos de semilla/grano

**Encuesta a productores de maíz sobre sus prácticas de manejo 2009**

1.5 ¿Lo que sembró éste año regularmente lo siembra en cada una de sus parcelas? .....  SI  NO \_\_\_\_\_ Indicar motivo del cambio

1.6 ¿Ha notado la presencia de maicillo (*teocinte*) en alguna de sus parcelas? ....  SI \_\_\_\_\_ Indicar en cual parcela

1.7 En caso de encontrarse maicillo, indicar su destino o lo que se hace con dicho maíz? \_\_\_\_\_

**2. Características del Manejo de Semilla**

2.1 Favor de Indicar la procedencia de la semilla por variedad y en cada parcela

Parcela	Nombre de la variedad	Es propia	¿A quién se la compró?	¿A quién se lo Intercambió?	¿Dónde lo compró/intercambió?	¿Cuándo lo compró/intercambió?

2.2 Favor de indicar cuál es el principal problema de la semilla de la(s) variedad(es) de maíz que utiliza?

Variedad	Plagas	Requerimiento de agua	Maleza	Rinde Poco	No se lo compran	Otro

2.3a ¿Ha notado cambios en las propiedades del grano de alguna de sus variedades (por decirlo, el color, sabor, olor, textura, calidad de maza, dureza, tiempo de cocción, tamaño de mazorca u otro)? .....  NO  SI \_\_\_\_\_ Indicar cuál

2.3b ¿Ha notado incremento o pérdida en el rendimiento de sus cultivos? .....  SI  NO

2.4 Del total de su producción de cada variedad, favor de indicar cuanto (mencionar el monto en Kg de semilla/grano) destina para cada rubro

Variedad	Guarda	Vende	Intercambia	Alimento	Forraje	Otros

**3. Características de la Producción**

3.1 ¿Cual es el sistema de labranza que utiliza? Mecanizada (ejemplo Tractor)  Con animales  Manual

3.2 ¿Desde Cuándo utiliza este sistema? \_\_\_\_\_

**Encuesta a productores de maíz sobre sus prácticas de manejo 2009**

3.3 Favor de indicar el tipo de método o la forma que utiliza para cosechar?

¿Como cosecha?			Si es mecanizada, indicar el tipo de maquinaria	Si es cosecha manual, indicar cuántos jornaleros utiliza
Manual	Mecanizada	Otero		

3.4a Favor de proporcionar información sobre el uso de plaguicidas en sus parcelas

Tipo de Plaguicida	SI/NO	¿Cuál tipo?	Dosis/Ha	Tipo de plaga	Costo
Herbicidas					
Fungicidas					
Insecticidas					
Bactericidas					
Otros					

3.4b Favor de proporcionar información sobre el uso de fertilizantes en sus parcelas

Fertilizante	SI/NO	¿Cuál Tipo?	Dosis/Ha	Costo
Orgánicos				
Químicos				

**4. Comercialización**

4.1 ¿Vende Maíz?  SI  NO

¿Con que frecuencia? \_\_\_\_\_

¿Por qué no vende? \_\_\_\_\_  
(Si responde negativamente saltarse a la pregunta 5.1)

4.2 ¿Por favor indicar por cada variedad de maíz que venda como semilla o grano, el precio y volumen que vende, así como a quien lo vende y el destino del producto

Nombre por el cual identifica las Variedades	Volumen (Ton. semilla/grano en unidad de medida)	Precio (pesos por Ton. Semilla/grano en unidad de medida)	Quien lo Compra	Destino
1.			1. Mercado Comunal..... <input type="checkbox"/>	
2.			2. Mercado del Municipio.... <input type="checkbox"/>	
3.			3. Mercado Estatal..... <input type="checkbox"/>	
4.			4. Mercado Regional..... <input type="checkbox"/>	
5.			5. Mercado Nacional..... <input type="checkbox"/>	
			6. Exportación..... <input type="checkbox"/>	

**Encuesta a productores de maíz sobre sus prácticas de manejo 2009**

4.3 Favor de proporcionar los siguientes datos respecto al transporte de su venta (maíz en grano o semilla)

Nombre por el que identifica las Variedades	Distancia en metros de su parcela/troje al lugar en donde vende su producción	Medio de Transporte	Tiempo de Transporte (Hrs.)	Costo de Transporte (en pesos por cada venta)

4.4 Favor de indicar el uso del maíz en grano o semilla que vende?

Consumo humano	Consumo Animal	Productos Derivados	Siembra	Cantidad

**5. Apoyos**

5.1 ¿Pertenece a algún programa de gobierno que le proporcione ayuda?.....  SI  NO

(Si contestó afirmativamente llenar la tabla siguiente, de lo contrario pasarse a la pregunta 6.1)

Nombre del Programa	Tiempo en que ha pertenecido al Programa	Tipo de Apoyo	Cantidad (en kilos de semilla)
		1. Semilla.....0 2. Recursos económicos.....0 3. Asistencia técnica.....0	

Si el apoyo es en semilla preguntar lo siguiente, de lo contrario pasar a la pregunta 6.1

5.2 A que se destina la semilla? (Marcar solo con una X)

Auto consumo	Siembra	Forraje	Otro

5.3 Si siembra la semilla que recibe como apoyo, la mezcla con su propia semilla?.....  SI  NO ¿Por qué?

**6. Características del Hogar**

6.1 Me podría indicar el número de personas que viven en su hogar. Cuántas personas viven con usted de acuerdo a su sexo y edad?

Hombres mayores de 16 años	Mujeres mayores de 16 años	Hombres menores de 16 años	Mujeres menores de 16 años	Tamaño de la familia

**Encuesta a productores de maíz sobre sus prácticas de manejo 2009**

6.2 De las personas que viven con usted ¿Cuántas le ayudan en actividades de siembra/cosecha? \_\_\_\_\_

6.3 ¿Puede decirnos si algún miembro de la familia tiene trabajo fuera de su campo?.....   \_\_\_\_\_  
NO SI Indicar cuantas

6.4 Indicar Cuales son los ingresos totales anuales fuera de campo?.....\$

6.5 Puede decirnos si algún miembro de su familia vive en Estados Unidos? .....    
SI NO

6.6 De ser así ¿su hogar recibe remesas?.....   \_\_\_\_\_  
NO SI Indicar la cantidad anual

6.7 Le ha traído semillas?.....    
SI NO

6.8 Usted y los miembros de su familia pertenecen a algún grupo étnico?.....   \_\_\_\_\_  
NO SI Indicar a cual

6.9 Hablan alguna lengua indígena?.....   \_\_\_\_\_  
NO SI Indicar cual

6.10 ¿Cuál de las siguientes afirmaciones es verdadera para su hogar? Seguro que necesitamos todo esto?

Su hogar cuenta con:				
Electricidad	Televisión	Horno de gas o eléctrico	ventilador	Aire acondicionado

Su hogar cuenta con:				
Camioneta con caja o algún automóvil de carga	Carreta, calandria u otros vehículos de tracción animal	Acceso de agua de la red pública	Drenaje o desagüe conectado en la red pública	Fosa séptica

6.11 Cuantos Focostiene en su hogar? \_\_\_\_\_

**7. Opiniones**

Por último, nos gustaría saber su opinión sobre la nueva dase de maíz en Estados Unidos y Europa conocido como transgénico o maíz GM, el cual a través de nuevas técnicas es mejorado y puede ser resistente a herbicidas y plagas.

7.1 ¿Ha escuchado hablar de este tipo de maíz? .....   \_\_\_\_\_  
NO SI Indicar como se entero de ellos

7.2 ¿Estaría dispuesto a comprar y sembrar este maíz?.....   \_\_\_\_\_  
SI NO Indicar la razón

7.3 ¿Cuánto estaría dispuesto a pagar por estas semillas?.....\$

7.4 Si la sembrará ¿la combinará con otras plantas?.....   \_\_\_\_\_  
SI NO ¿Porqué?

7.5 ¿Estaría dispuesto a comer esta clase de maíz?.....   \_\_\_\_\_  
SI NO ¿Porqué?



## ANEXO II

 Instituto Nacional de Ecología	<b>INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA</b> <b>FORMATO DE TOMA DE MUESTRAS</b>	 SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES
---	---	--

Fecha:	Encuesta: SI ___ NO ___
No. de Muestra:	Productor:
Folio: EST/MUN/COM/CELDA/FECHA/INI/NUM	

<b>Producto:</b>	<b>Variedad:</b>
<b>Cantidad:</b>	<b>Destino:</b>
<b>Tipo de colecta:</b>	C. animal ( )                  Semilla ( )
100 mazorcas 10 semillas; en pie ( )	C. humano ( )                Otro ( )
100 mazorcas 10 semillas; pizcado ( )	
Semillas desgranadas; pizcado ( )	<b>Procedencia de la semilla:</b>
Semillas desgranadas; prop. productor ( )	
Hoja ( )	<b>Estado:</b>
Otro ( )	
	<b>Municipio:</b>
	<b>Localidad:</b>

<b>Localización del terreno o domicilio:</b>
--

<b>Antecedentes de uso del terreno o semilla durante los tres últimos años:</b>
---

<b>Propietario de terreno:</b>
<b>Tamaño del terreno:</b>

Se asienta que se le informó al ciudadano \_\_\_\_\_ que se llevará a cabo un monitoreo de maíz y se le solicitó su autorización para coleccionar muestras en el terreno localizado en \_\_\_\_\_.

Se le informó que el objetivo del monitoreo es determinar la presencia o ausencia de material genéticamente modificado y se le explicó que es un OGM. Una vez entendido el propósito, da su autorización para llevar a cabo la colecta.

\_\_\_\_\_

CIUDADANO

\_\_\_\_\_

RECOLECTOR

## ANEXO III

### Protocolo para extracción de ADN genómico

El método consiste en añadir 1.8 ml de agua desionizada estéril a cada uno de los tubos para centrifuga con 5g de maíz en polvo de cada muestra de trabajo y mezclar con una espátula. Posteriormente se agregan 3ml de tampón a base de CTAB y se mezcla nuevamente con una espátula.

A la mezcla se le añaden 240 $\mu$ L de proteinasa K y en seguida se agita e incuba a 65°C en baño María durante 30 minutos.

Al terminar la incubación añadir 240 $\mu$ L de ribonucleasa A, inmediatamente se agita y se deja incubar a 37°C durante 20 minutos. Tanto la proteinasa K como la Ribonucleasa A, son necesarias para eliminar todas las proteínas y moléculas de ARN presentes en las muestras de trabajo para obtener ADN más puro y de mayor calidad para el análisis.

Centrifugar durante 20 minutos las muestras de trabajo a 4,500 rpm.

Trasladar el sobrenadante de los tubos a otro tubo para centrifuga y agragar 3 ml de cloroformo.

Agitar gentilmente durante 30 segundos. El cloroformo se emplea para desnaturalizar las proteínas y para facilitar la separación de las fases acuosa y orgánica durante la centrifugación de las muestras (Kasem, 2008; JRC, 2010).

Centrifugar durante 15 minutos a 4,500 rpm para separar nuevamente las fases.

Repetir esta separación con cloroformo.

Añadir 2 volúmenes de solución de precipitación a base de CTAB y mezclar pipeteando. Cuando el detergente CTAB se añade en el buffer de extracción, se forma un complejo insoluble con el ADN.

El complejo ADN-CTAB se precipita a bajas concentraciones de sal y las sustancias contaminantes permanecen en la solución. Así, los polisacáridos, los compuestos fenólicos, lípidos y proteínas de las células vegetales permanecen suspendidos en el sobrenadante y se pueden eliminar por lavado.

La eliminación de estos compuestos es necesaria, pues pueden inhibir numerosas reacciones bioquímicas, incluyendo la de la PCR. La pureza del ADN puede ser severamente afectada por varios contaminantes, que pueden derivarse del material que se está analizando (polisacáridos, lípidos, polifenoles, etc.), o químicos empleados durante la extracción del ADN (cloroformo, etanol, NaCl, CTAB).

El complejo ADN-CTBA se incuba a temperatura ambiente durante 60 minutos. Después centrifugar por 5 minutos a 4,500 rpm.

Decantar el sobrenadante y disolver el precipitado en 350  $\mu$ L de NaCl [1.2M] y se pasar a un tubo de 1.5 ml. El NaCl se usa para separar a los ácidos nucleicos del detergente.

Añadir 350  $\mu$ L de cloroformo y agitar el tubo por 30 segundos. Centrifugar durante 10 minutos a 14,000 rpm para separar las fases.

Trasladar la capa superior a otro tubo de microcentrifugación, añadir 0.6 volúmenes de isopropanol y agitar. El isopropanol se encarga de aislar el ADN de alto peso molecular de los polisacáridos.

Nuevamente centrifugar por 15 minutos a 14,000 rpm, decantar el sobrenadante y agregar 500µL de etanol al 70% y agitar. El etanol permite que los ácidos nucleicos monomericos y de cadena corta (ADN) queden suspendidos en solución; mientras que, los fragmentos de ARN producidos por la adición de la Ribonucleasa A se pierden en este proceso. Adicionalmente, el etanol también sirve para enjuagar el pellet de ADN precipitado, para remover cualquier indicio de sales; permitiendo así, una mayor purificación de los ácidos nucleicos de la sal residual.

Centrifugar durante 10 minutos a 14,000 rpm y decantar el sobrenadante.

Al final de este proceso se obtienen pequeños pellets, que se secan a baño seco en el evaporador.

Secar los pellets a temperatura ambiente durante 24 horas. Re suspender los pellets en 100µL de agua inyectable estéril y mantener las muestras a 4°C.

Aunque la cantidad de ADN extraído de las muestras de maíz por el método de CTAB es baja, la calidad y pureza del ADN es satisfactoriamente mayor comparadas con la de otros métodos; tales como el método Chelex-100, ROSE, columnas de sílica y lisis alcalina (Bonfini *et al.* 2002).

## ANEXO IV

### Protocolo de cuantificación de ADN genómico

Para este procedimiento, el primer paso es calentar los microtubos de centrifugación con el ADN a 45°C en baño seco durante 5 minutos, el calentamiento de las muestras es necesario debido a su previa refrigeración.

Encender el biofotómetro y dejar calentar la lámpara durante 5 minutos.

Ajustar el biofotómetro para obtener la concentración de la muestra usando solo una pequeña fracción de esta, para llevar a cabo esto, se emplea el factor de dilución 5µL + 95µL.

Establecer el blanco agregando 100µL de agua ultrapura.

Cuantificar las muestras de trabajo. Diluir 5µL de muestra de ADN con 95µL de agua inyectable. Esta dilución se lleva a cabo dentro de la celda UVette y se re suspende dentro de ella con mucho cuidado para homogeneizarla. Inmediatamente, la celda se inserta en la ranura para la celda del biofotómetro y se mide la concentración de ADN. Este paso se repite para cada una de las muestras de trabajo.

Para determinar el grado de pureza de cada muestra, se obtienen dos diferentes cocientes de absorbancia. El cociente de los valores A260/A280 se emplea para conocer el grado de contaminación por proteínas en el ADN de las muestras de trabajo. Mientras que, el cociente de los valores A260/A230 se utiliza para determinar el nivel de pureza de contaminantes como hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos y en general cualquier compuesto o reactivo empleado durante la extracción de ADN (Kasem *et al.* 2008).

## ANEXO V

### **Protocolo de electroforesis y sistema de adquisición de imágenes de Integridad del ADN genómico, PCR Zeina, PCR 35S y PCR T-nos.**

Preparar un gel de agarosa al 2%, utilizar un matraz erlenmeyer de 250ml con 100ml de Buffer TAE 1X y 2 g de agarosa.

Calentar en un horno de microondas hasta disolver la agarosa en el buffer. Agitar manualmente el matraz hasta que los cristales de agarosa estén completamente disueltos.

Armado la cámara de electroforesis, ajustar la charola del gel y colocar el peine de acrílico. Cuando la solución se enfrié un poco, verter en el recipiente con el peine de acrílico para darle forma al gel y a los carriles.

Al solidificar el gel, quitar el peine de acrílico e introducir en la cámara de electroforesis. Inmediatamente verter buffer TAE 1X a la cámara hasta cubrir el gel de agarosa.

Mezclar 10 $\mu$ L de muestra (ya sea de ADN cuantificada, PCR Zeina, PCR 35S o PCR T-nos, según el caso) con 4 $\mu$ L de buffer de carga. También mezclar 4 $\mu$ L de marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA con 3 $\mu$ L de buffer de carga.

El buffer de carga se emplea para aumentar la densidad de la muestra para que las gotas de ADN caigan uniformemente en el pocillo y no queden suspendidas en el buffer de corrida. Se añade una línea con el marcador de peso molecular que contiene un número determinado de segmentos de ADN de tamaño molecular conocidos, lo cual facilita la labor de determinar las dimensiones de los amplicones que se analizan.

Cada muestra se deposita en un carril diferente y el orden utilizado en los análisis de este trabajo fue el siguiente: marcador de peso molecular ( $\lambda$  DNA), Blanco (agua) y las muestras con ADN.

Por último, conectar los cables de la cámara de electroforesis para generar la corriente eléctrica y dejar correr el gel durante 2 horas a 100V.

#### ADQUISICION DE IMAGEN

Teñir el gel con solución de bromuro de etidio (0.5 $\mu$ g/ml) durante 15 minutos y enjuagar en un recipiente con agua y carbón activo por un minuto.

Después de la tinción, trasladar el gel a un cuarto oscuro. Con luz UV del cuarto oscuro y por medio del programa LabWorks se visualizaron las bandas de ADN presentes en el gel.

Para mejorar la resolución de la imagen, se ajusta el brillo y el contraste en la computadora, dándole una mayor calidad a la imagen.

La imagen de los resultados se guarda en la memoria del equipo y en una USB, como respaldo.

## ANEXO VI

### Gráficas y tablas que muestran los resultados de las encuestas de campo

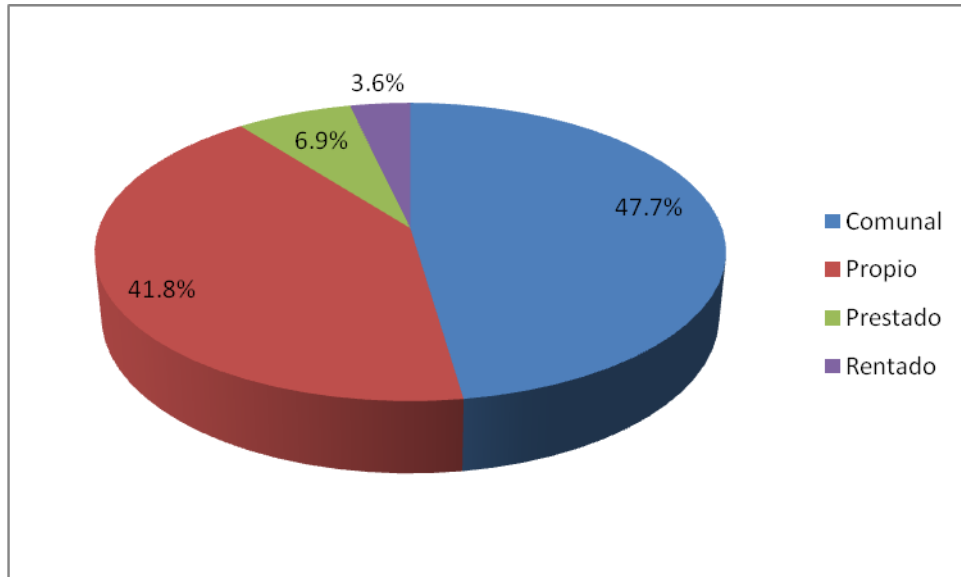


Figura 2: El porcentaje que corresponde a cada régimen de propiedad en todo el municipio. Las hectareas muestreadas en el Municipio de Erongarícuaro fueron de 180.75 de un total de 925ha sembradas, según el INEGI (2009). En el Municipio tenemos que, el 47.7% corresponde a tierras comunales, el 41.8% corresponde a tierras propias, el 6.9% a tierras prestadas y solo el 3.6% a tierras rentadas.

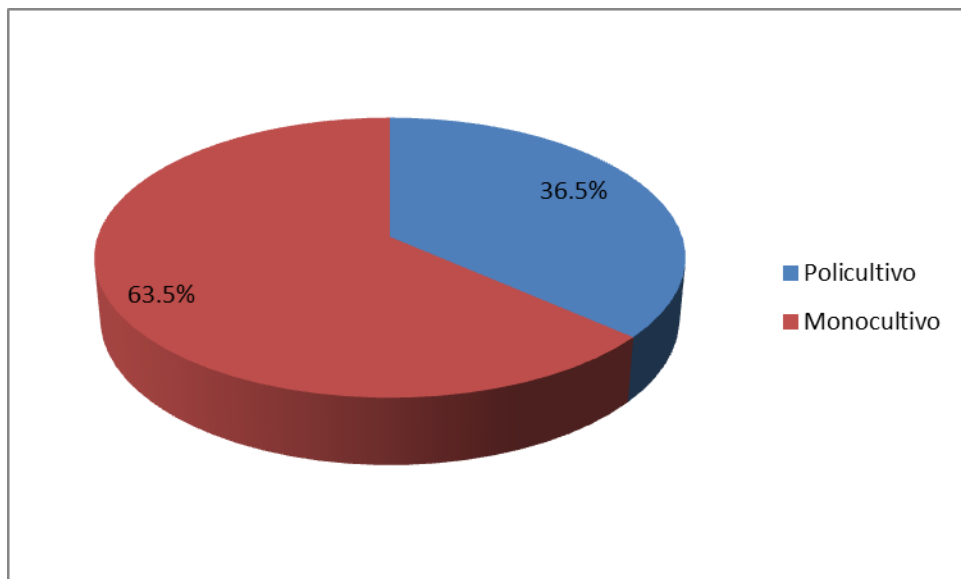


Figura 3: Esta figura representa el porcentaje del sistema de siembras practicado en el Municipio de Erongarícuaro. Cabe recordar que, el número de agricultores encuestados fue de 74. Tenemos aquí, que la gran mayoría de los agricultores (63.5%) utilizan el sistema de monocultivo mientras que la minoría (36.5%) emplean el sistema de policultivo en sus tierras.



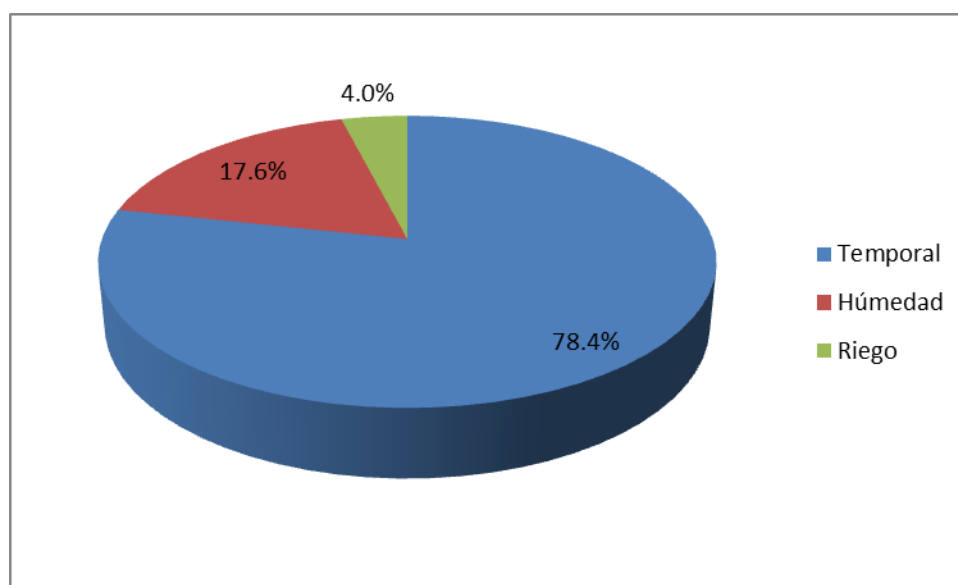


Figura 4: Porcentajes de los tipos de agricultura practicados en el municipio de Erongarícuaro. El 78.4% corresponden a 137.5ha de tierras sembradas de maíz, el 17.6% corresponde a 29.5ha sembradas con maíz, mientras que el 4% corresponde a 15.5ha; todo esto corresponde a los 74 agricultores encuestados.

<b>VARIEDAD</b>	<b>RAZA</b>
<b>Blanco</b>	Purépecha-Chalqueño Purépecha-Pepitilla Cónico Cacahuacintle
<b>Amarillo</b>	Purépecha-Chalqueño Cónico
<b>Pozolero</b>	Purépecha-Elotes Occidentales Cónico-Elotes Occidentales Elotes Occidentales
<b>Negro</b>	Cónico-Elotes Occidentales Purépecha-Elotes Occidentales
<b>Pinto</b>	Híbridos de cualquier raza y variedad
<b>Híbrido</b>	Halcón
<b>Maíz de EUA</b>	Carolina del Norte, EUA.

Cuadro 12: Las cinco variedades de maíz criollo sembradas en el Municipio de Erongarícuaro. Cada variedad proviene de una raza en específico, o bien, de la cruce entre las razas arriba mencionadas. El maíz Pinto solamente se produce a partir de la cruce entre las diferentes variedades que existen en este Municipio. En cuanto al maíz híbrido y al maíz proveniente de EUA, es imposible determinar a la raza a la que pertenecen.

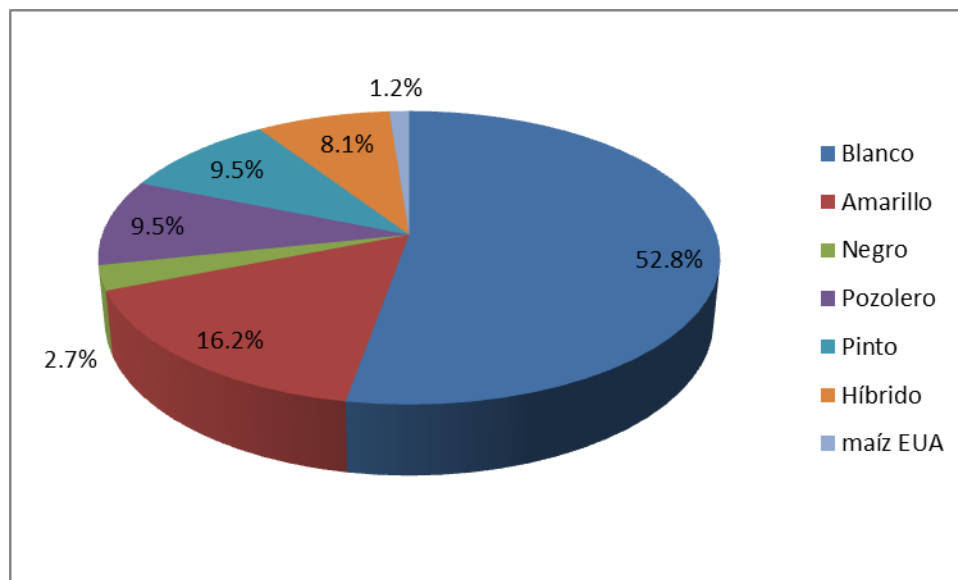


Figura 5: Porcentajes de las diferentes variedades de maíz sembradas en todo el Municipio de Erongarícuaro, Michoacán. Sin tomar en cuenta al maíz híbrido y al de EUA, son 5 variedades de maíz sembradas en el Municipio; a pesar de esto, cada una de estas variedades puede provenir de diferentes razas.

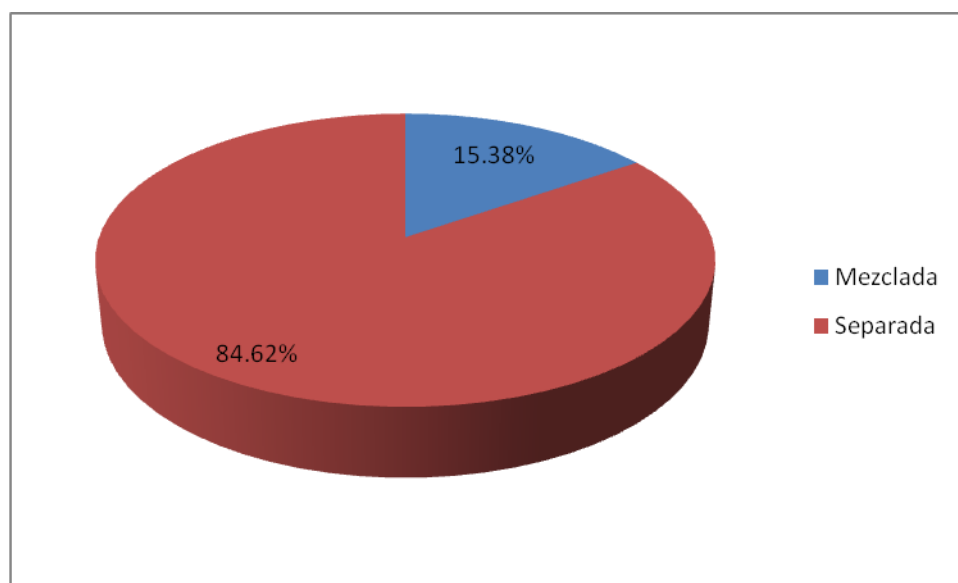


Figura 6: Porcentaje de variedades de maíz que son sembradas por separado y el porcentaje de las variedades que son sembradas mezcladas en el Municipio. El 84.62% de los agricultores siembra sus variedades de manera separada, mientras que el 15.38% las siembra de manera mezclada.

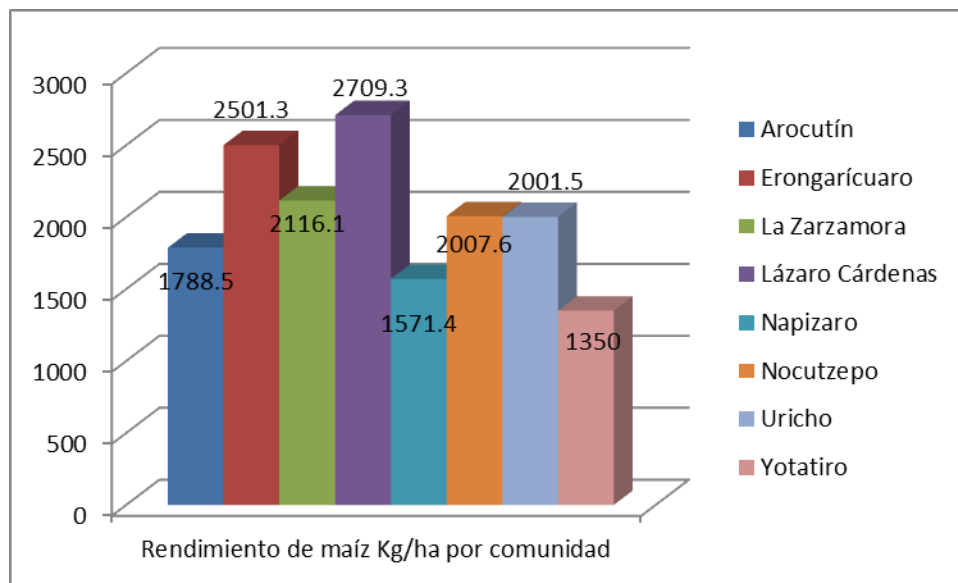


Figura 7: Rendimiento en kg/ha de todas las variedades de maíz sembrado en cada comunidad del Municipio de Erongarícuaro, Michoacán. El mayor rendimiento se encontró en la comunidad de Lázaro Cárdenas con 2709.3 kg/ha, seguido de Erongarícuaro con 2501.3 kg/ha, La Zazamora con 2116.1 kg/ha, Nocutzepo con 2007.5 kg/ha, Uricho con 2001.5 kg/ha, Arocutín con 1788.5 kg/ha, Napizaro con 1571.4 kg/ha y por último Yotatiro con 1350 kg/ha.

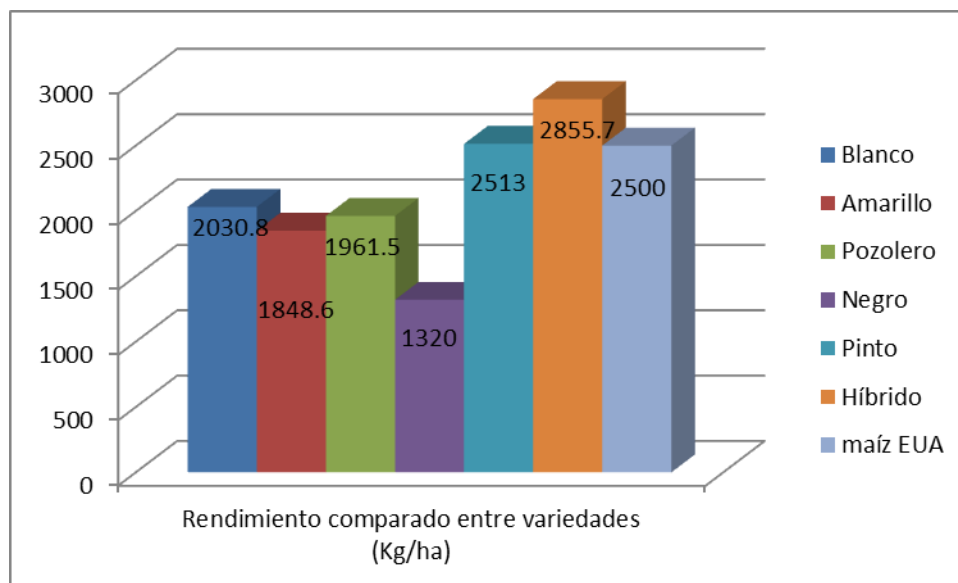


Figura 8: Rendimiento general de las diferentes variedades de maíz sembradas en el Municipio de Erongarícuaro, Michoacán. El maíz que más rindió fue el maíz híbrido con 2855.7 kg/ha, seguido del maíz pinto con 2513 kg/ha, el maíz traído de E.U.A con 2500 kg/ha, el maíz blanco con 2030.8 kg/ha, el maíz pozolero con 1961.5 kg/ha, el maíz amarillo con 1848.6 kg/ha y por último el maíz negro con 1320 kg/ha.

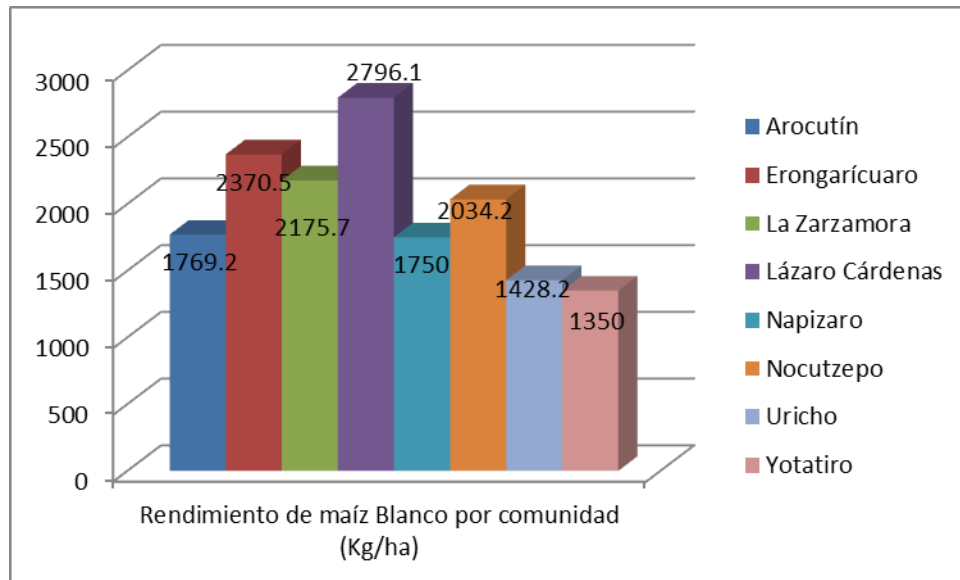


Figura 9: Rendimiento del maíz Blanco sembrado en cada una de las diferentes localidades del Municipio. La comunidad en la que rindió más el maíz blanco fue en Lázaro Cárdenas con 2796.1 kg/ha, en contraste la comunidad de Yotatiro fue la menor con rendimiento de este maíz con tan sólo 1350 kg/ha.

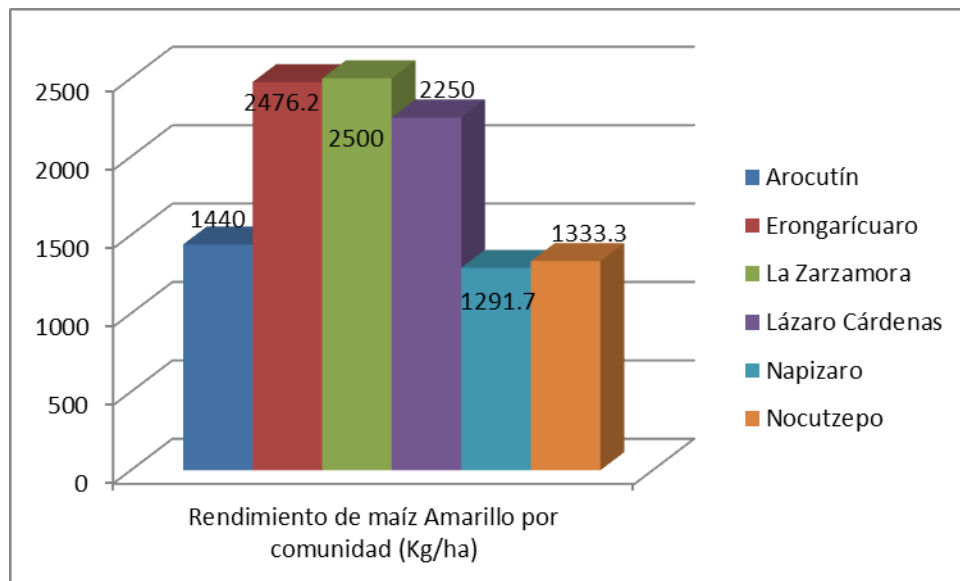


Figura 10: Se presenta el rendimiento de maíz Amarillo en las 6 comunidades que lo siembran. De estas comunidades, en La Zarzamora, el maíz amarillo es producido con el mayor rendimiento (2500 kg/ha); mientras que, en contraste, Napizaro es quién obtuvo el menor rendimiento para esta variedad (1291.7 kg/ha).

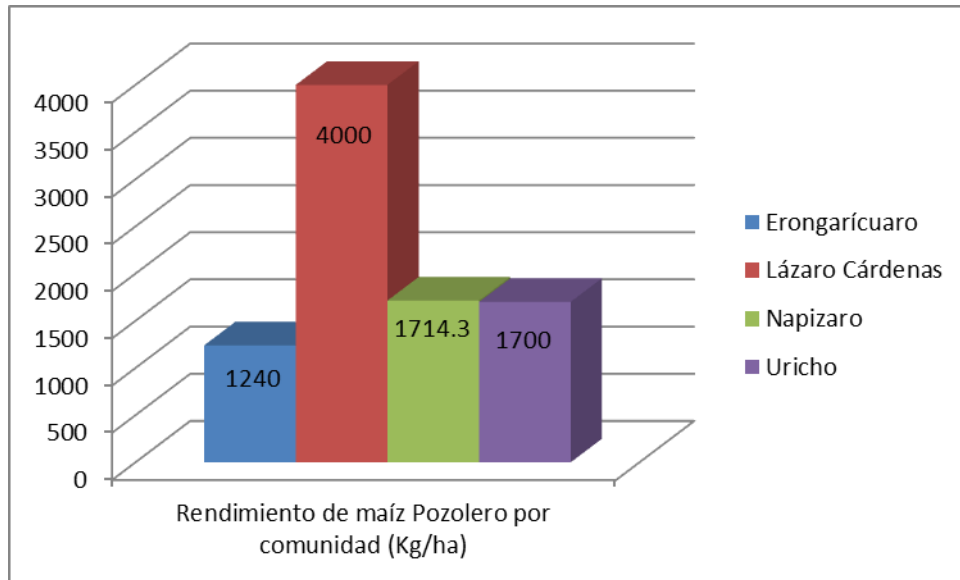


Figura 11: Rendimiento del maíz Pozolero, sembrado en 4 diferentes comunidades del Municipio. El mayor rendimiento de esta variedad se obtuvo en la comunidad de Lázaro Cárdenas con 4000 kg/ha, seguido de Napizaro con 1714.3 kg/ha, Uricho con 1700 kg/ha y por último en Erongarícuaro con 1240 kg/ha.

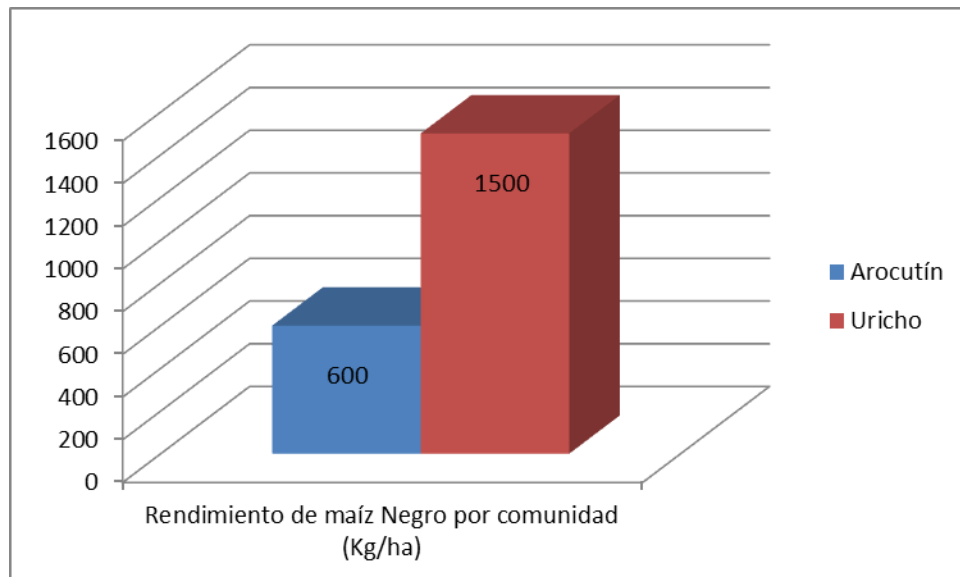


Figura 12: En la gráfica se muestra el rendimiento del maíz Negro, sembrado en tan sólo dos comunidades del municipio. En Uricho es donde el maíz negro alcanzó el mayor rendimiento con 1500 kg/ha, mientras que en Arocutín solo alcanzó un rendimiento de 600 kg/ha.

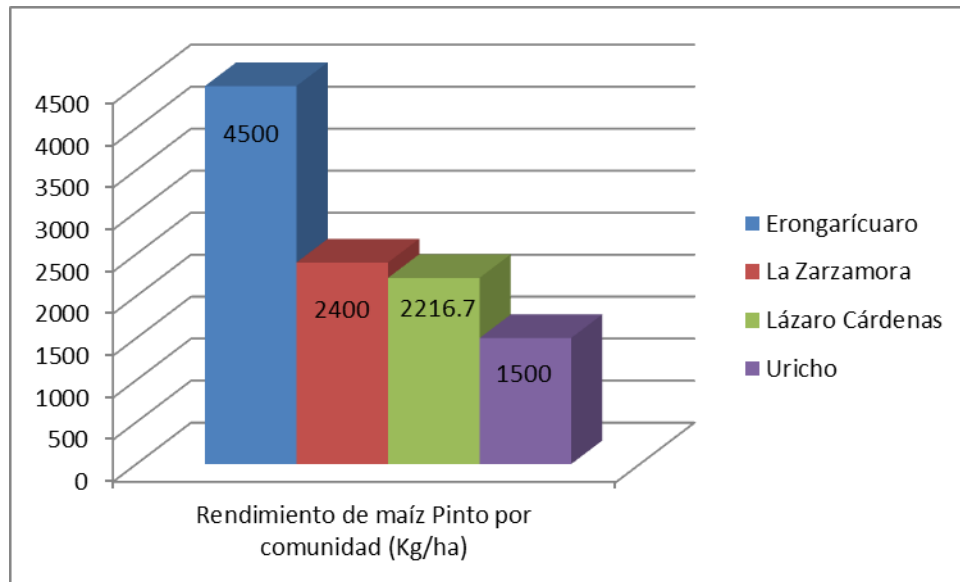


Figura 13: Este es el rendimiento del maíz pinto sembrado en todo el Municipio. El mayor rendimiento se obtuvo en Erongarícuaro con 4500 kg/ha, seguido de La Zarzamora con 2400 kg/ha, Lázaro Cárdenas con 2216.7 kg/ha y finalmente Uricho con 1500 kg/ha.

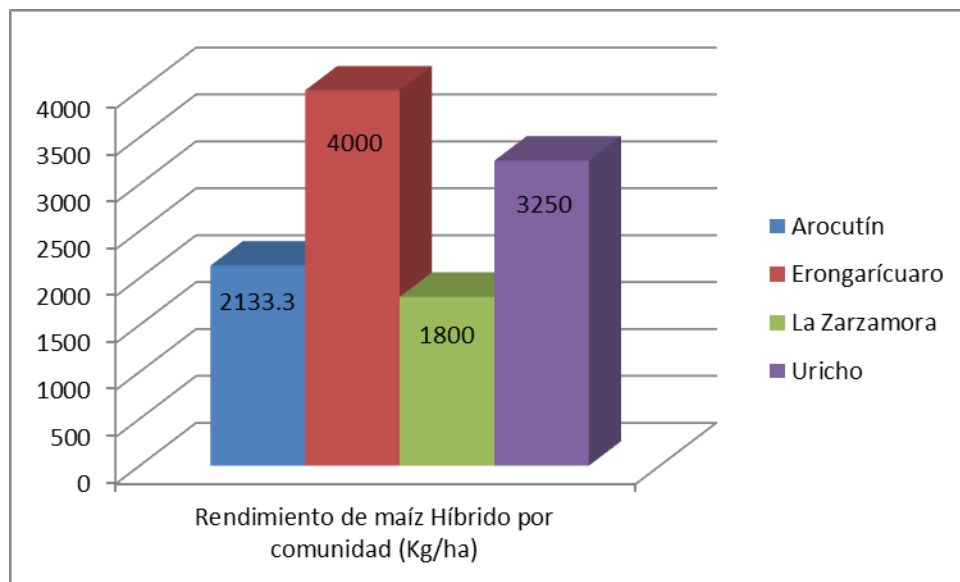


Figura 14: Aquí se representa el rendimiento del maíz híbrido en las únicas localidades que lo siembran. El mayor rendimiento se encontró en Erongarícuaro con 4000 kg/ha, en Uricho con 3250 kg/ha, en Arocutín con 2133.3 kg/ha y por último en La Zarzamora con 1800 kg/ha.

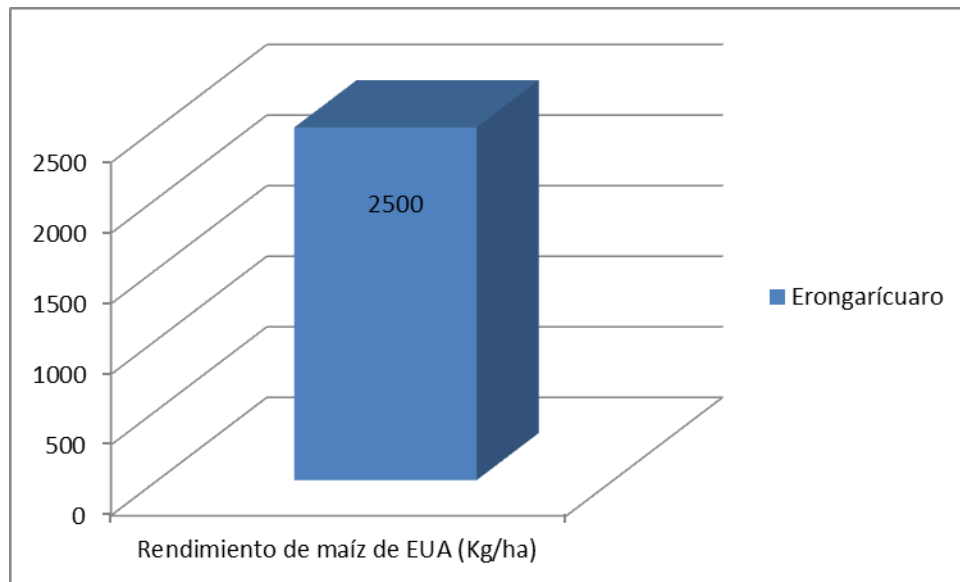


Figura 15: Únicamente en la comunidad de Erongarícuaro, un agricultor sembró maíz de EUA, para ser más exactos maíz procedente de Carolina del Norte. Su rendimiento fue de 2500 kg/ha.

<b>Lugar de estudio</b>	<b>Año</b>	<b>Tipo de siembra</b>	<b>Fuente</b>	<b>Rendimiento</b>
<b>Erongarícuaro</b>	2009	Temporal	INE	2.05 t/ha.
<b>Erongarícuaro</b>	2009	Riego	INE	3 t/ha.
<b>Jalisco</b>	2009	Temporal	SIAP	5 t/ha.
<b>Yucatán</b>	2009	Temporal	SIAP	0.4 t/ha.
<b>Michoacán</b>	2009	Temporal	SIAP	2.6 t/ha.
<b>Sinaloa</b>	2009	Riego	SIAP	10.5 t/ha.
<b>Coahuila</b>	2009	Riego	SIAP	1.7 t/ha.
<b>Michoacán</b>	2009	Riego	SIAP	3.4 t/ha.
<b>República Mexicana</b>	2000- 2007	Temporal	Financiera Rural	2.3 t/ha.
<b>República Mexicana</b>	2000- 2007	Riego	Financiera Rural	7.1 t/ha.

Cuadro 13: Tres diferentes estudios realizados sobre el rendimiento del maíz bajo siembra de temporal y siembra de riego. Los estudios mostrados fueron hechos en el Municipio de Erongarícuaro; otro en el que se compara al estado de Michoacán con los estados de mayor y menor rendimiento de maíz en el país; y un estudio que se hizo a nivel nacional comparando el rendimiento entre el tipo de siembra de temporal con el de riego.

Al hacer la comparación entre estos estudios, observamos que, el rendimiento de la siembra temporal de maíz en el Municipio de Erongarícuaro con respecto al de otros estados, es intermedio; mientras que, el rendimiento de la siembra de riego comparada entre Erongarícuaro y otros estados, es baja. Si se hace la comparación del rendimiento de siembra de temporal del Municipio con el Nacional, los valores municipales se aproximan a los nacionales. En cambio, los valores de siembra de riego municipales y nacionales, difieren considerablemente.



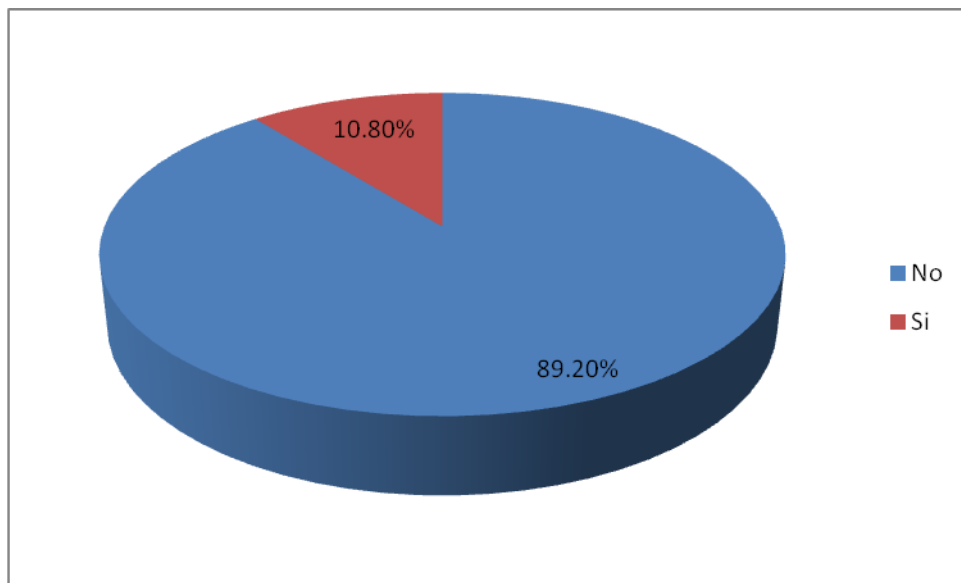


Figura 16: Porcentaje de personas que han sembrado regularmente la misma cantidad de maíz en los últimos años contra la que lo ha dejado de hacer por diversas causas. Esto representa que sólo 8 personas han mantenido su siembra constante, mientras que 66 personas la han discontinuado.

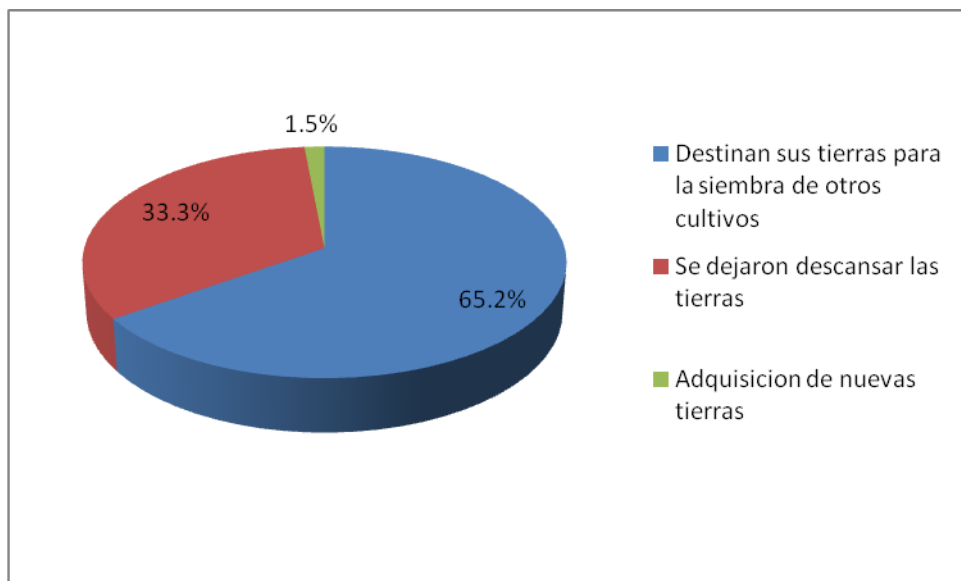


Figura 17: Diferentes razones por las cuales no se sigue sembrando la misma cantidad de maíz en el Municipio. Cabe destacar que sólo del 89.2% que no sembraron la misma cantidad de maíz que en años anteriores, el 1.5% incrementó la siembra al adquirir más tierras para su siembra, mientras que el 98.5% dejaron de sembrar maíz.

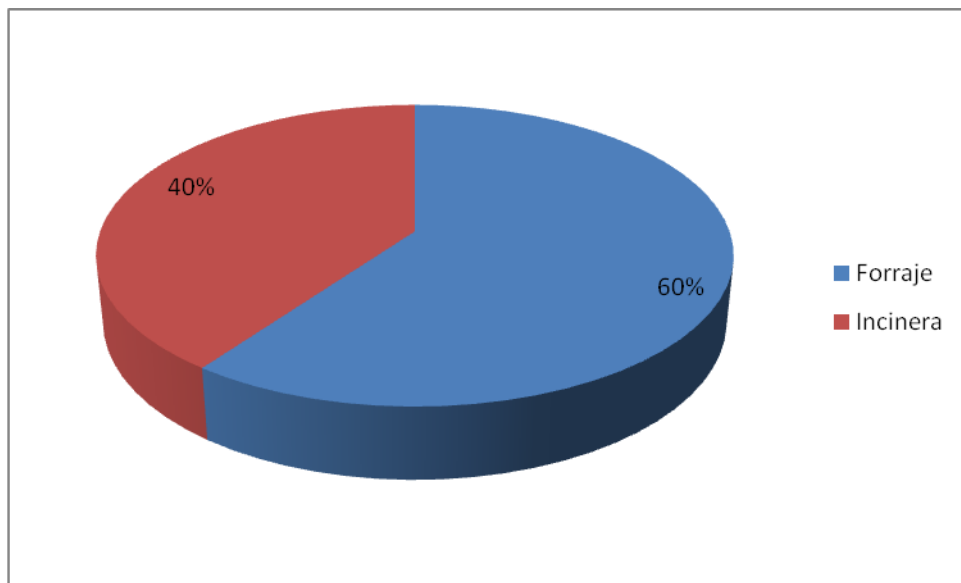


Figura 18: Destino del maicillo (teocintle) que crece en las parcelas de los productores. Es importante señalar que el maicillo sólo se encuentra en las dos comunidades con mayor altitud del municipio, donde la temperatura y la humedad son más bajas y más altas respectivamente, comparandose con el resto de las comunidades del Municipio. La gran mayoría de las personas de la comunidad de Lázaro Cárdenas (60%) las de de forraje para sus animales, principalmente vacas y cerdos; mientras que el resto (40%) lo incinera por considerarlo sumamente difícil de erradicar.

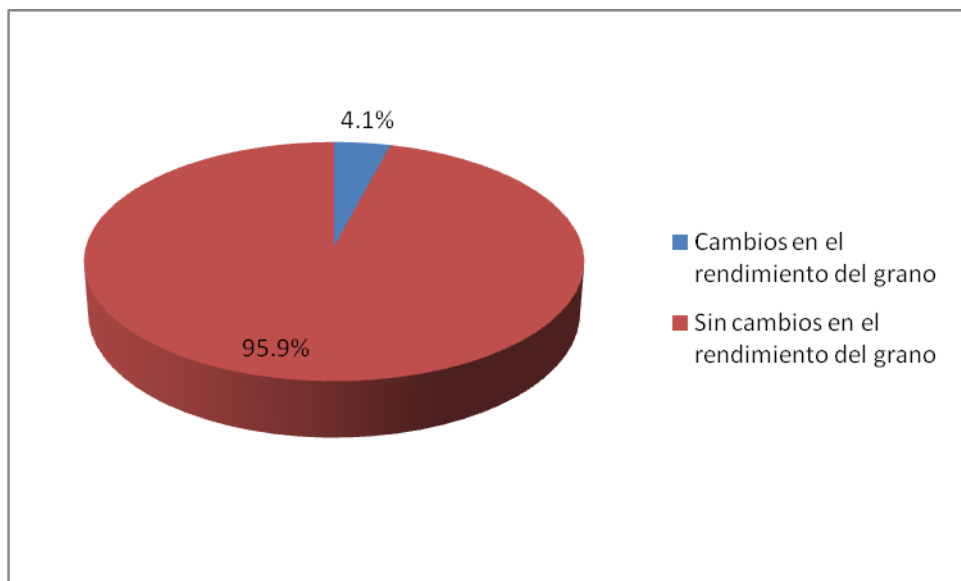


Figura 19: Este es el porcentaje que corresponde a las personas que han detectado cambios en el rendimiento de su maíz a lo largo del tiempo. Sólo el 4.1% de 74 agricultores han notado cambios negativos en sus granos de maíz.

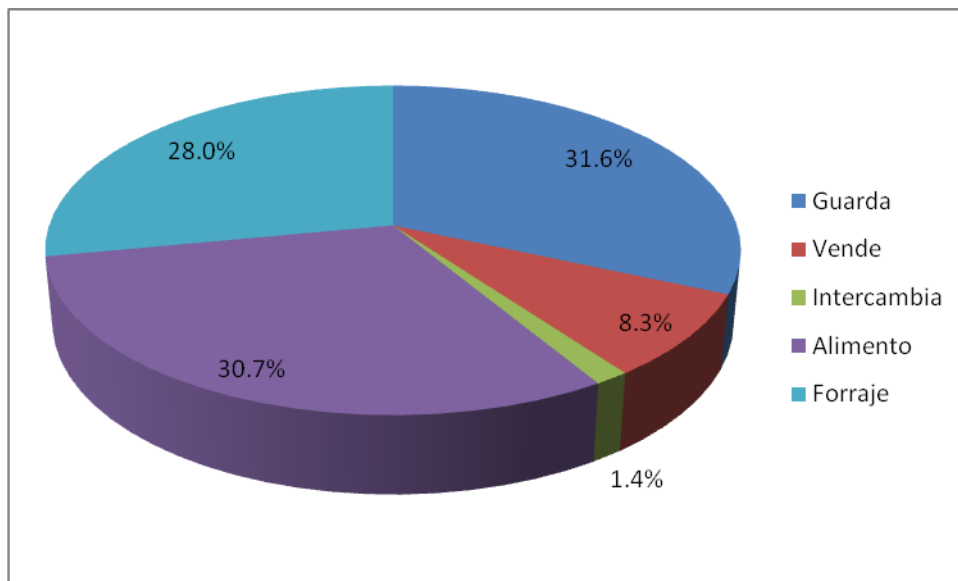


Figura 20: Esta gráfica representa los usos que se les da al maíz Blanco en todo el Municipio. Se puede notar que, al maíz Blanco se le da un uso equilibrado en cuanto a usos de alimentación propia (30.7%), forraje (28%) y reserva para la siguiente temporada de siembras (31.6%); solo el 8.3% vende maíz y el 1.4% lo intercambió este año.

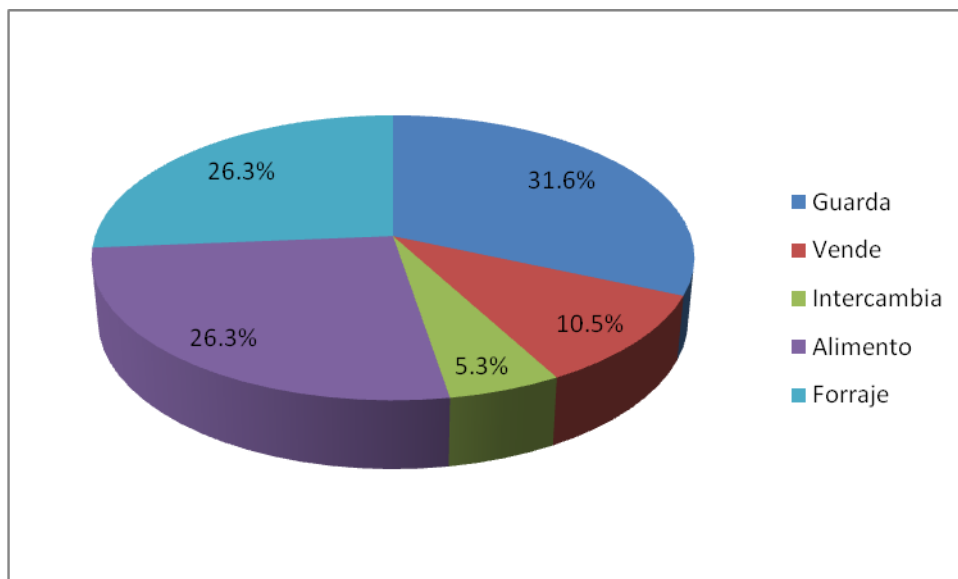


Figura 21: Estos son los usos mas comunes que se le da al maíz Amarillo en el Municipio de Erongarícuaro. Este maíz, a diferencia del Blanco, se vende en un mayor porcentaje (10.5%) y se intercambia más (5.3%), el 26.3% se da de forraje para los animales, la misma cantidad es destinada al alimento propio. Sólo el 31.6% de este maíz se intercambia.

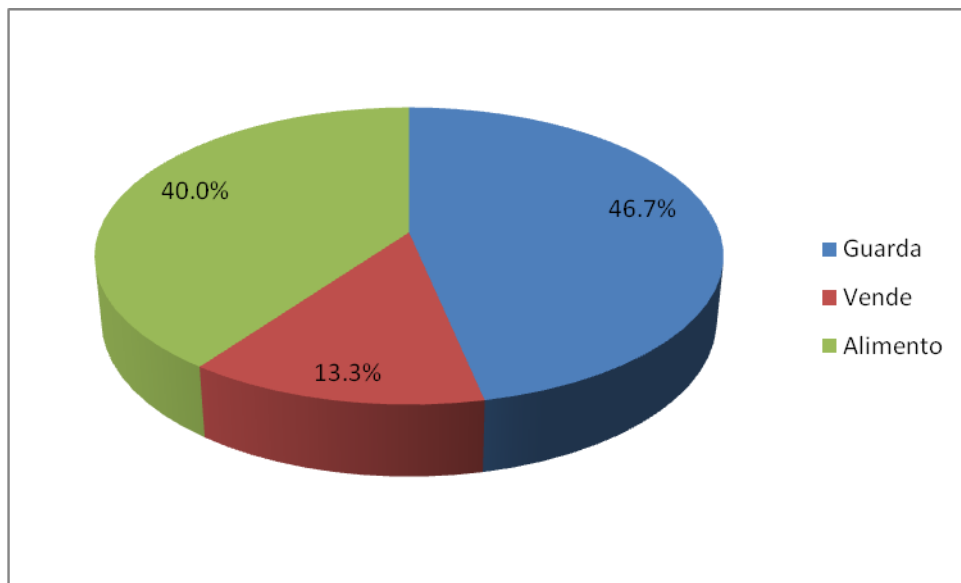


Figura 22: Usos que se le da al Maíz Pozolero en el municipio de Erongarícuaro. Cabe señalar que este maíz no se intercambió en este año a diferencia de las otras variedades (excepto el Negro). A este maíz se destina al auto-consumo (40%), almacena para la próxima siembra (46.7%) y venta (13.3%).

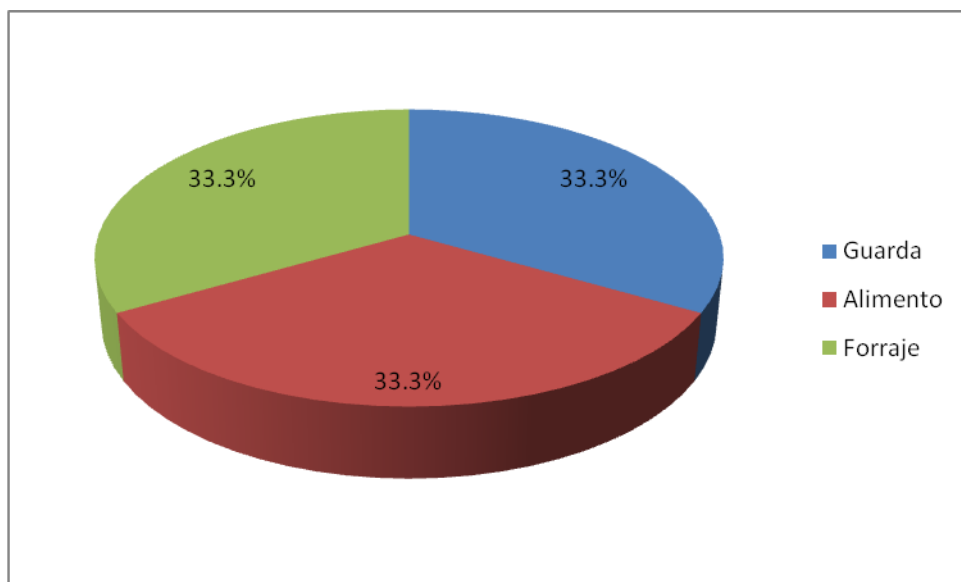


Figura 23: La gráfica muestra los usos que se le dan al Maíz Negro en el municipio de Erongarícuaro. Al igual que el maíz Pozolero, el maíz Negro no es intercambiado, sólo vendido. De hecho se vende, se guarda y se utiliza para el consumo en la misma cantidad (33.3%).

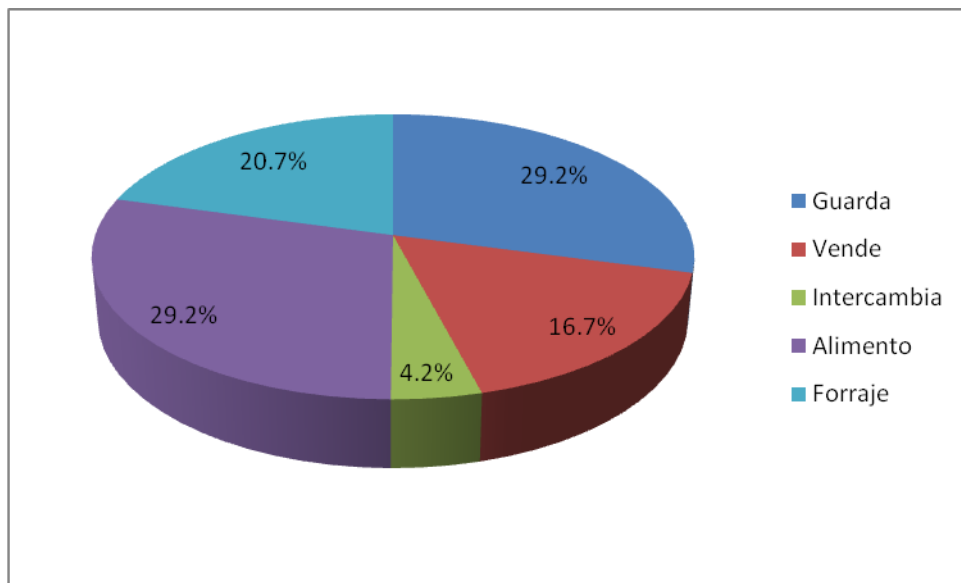


Figura 24: Estos son los usos que se les da al maíz Pinto en el Municipio. El maíz Pinto, no es más que un híbrido resultante de la cruce entre cualquier variedad de maíz sembrada en el Municipio. A este maíz se le vende un 16.7%, se intercambia un 4.2%, se auto-consume un 29.2%, se da como forraje un 20.7% y se guarda un 29.2%.

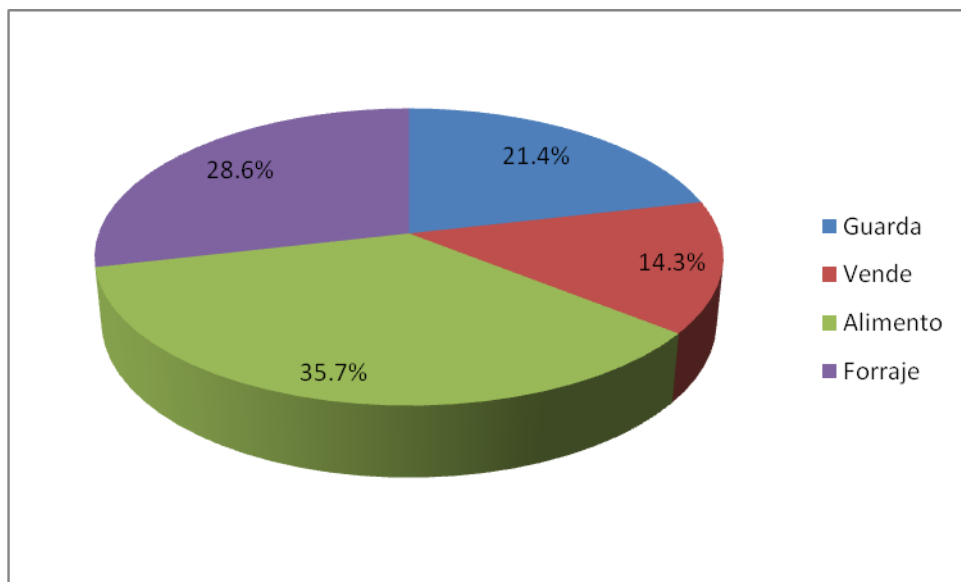


Figura 25: En la gráfica se presentan los usos del maíz Híbrido que se les da en el municipio de Erongarícuaro. El 35.7% es dado como alimento, el 28.6% como forraje, el 21.4% fue guardado y solo el 14.3% fue vendido.

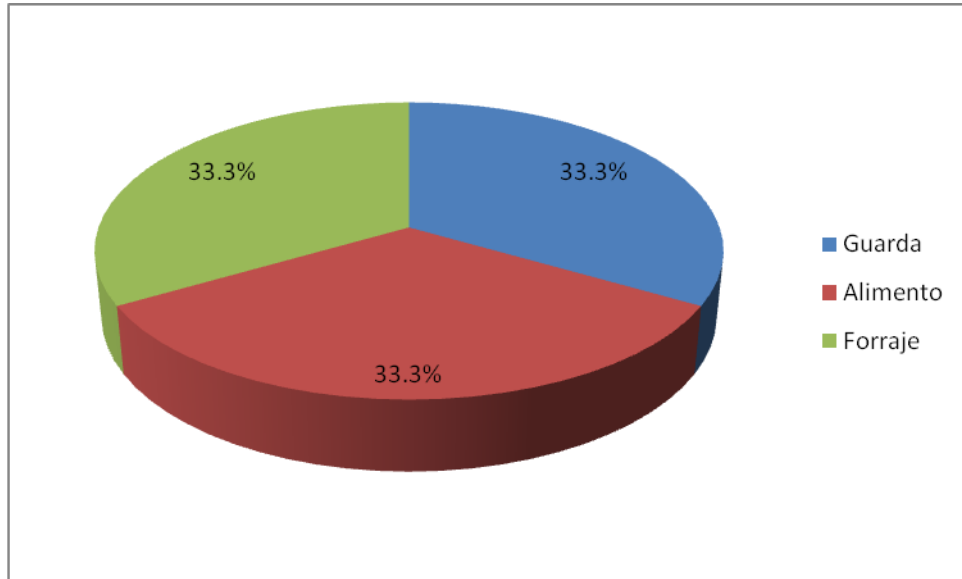


Figura 26: Usos que se le da al Maíz de EUA en el municipio de Erongarícuaro. Cabe destacar que sólo un agricultor sembró este tipo de maíz en todo el Municipio. Dicho maíz fue traído de Carolina del Norte. El único agricultor que lo sembró, destina la misma cantidad (33.3%) a auto-consumo, forraje y almacenamiento para la siguiente siembra.

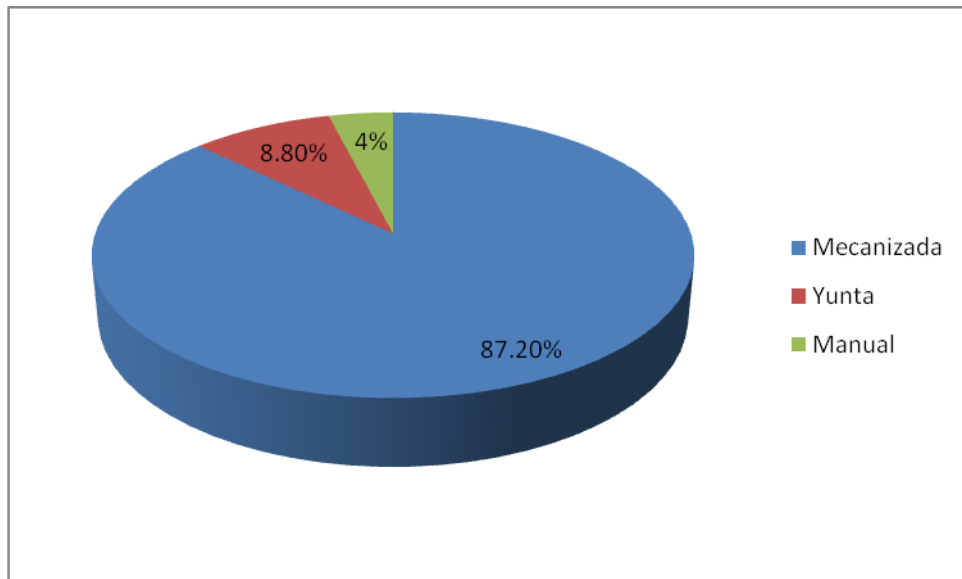


Figura 27: El sistema de labranza que se emplea en el municipio de Erongarícuaro corresponde al representado en la gráfica. Claramente se puede observar que la labranza manual (8.8%) y con yunta (4%), ha sido desplazada por el sistema mecanizado (87.2%).

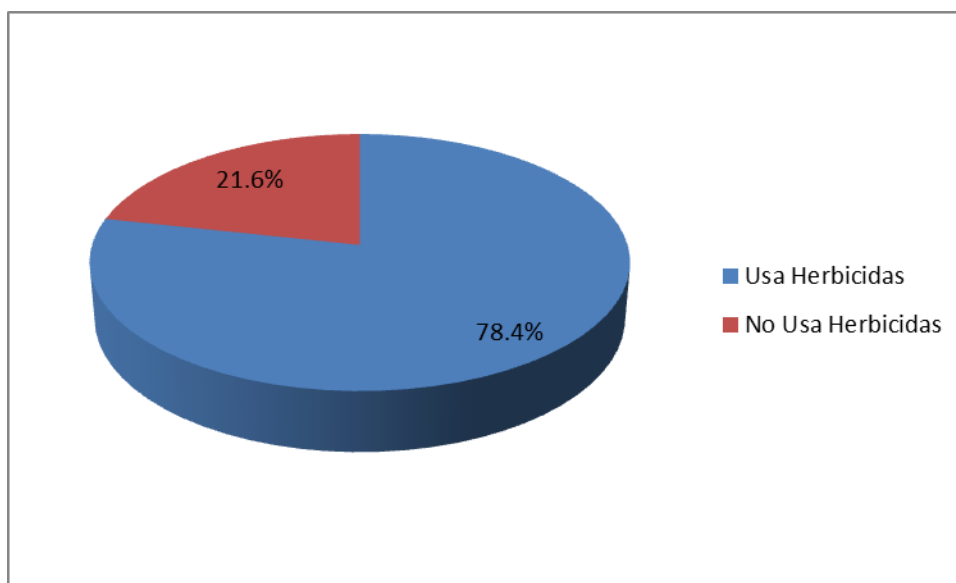


Figura 28: La presente gráfica muestra que la gran mayoría de los agricultores (78.4%) utiliza herbicidas, mientras que sólo el 21.6% no utilizan los herbicidas.

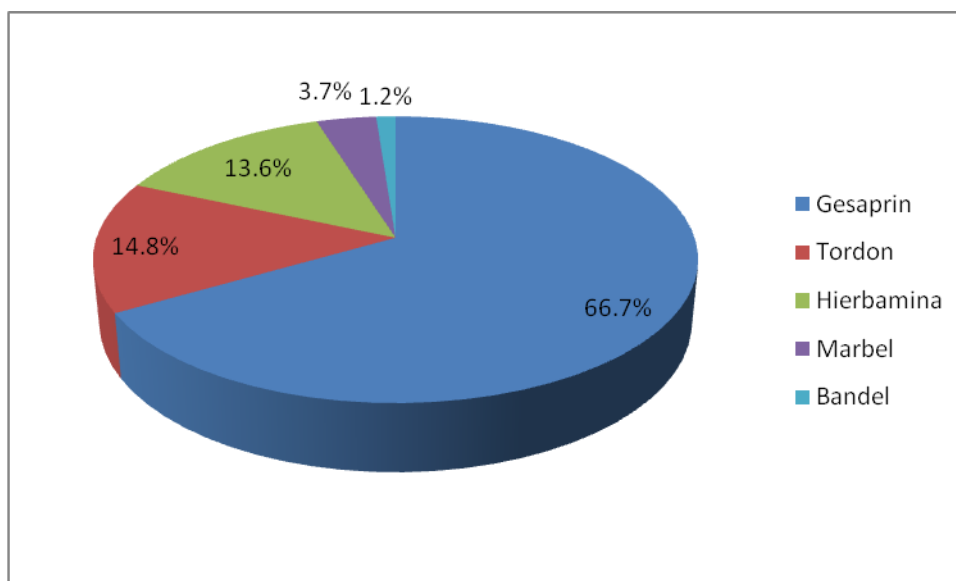


Figura 29: Estos son los principales herbicidas utilizados en el Municipio por el 78.4% de los agricultores encuestados. De ellos, el herbicida más empleado en el Municipio es el Gesaprin con un 66.7%, seguido por el Tordon con 14.8%, la Hierbamina con 13.6%, el Marbel con 3.7% y el Bandel con solo 1.2%.

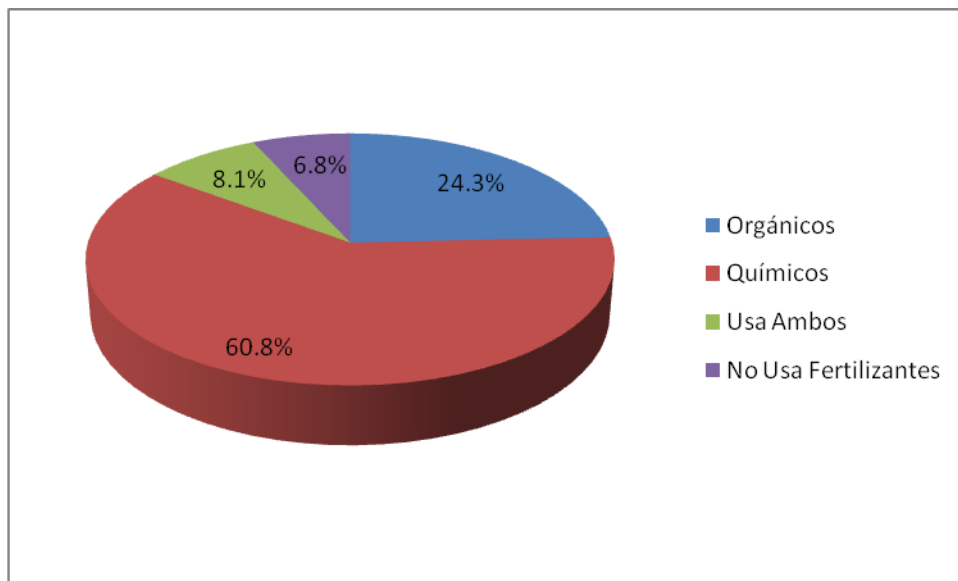


Figura 30: En esta gráfica se muestra tanto el uso como el tipo de fertilizantes que se emplean en el Municipio de Erongarícuaro. Se observa que el 75.7% de los agricultores emplea fertilizantes elaborados industrialmente y en menor medida, utilizan fertilizantes orgánicos (24.3%).

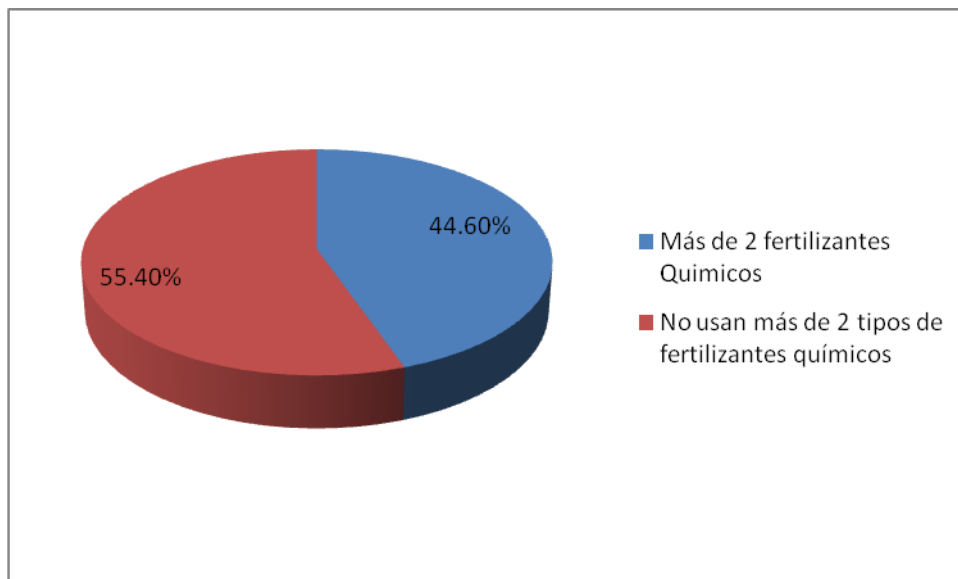


Figura 31: Del 68.9% de los agricultores que ocupan fertilizantes químicos, el 44.6% de ellos utilizan más de un tipo de fertilizante químico en sus parcelas.



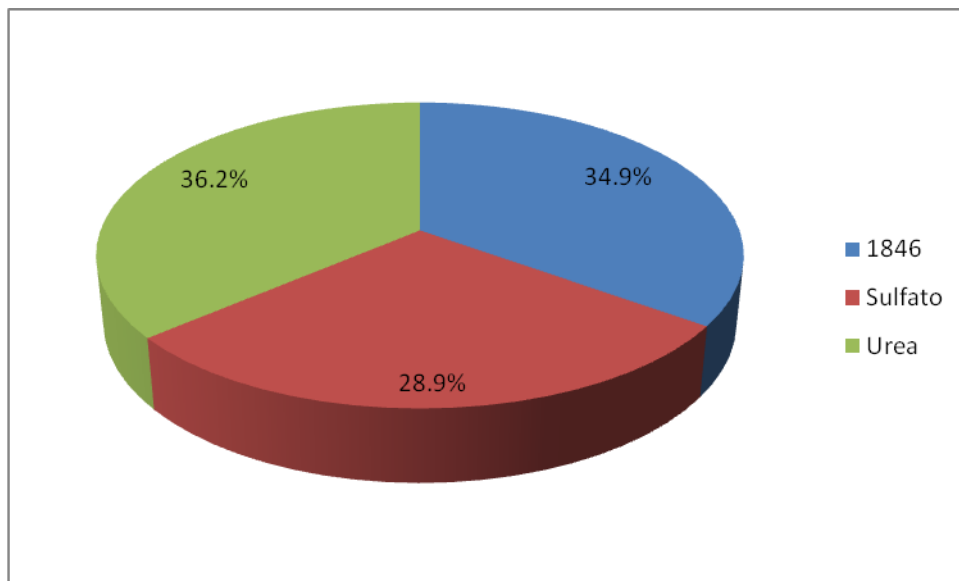


Figura 32: Estos son los porcentajes de los tipos de fertilizantes químicos utilizados en el municipio de Erongarícuaro. El más usado es la Urea con el 36.2%, seguido por el fertilizante 1846 con 34.9% y el sulfato con 28.9%, siendo el menos utilizado.

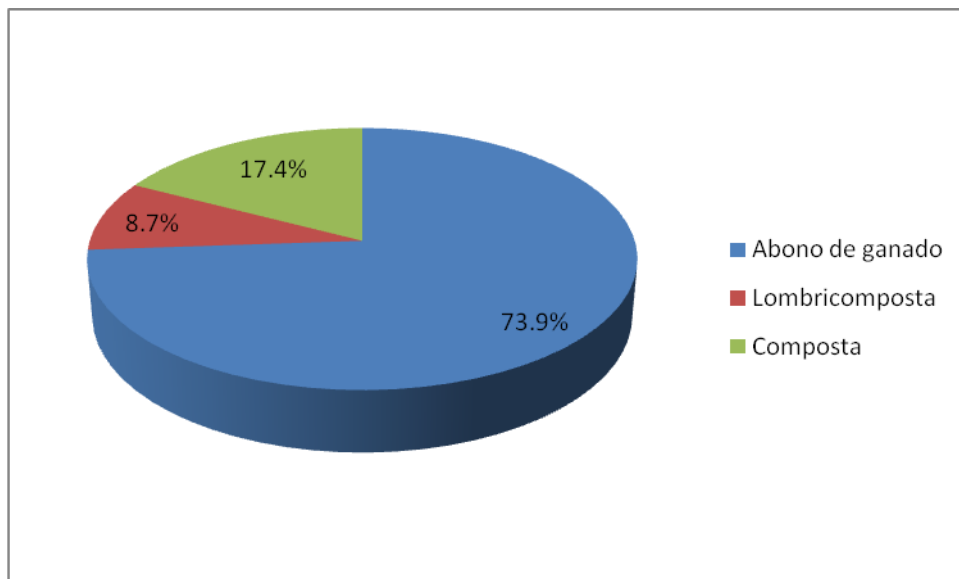


Figura 33: Este es el porcentaje de los tipos de fertilizantes orgánicos utilizados en el municipio de Erongarícuaro por el 32.4% de los agricultores encuestados. La mayoría emplea el abono de su ganado 73.9%, principalmente el de ganado bovino; el 17.4% elabora composta para sus cultivos de maíz y solo el 8.7% emplea una técnica difundida por la SAGARPA a la que se le donomina lombricomposta.

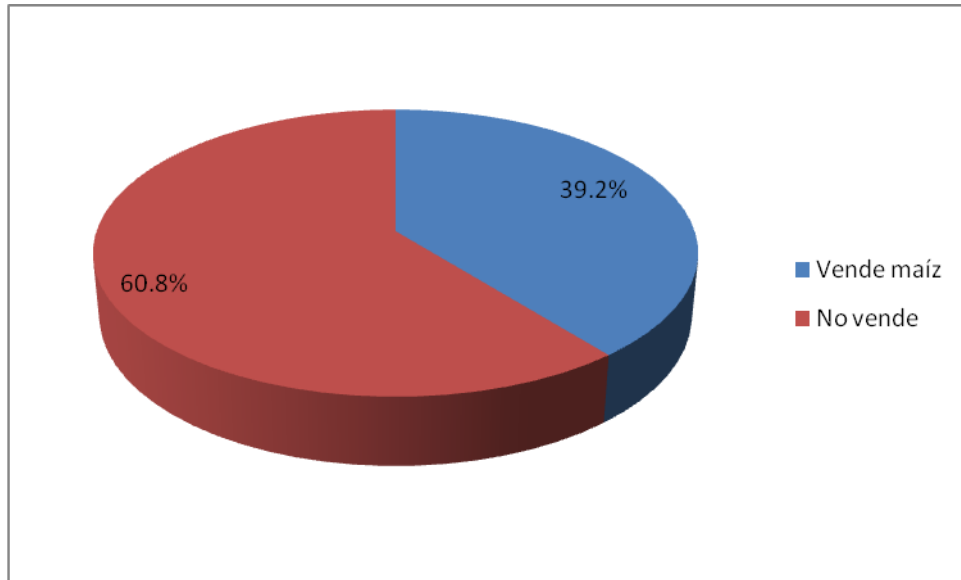


Figura 34: En total, el porcentaje de productores que venden maíz en el Municipio es de 39.2%, con respecto a los que no venden maíz, que corresponde al 60.8%. Esto es debido, según ellos, a que no se saca ninguna ganancia de la inversión de su siembra.

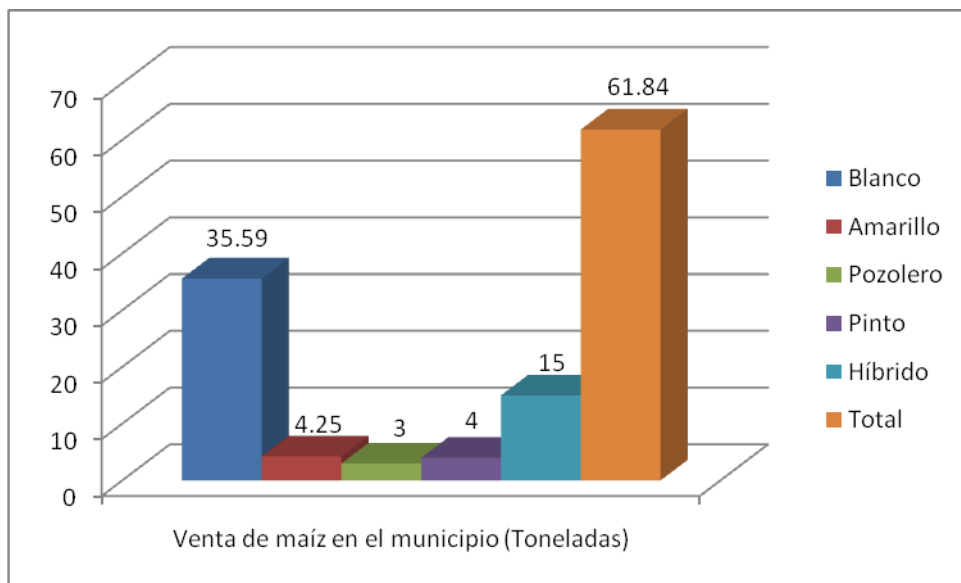


Figura 35: Toneladas vendidas de maíz por variedad en el municipio de Erongarícuaro, Michoacán. El maíz más vendido es el Blanco (35.59 ton), seguido del maíz híbrido (15 ton), el maíz Amarillo (4.25 ton), el maíz pinto (4 ton) y por último el maíz Pozolero (3 ton). El total de maíz vendido fue de 61.84 ton.

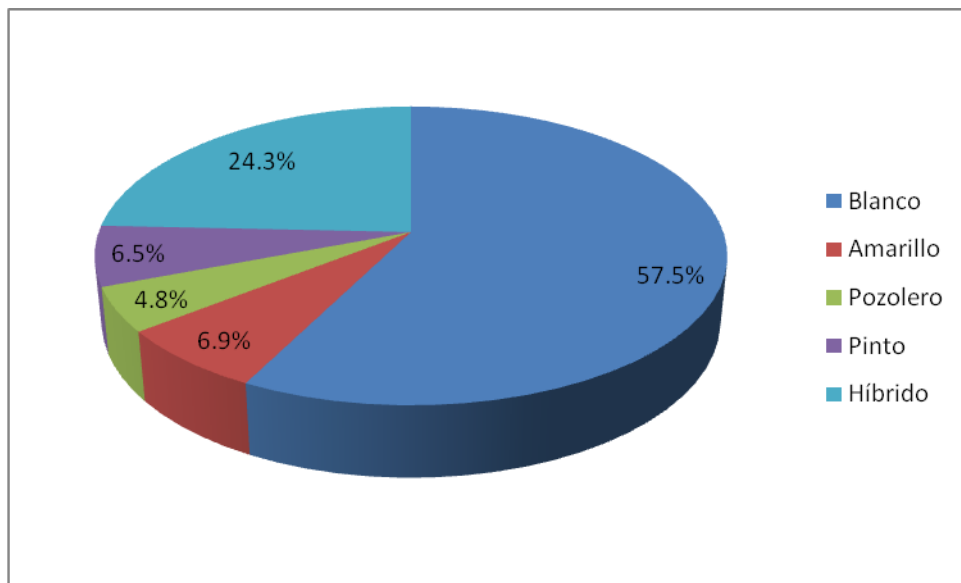


Figura 36: Con respecto a las variedades vendidas de maíz en el Municipio; el maíz Blanco se vende 57.5%, el Híbrido un 24.3%, el Amarillo un 6.9%, el pinto un 6.5% y el maíz Pozolero tan solo un 4.8%.

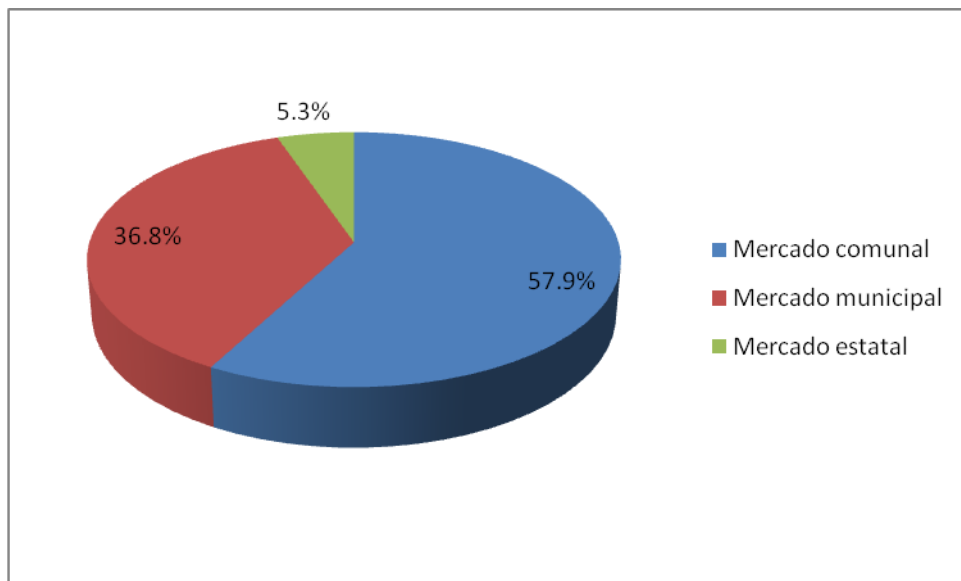


Figura 37: Porcentaje de maíz vendido en diferentes sectores: a nivel de comunidad (57.9%), a nivel de municipio (36.8%) y a nivel de estado (5.3%).

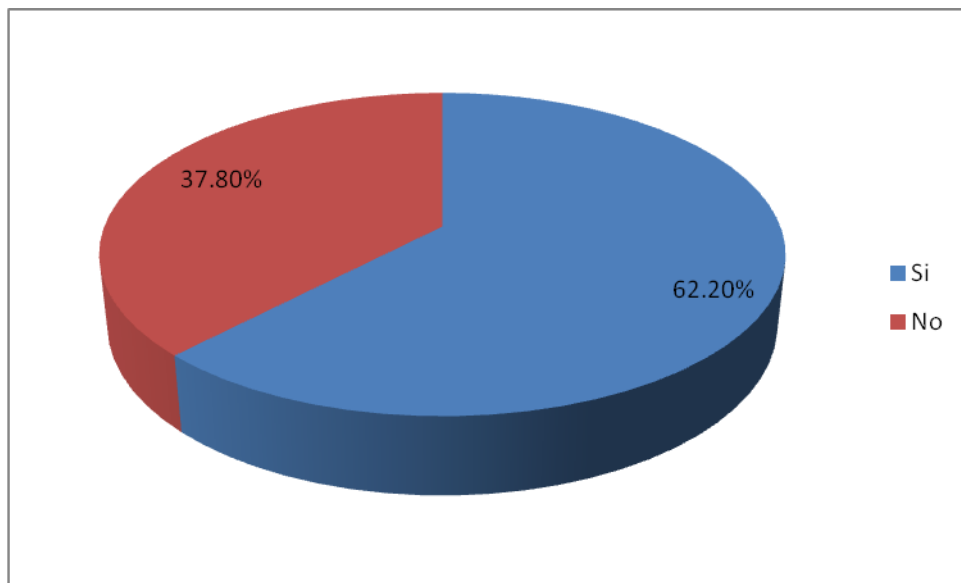


Figura 38: Porcentaje de productores de maíz que pertenecen a algún programa de apoyo para el campo, otorgado por el gobierno. Como se muestra en la gráfica, el 62.2% de los agricultores encuestados pertenecen a algún programa de apoyo al campo, mientras que el 37.8% no lo están.

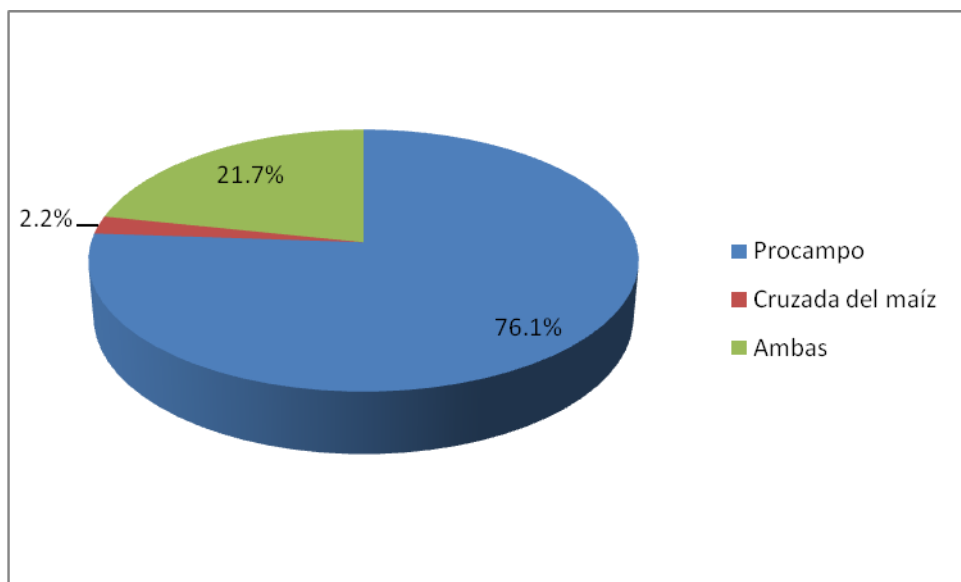


Figura 39: Porcentaje sobre los tipos de apoyo que reciben los productores de maíz pertenecientes a algún programa del gobierno en apoyo al campo (62.2%). La gran mayoría de los agricultores son apoyados por Procampo; el 2.2% son apoyados con un programa de apoyo al campo estatal, denominado cruzada del maíz; y el 21.7% de ellos son apoyados con ambos programas de apoyo al campo.

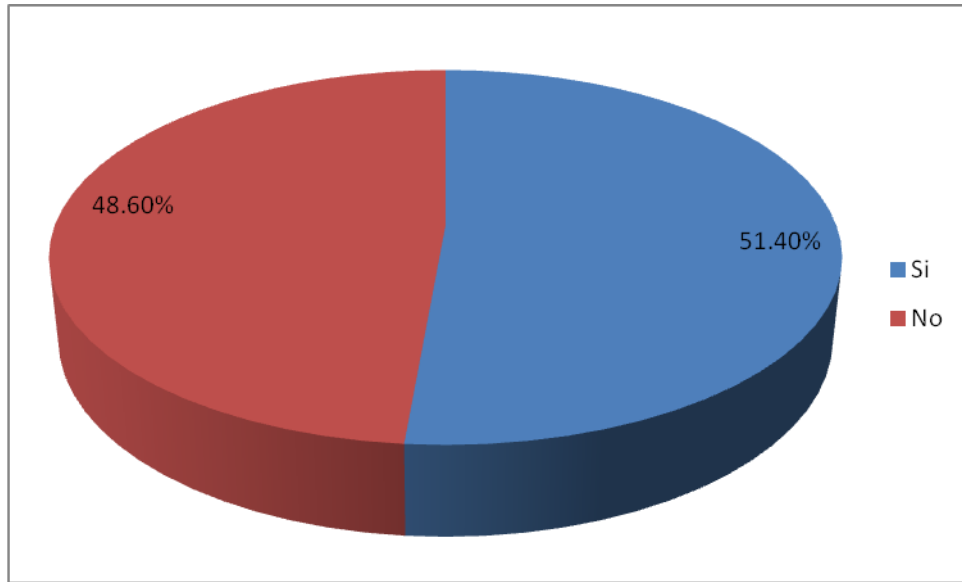


Figura 40: De los productores encuestados, el 51.4% de ellos tienen familiares que se han ido a vivir a los Estados Unidos de América, sólo el 48.6% no tienen. Esto es un factor importante por el cuál el abandono del campo y la suspensión de la siembra del maíz ha aumentado en los últimos años.

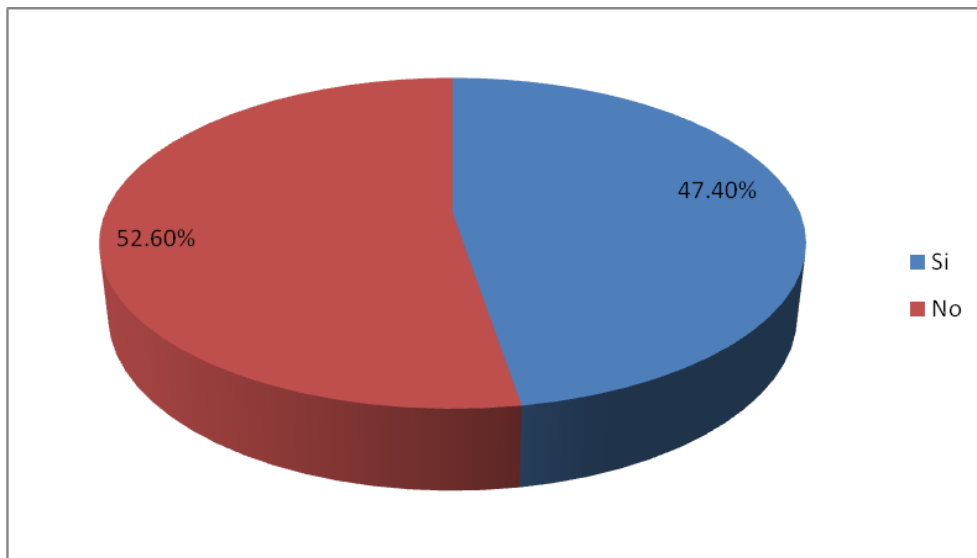


Figura 41: Porcentaje de productores que reciben remesas de sus familiares que viven en EUA. Como se puede observar, solo el 47.4% de ellos recibe remesas de sus parientes.

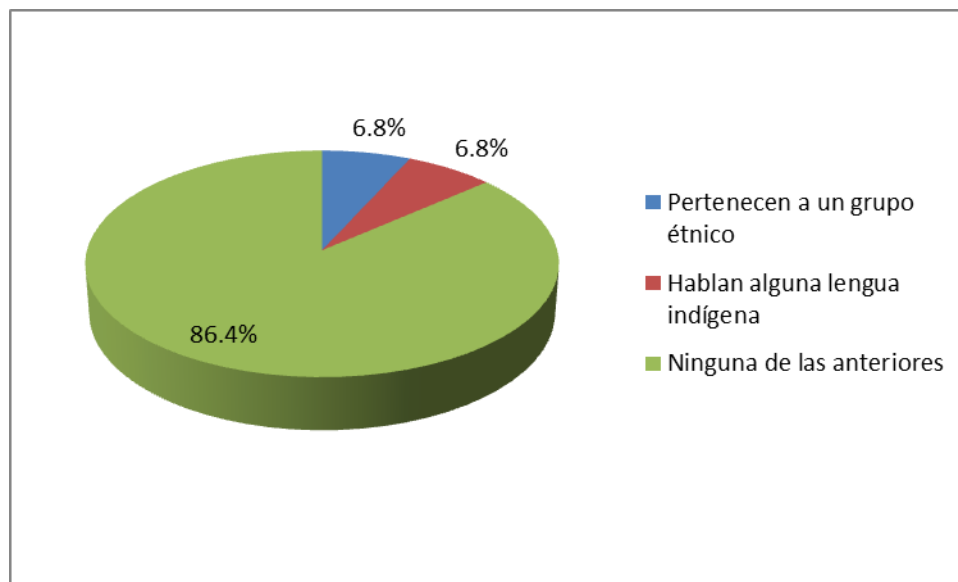


Figura 42: Un dato importante es que el 6.8% de los encuestados pertenecen al grupo étnico de los Purépechas, otro 6.8% hablan la lengua Purépecha sin pertenecer a este grupo étnico. La gran mayoría (86.4%) no pertenecen a ningún grupo étnico ni hablan ninguna lengua indígena.

## ANEXO VII

### Concentraciones de ADN extraído

Muestra	Concentración (ng/μL)	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	A <sub>230nm</sub>	A <sub>260nm</sub>	A <sub>280nm</sub>
358/10	512.6	1.71	1.99	0.257	0.513	0.300
359/10	413.8	1.55	1.86	0.219	0.411	0.264
360/10	427.3	1.67	2.07	0.204	0.425	0.254
361/10	318.8	1.69	2.10	0.150	0.317	0.186
362/10	347.3	1.72	2.06	0.172	0.351	0.206
363/10	267.9	1.75	2.10	0.128	0.268	0.153
364/10	371.3	1.76	2.07	0.182	0.373	0.213
365/10	421.0	1.73	2.11	0.201	0.422	0.001
366/10	351.7	1.75	2.11	0.171	0.356	0.205
367/10	874.1	1.73	2.08	0.426	0.879	0.511
368/10	603.0	1.79	2.11	0.290	0.607	0.341
369/10	124.7	1.72	1.98	0.070	0.132	0.080
370/10	239.4	1.66	1.88	0.131	0.243	0.148
371/10	452.7	1.75	2.02	0.227	0.456	0.262
372/10	297.1	1.70	1.88	0.165	0.304	0.182
373/10	173.5	1.80	2.09	0.092	0.182	0.105
374/10	266.2	1.72	1.82	0.162	0.282	0.171
375/10	181.2	1.69	1.89	0.206	0.256	0.182
376/10	83.7	1.60	1.94	0.153	0.157	0.126
377/10	301.0	1.75	1.77	0.267	0.376	0.247
378/10	154.4	1.79	1.95	0.087	0.162	0.094
379/10	461.1	1.77	2.06	0.248	0.485	0.284
380/10	339.1	1.72	2.06	0.184	0.358	0.216
381/10	121.5	1.81	2.09	0.080	0.143	0.089
382/10	552.6	1.74	2.14	0.276	0.571	0.335
383/10	79.5	1.76	2.09	0.047	0.089	0.054
384/10	63.2	1.75	1.78	0.047	0.075	0.048
385/10	491.2	1.78	2.11	0.260	0.517	0.302
386/10	396.1	1.78	2.17	0.184	0.397	0.224
387/10	613.4	1.76	2.08	0.286	0.604	0.339
388/10	565.9	1.77	2.15	0.265	0.568	0.323
389/10	141.4	1.79	1.90	0.074	0.141	0.079
390/10	441.9	1.78	2.01	0.227	0.449	0.256
391/10	457.1	1.76	2.05	0.223	0.457	0.260
392/10	182.8	1.78	2.11	0.082	0.178	0.098
393/10	130.0	1.81	1.92	0.072	0.134	0.076
394/10	169.8	1.80	2.04	0.088	0.175	0.099
395/10	115.0	1.75	1.60	0.077	0.120	0.071
396/10	562.5	1.72	1.97	0.307	0.584	0.349
397/10	432.1	1.76	2.10	0.214	0.440	0.25

<b>398/10</b>	365.4	1.77	1.94	0.287	0.464	0.305
<b>399/10</b>	273.2	1.76	1.75	0.302	0.419	0.301
<b>400/10</b>	435.1	1.81	2.19	0.209	0.446	0.251
<b>401/10</b>	187.4	1.72	1.81	0.115	0.199	0.211
<b>402/10</b>	150.5	1.72	1.52	0.111	0.163	0.100
<b>403/10</b>	152.3	1.75	1.85	0.081	0.151	0.086
<b>404/10</b>	266.7	1.76	1.59	0.157	0.257	0.142
<b>405/10</b>	384.2	1.77	2.16	0.164	0.370	0.202
<b>406/10</b>	548.4	1.71	2.16	0.245	0.539	0.311

Cuadro 14: Se muestran los resultados de las lecturas del biofotómetro para cada una de las muestras de trabajo. Debido a que las proteínas absorben a 280nm, se empleó el cociente  $A_{260}/A_{280}$  para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. El cociente del ADN puro es de aproximadamente 1.8. Si la muestra también contiene proteínas, el cociente  $A_{260}/A_{280}$  será considerablemente superior a dicho valor y no podrá determinarse con exactitud la cantidad de ácidos nucleicos.

La absorción a 230nm significa que la muestra está contaminada con hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias empleadas en la extracción del ADN. El cociente  $A_{260}/A_{230}$  de las muestras puras está dentro del rango 2.2-1.9 aproximadamente.



## ANEXO VIII

### Imágenes obtenidas de la extracción de ADN y amplificaciones del mismo por PCR de punto final y PCR tiempo real

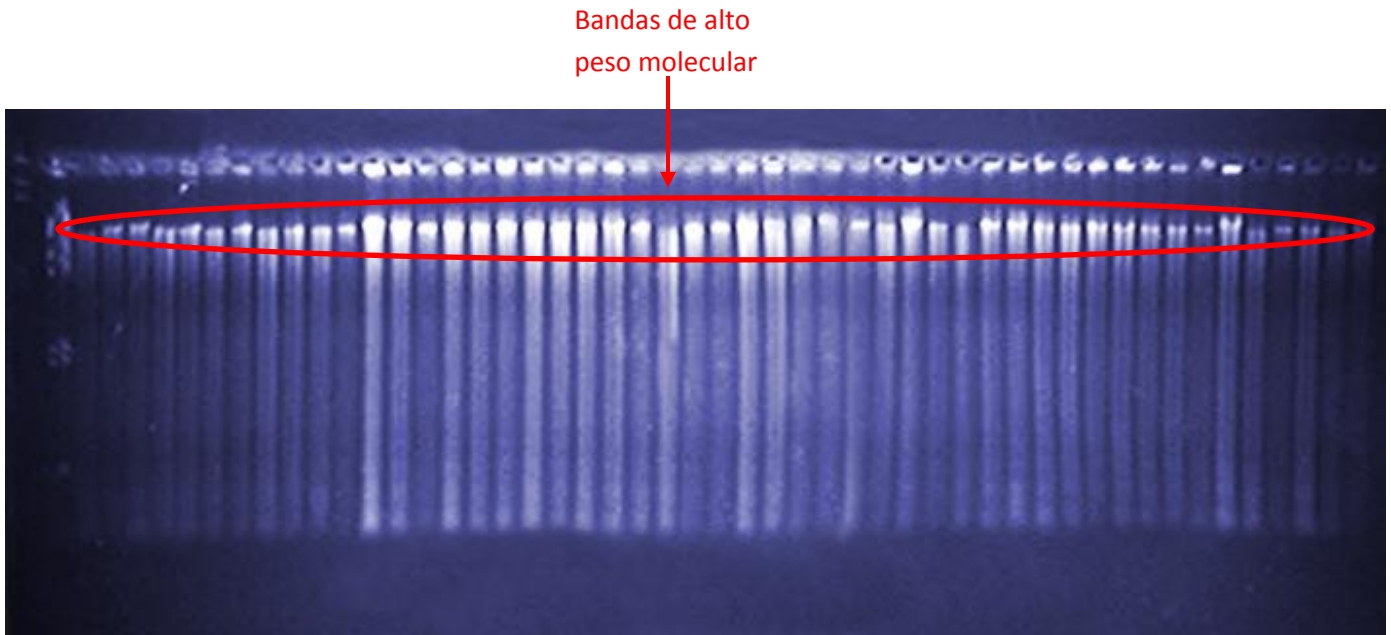


Figura 43: Gel de 2% de Agarosa utilizado para revisar la integridad del gADN de integridad, mostrando los resultados de la electroforesis del ADN extraído de las muestras de maíz.

Haber corrido las muestras de ADN en un gel de Agarosa tuvo la finalidad de determinar si el ADN extraído se encontraba o no degradado o fragmentado. Los resultados positivos que se esperan, consisten en una sola banda de alto peso molecular para cada muestra.

En la figura, se observa una sola banda de alto peso molecular intensa para cada una de las muestras, por lo que se concluye que el ADN se encuentra íntegro, sin estar degradado o fragmentado.

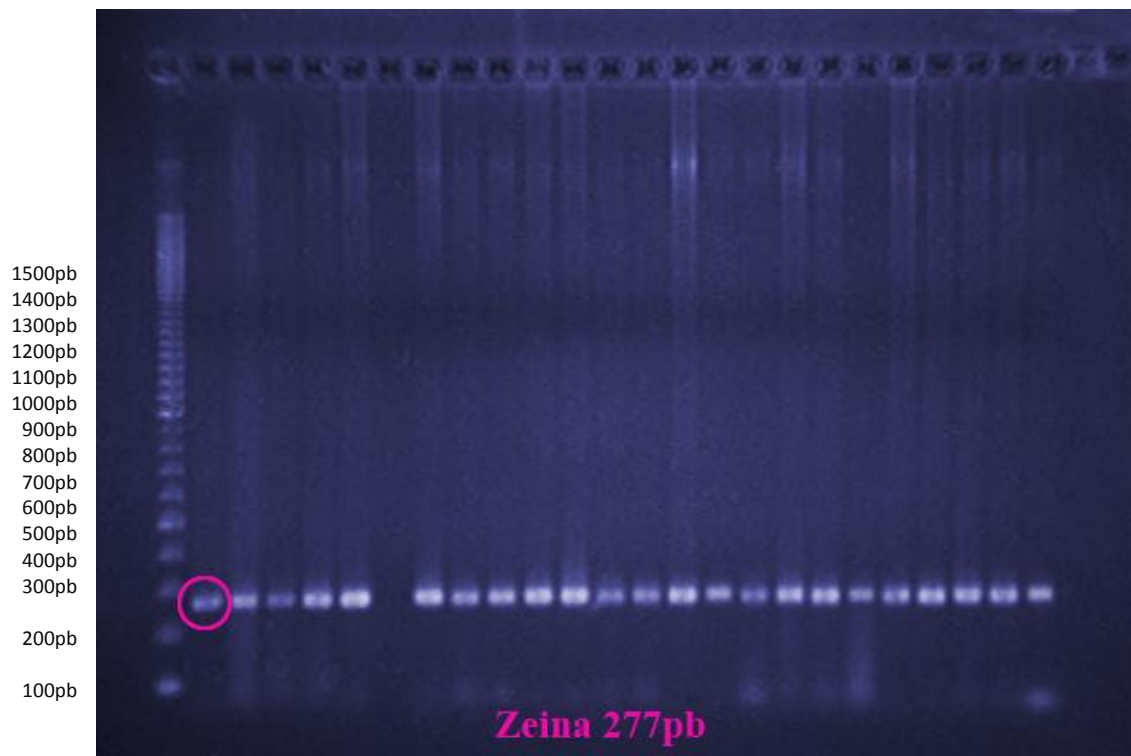


Figura 44: Electroforesis en gel de Agarosa de la reacción de amplificación del gen de Zeina por el método de PCR. Este gel tiene la finalidad determinar si el ADN extraído amplificaba correctamente, es decir, que no hubiera agentes inhibidores que obstruyeran la reacción de la PCR. También la de comprobar que el ADN analizado sea efectivamente de maíz, mediante el gen endógeno de Zeina. El control positivo para este gen endógeno amplifica una banda de 277pb como se muestra en el círculo. En la figura se observa que las muestras de trabajo 358/10-379/10 presentan la misma banda que la del control positivo a Zeina de 277pb. Por lo que se concluye que el ADN analizado efectivamente es de maíz y se evidencia la correcta amplificación de ADN de las muestras por medio de la PCR de punto final.

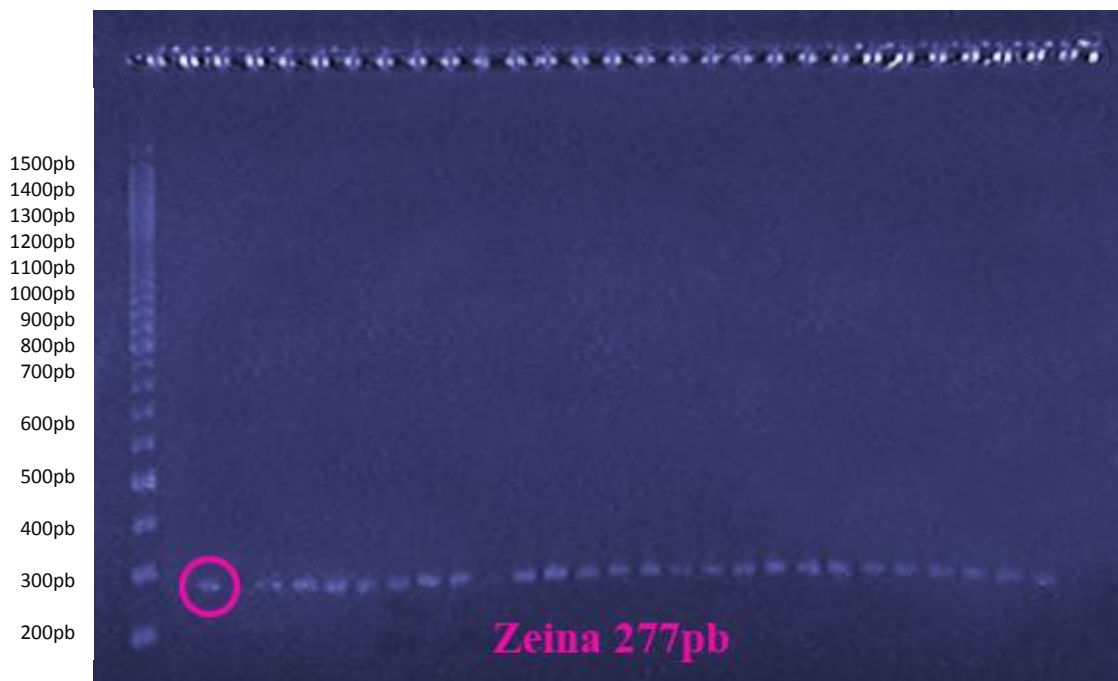


Figura 45: Gel de electroforesis de la PCR Zeina. La Zeina es un gen endógeno que se encuentra en el maíz y el producto de este gen es una proteína que forma su semilla. El objetivo de la PCR y el gel de Zeina, fue determinar si el ADN extraído amplificaba correctamente, es decir, que no hubiera agentes inhibidores que obstruyeran la reacción de la PCR. También, bajo otras circunstancias, la amplificación del gen endógeno Zeina, sirve para corroborar el taxón que se está analizando. Los resultados positivos al gen endógeno Zeina, presentan una banda de 277pb.

Como se observa en la figura, las muestras 380/10-403/10, presentan bandas bien definidas de 277pb, idénticas a la banda del control positivo. Por tanto, se concluye que no existen agentes inhibidores durante la reacción de la PCR. La muestra 387/10 no mostró ninguna banda de ADN; por lo que tendrá que volverse a someter a la PCR Zeina en otro ensayo con otras muestras.

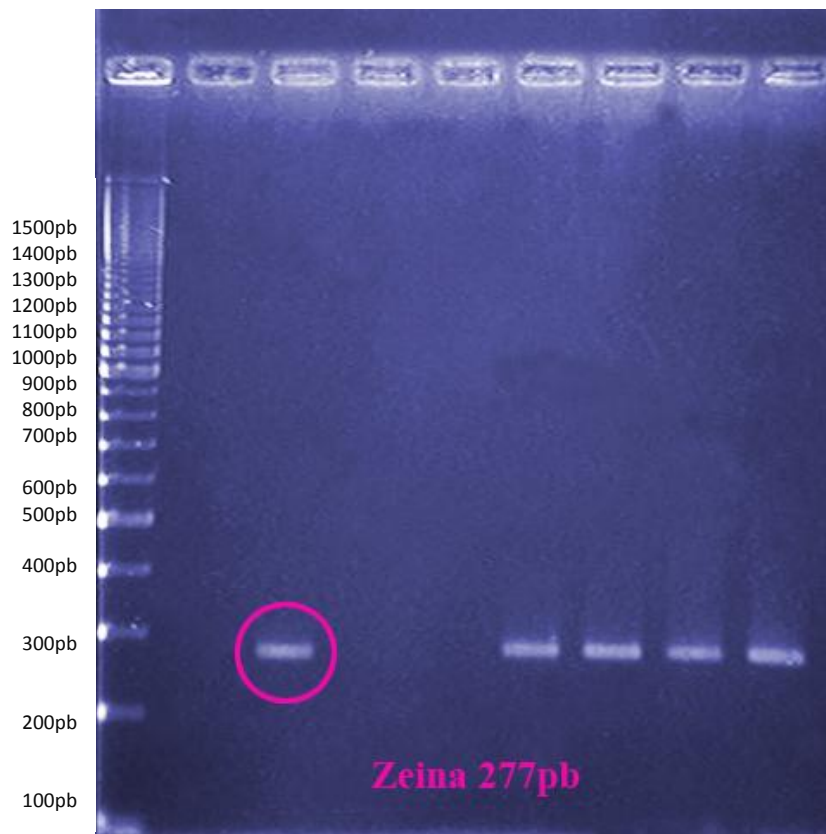


Figura 46: Gel de electroforesis de la PCR Zeina. Los resultados positivos al gen endógeno Zeina, presentan una banda de 277pb. Como se observa en este gel, las muestras 404/10-406/10 y 387/10, presentan bandas bien definidas de 277pb idénticas a la banda del control positivo. De esta forma, se concluye que el nivel de desempeño de la PCR es óptimo y no existen agentes inhibidores durante la reacción de la PCR.

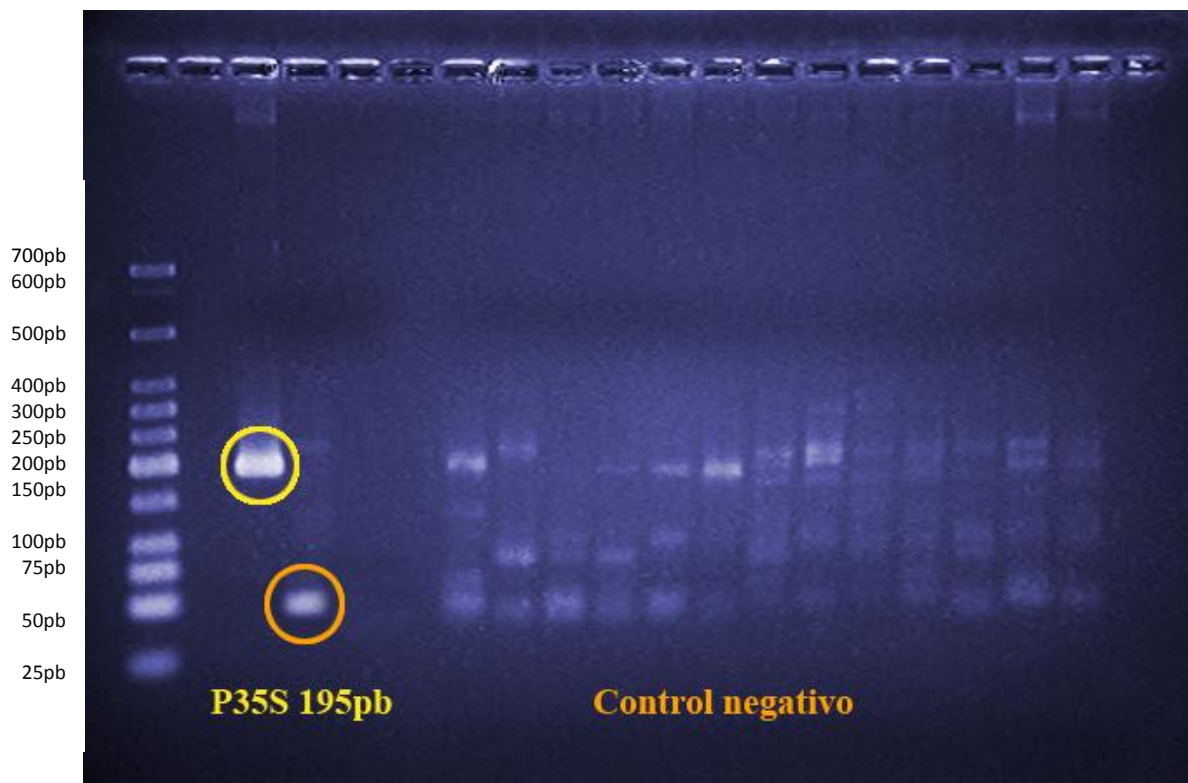


Figura 47: Gel de agarosa, mostrando los resultados de la PCR de punto final para el promotor 35S del Virus del mosaico de la coliflor de las muestras 358/10-370/10. La secuencia esperada para las muestras positivas es una banda de 195pb, que se ubicada entre las bandas de 150 y 200pb del marcador de peso molecular. El control negativo y la muestra blanco no muestran la banda del amplicón esperado, por tanto, no hay indicios de contaminación de los controles por presencia de la secuencia. Sin embargo algunas muestras de ADN de trabajo muestran la banda positiva de 195pb, por lo que las muestras 358, 361, 362, 363, 369 y 370 posiblemente contienen al elemento CaMV 35S en su genoma. Para confirmar estos resultados positivos, fue necesario llevar a cabo un ensayo de confirmación.

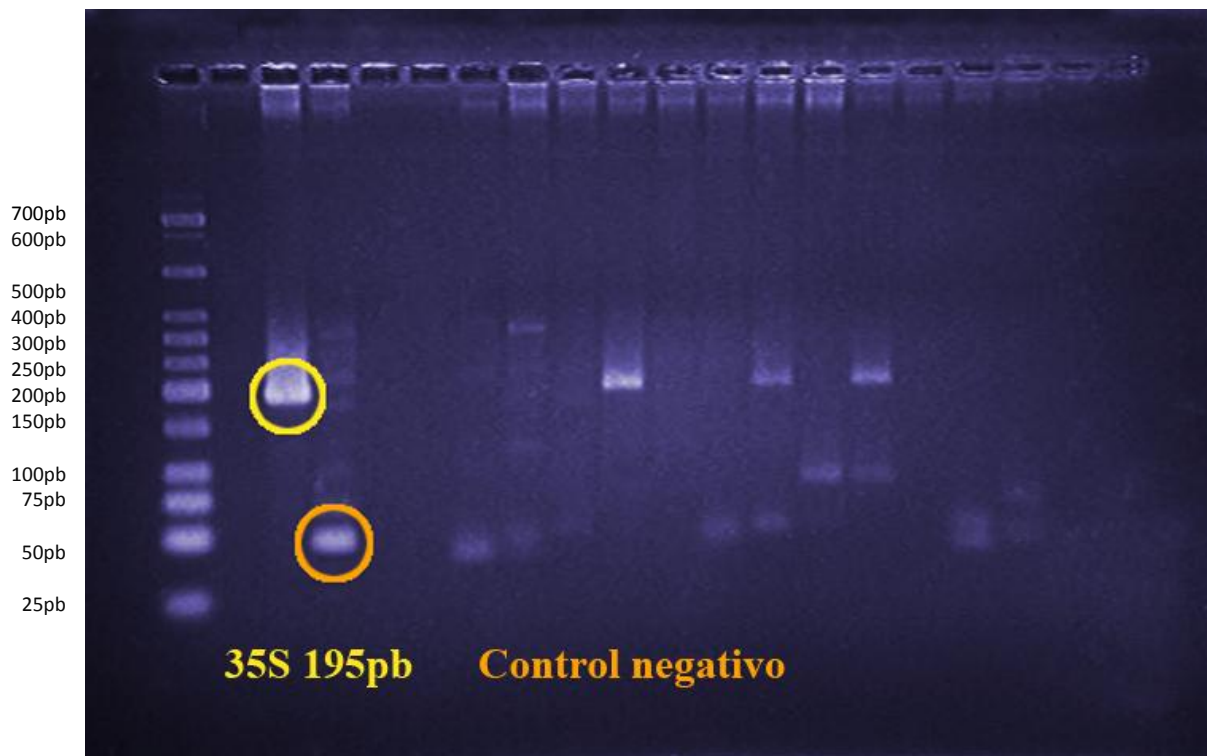


Figura 48: Gel de agarosa, mostrando los resultados de la PCR de punto final para el promotor 35S del Virus del mosaico de la coliflor de las muestras 371/10-382/10. En la figura se observa que las muestras de trabajo 374, 377 y 379, presentan la amplificación de la banda positiva al promotor 35S; a pesar de que el control negativo y el blanco no la presentan. También se puede observar que existen múltiples bandas en los carriles de algunas muestras de trabajo que no corresponden a la banda del control positivo del CaMV 35S. Para las tres muestras que presentan las bandas con la secuencia del promotor 35S, es necesario analizarlas con un ensayo de confirmación, para determinar si realmente son muestras positivas o negativas. Nótese que también existen múltiples bandas en algunos de los carriles de las muestras de trabajo y su origen es desconocido.

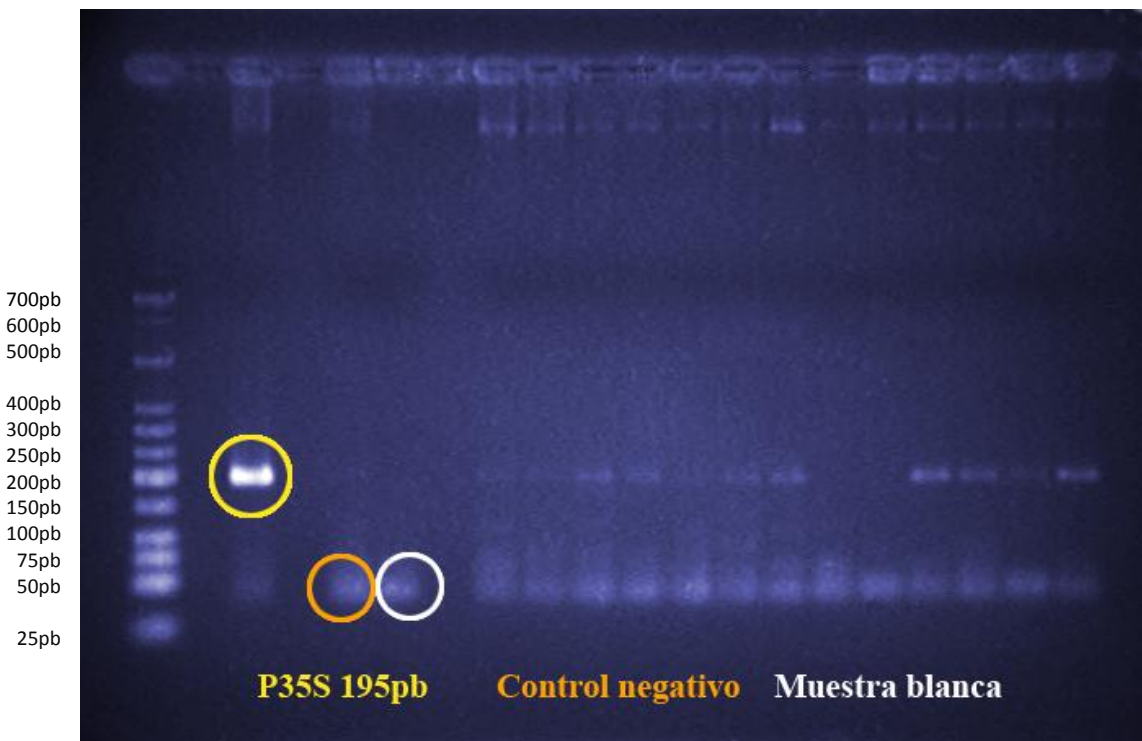


Figura 49: Gel de agarosa, mostrando los resultados de la PCR de punto final para el promotor 35S del Virus del mosaico de la coliflor de las muestras de trabajo 383/10-394/10 y 406/10. La banda positiva del elemento 35S CaMV la presentan las muestras 383, 384, 385, 386, 388, 389, 392, 393, 394 y 406. Dado que el control negativo y el blanco no amplificaron la banda positiva de 195pb, es necesario efectuar un ensayo de confirmación para las muestras, para determinar si realmente son positivas o no. También puede notarse en el gel, que los carriles de algunas muestras se presentan múltiples bandas que no corresponden a la banda del control positivo y se desconoce su origen.

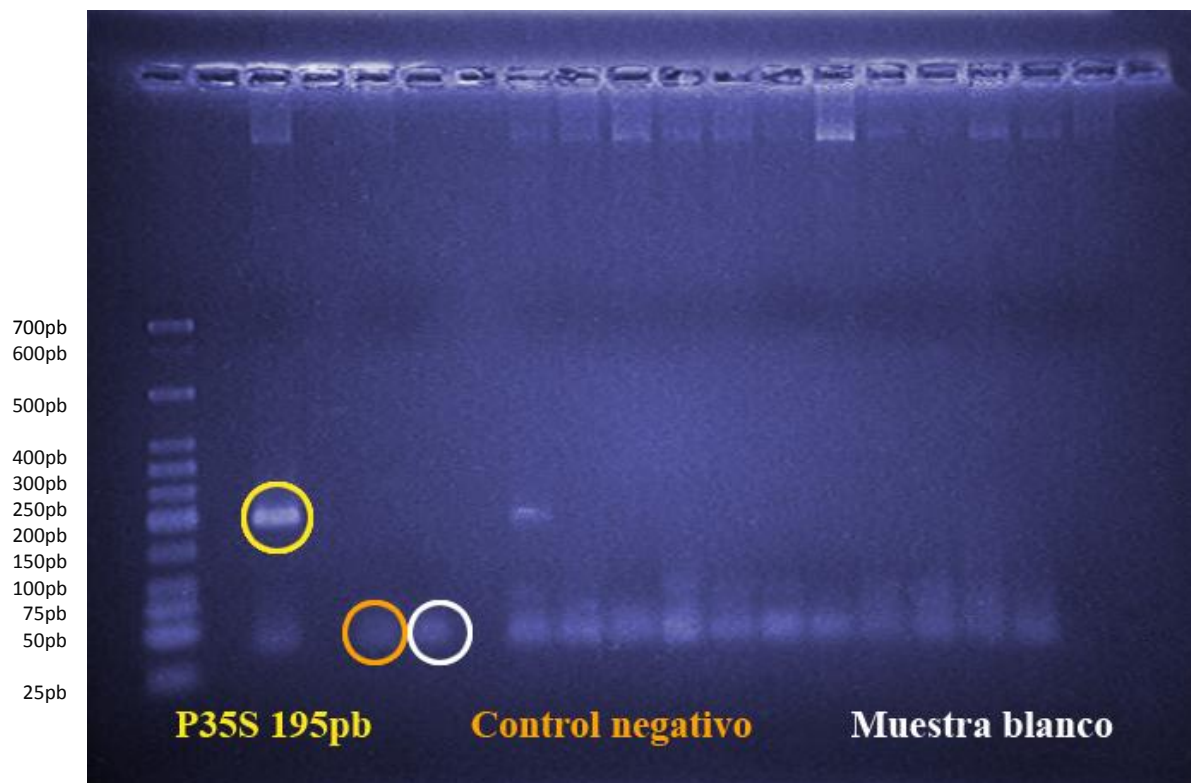


Figura 50: Gel de agarosa, mostrando los resultados de la PCR de punto final para el promotor 35S del Virus del mosaico de la coliflor de las muestras de trabajo 395/10-406/10. En esta figura cabe destacar que la muestra 406/10 no amplificó ninguna banda, por lo que se tuvo que repetir el ensayo de PCR para esta muestra. Para este gel, únicamente la muestra de trabajo 395/10 dio positivo para el promotor 35S CaMV.



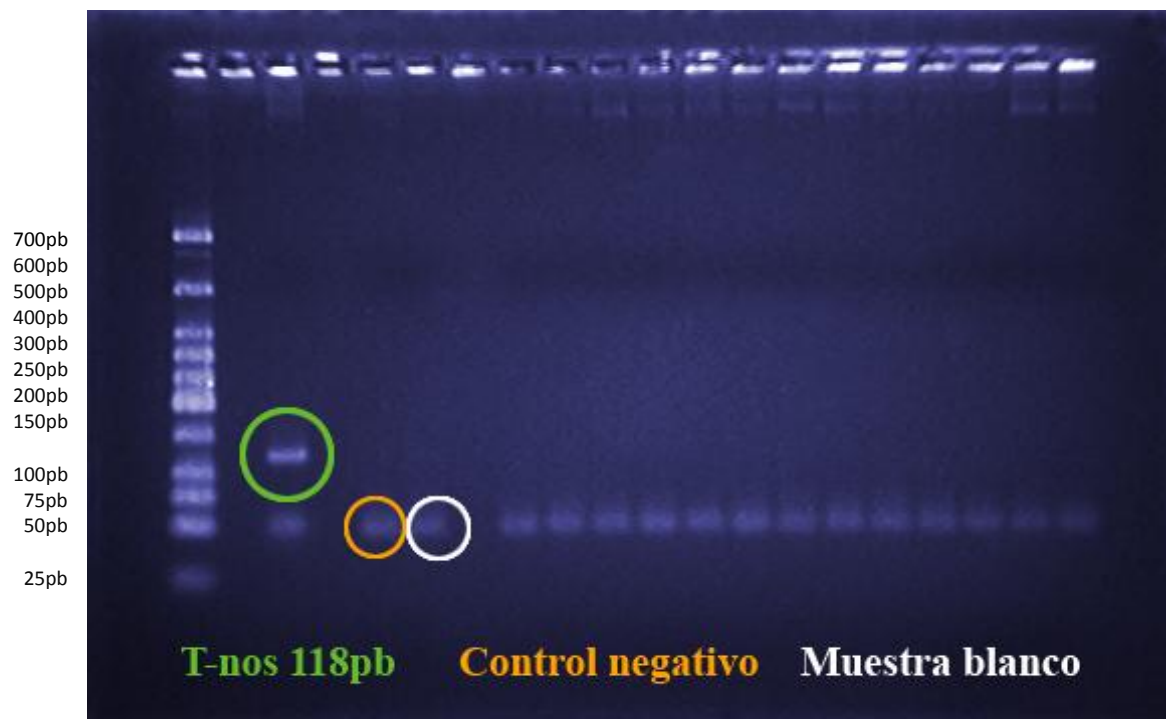


Figura 51: Gel de agarosa, mostrando los resultados de la PCR de punto final para el terminador *nos* de *A. tumefaciens*. La secuencia esperada para las muestras positivas es una banda de 118pb que se encuentra ubicada entre las bandas de 100 y 150pb del marcador de peso molecular. El control negativo y la muestra blanco no muestran la banda del amplicón esperado, por tanto, no hay indicios de presencia de la secuencia y se concluye que las muestras 358/10-370/10 de maíz no contienen el elemento T-nos.

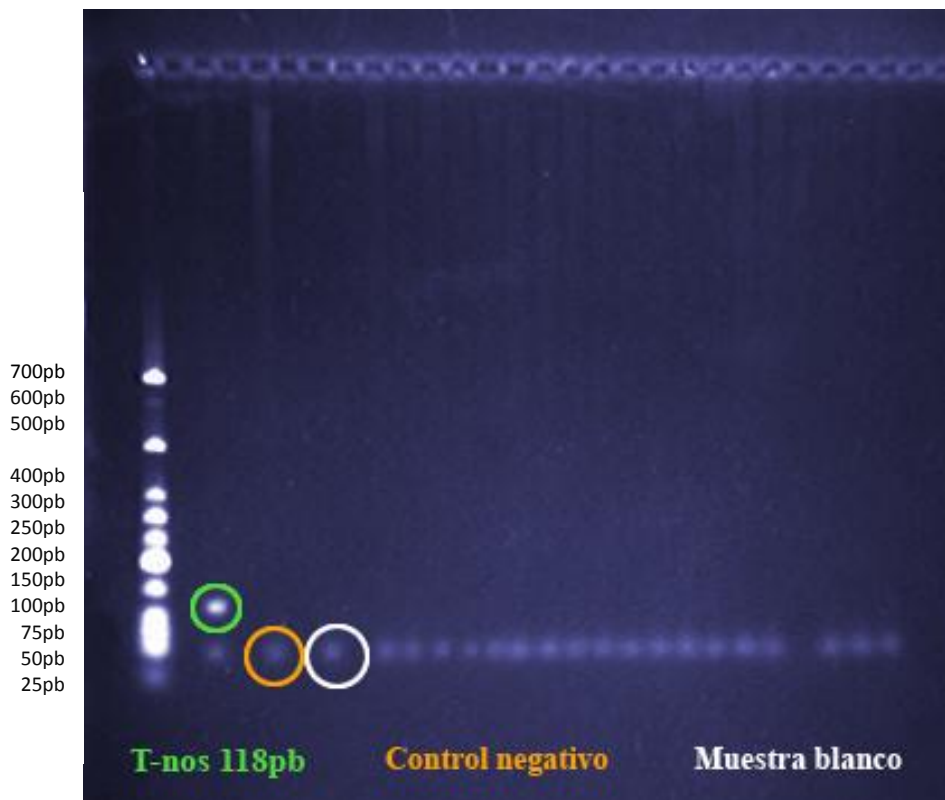


Figura 52: Gel de Agarosa con las muestras 371/10-388/10 de ADN amplificadas por la PCR T-nos. El amplicón esperado para las muestras positivas al elemento T-nos es una banda de 118pb. En la figura puede observarse que tanto el control negativo como el blanco no mostraron amplificación alguna de la secuencia de T-nos, al igual que las muestras de trabajo. Se concluye entonces, que ninguna de estas muestras contiene el terminador *nos* de *A. tumefaciens*.

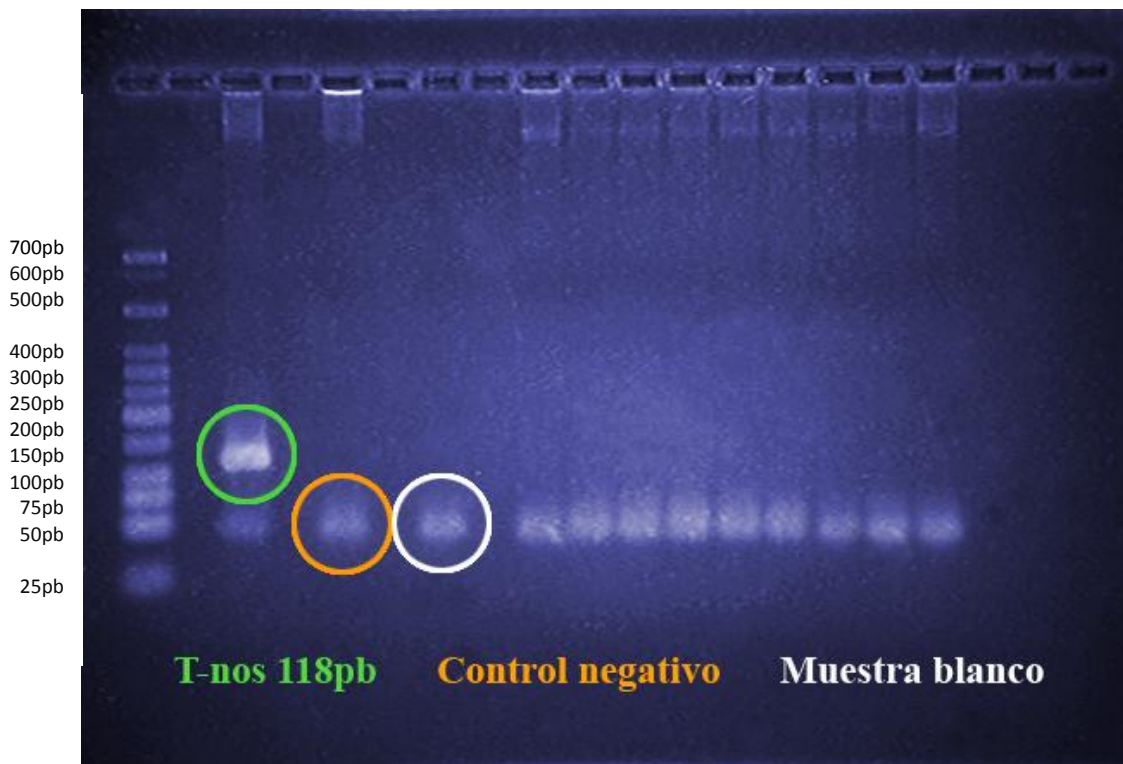


Figura 53: Gel de Agarosa con las muestras 389/10-397/10 de ADN amplificadas por la PCR T-nos. El control positivo muestra una banda de 118pb para el terminador *nos* de *A. tumefaciens*, mientras que para el control negativo y blanco no se presenta dicha banda. De igual forma, las muestras de trabajo no presentan la banda positiva al terminador nos, por lo que se concluye de igual manera, que las muestras de trabajo en este gel no contienen este elemento transgénico.

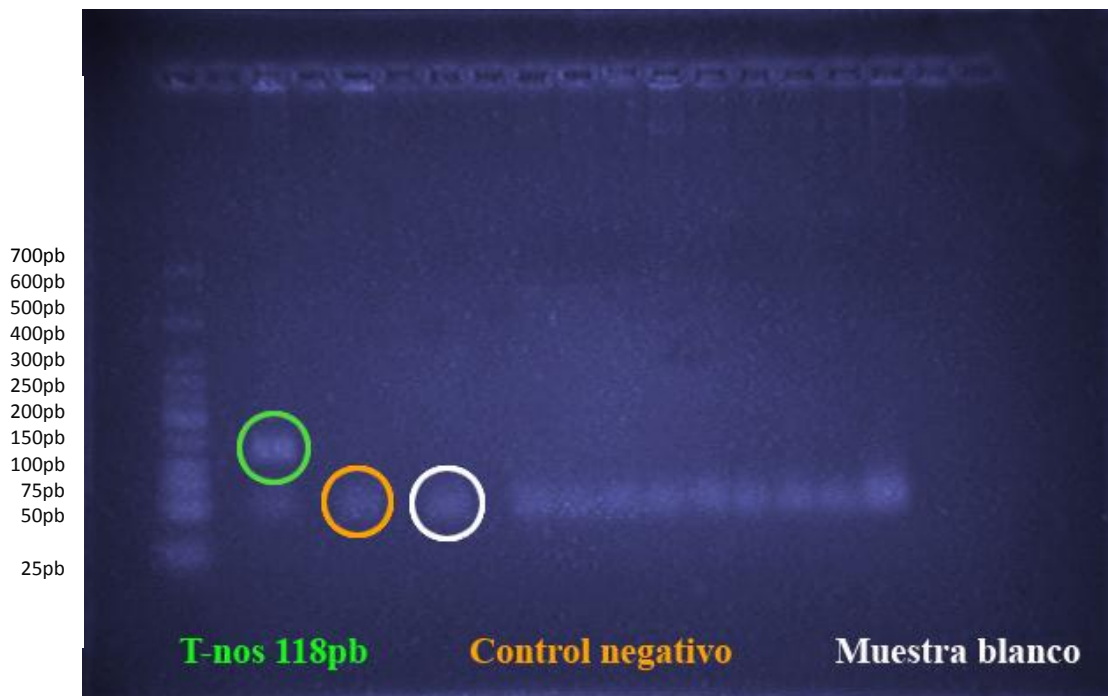


Figura 54: Gel de electroforesis de la PCR de T-nos, con las muestras 397/10-406/10. Como en todas las figuras para el terminador nos de *A. tumefaciens*, únicamente el control positivo muestra la banda positiva de 118pb. De esta forma se concluye que ninguna de las muestras de trabajo contiene al elemento terminador transgénico más común del maíz GM.

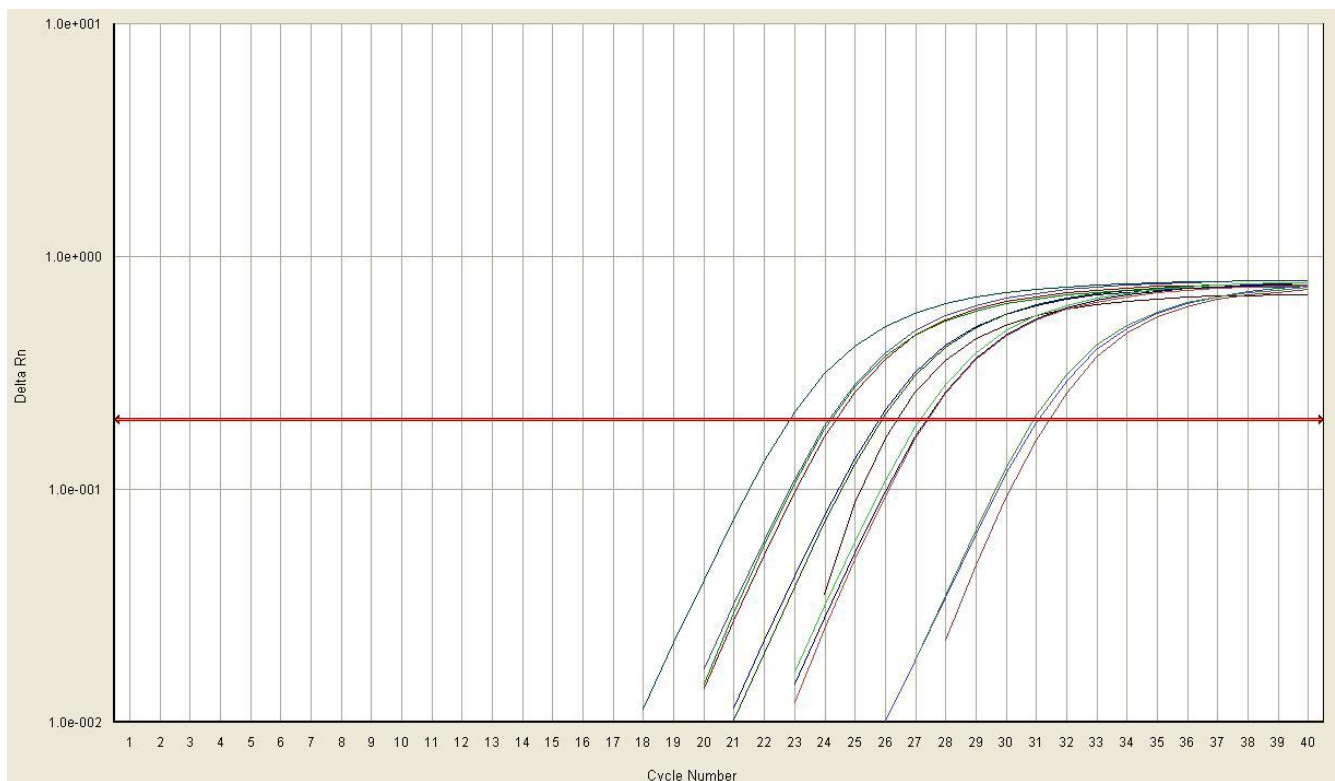


Figura 55: Amplificación de la PCR de tiempo real de las curvas de calibración para el gen endógeno mhmh. La curva de calibración consta de cuatro puntos a diferentes concentraciones: 9.8%, 5%, 1% y 0.1%; las cuales se prepararon mediante diluciones seriales a partir del evento TC1507 [9.8%]. Las curvas de calibración son muestras estándares a concentraciones conocidas con el gen endógeno mhmh, que sirven para determinar si las muestras de trabajo contienen al gen endógeno mhmh y para determinar su concentración. En la figura también se muestran la amplificación para el estándar de verificación y la muestra adicionada. El estándar de verificación que se empleó para este ensayo fue el evento MON810 [5%] y se colocó una sola vez en la placa. La muestra adicionada se preparó con 10µL de la muestra 358/10 + 10µL del evento TC1507 [9.8%], también se colocó una sola vez en la placa. También se agregaron el blanco de método y blanco de reactivos como controles negativos, los cuales solo se agregaron en la placa de PCR-TR una sola vez. El blanco de método, consiste en un tubo sin muestra de ADN pero que se trató en conjunto y de igual manera que las muestras de trabajo durante la extracción. El blanco de reactivos se preparó adicionando los componentes de la mezcla de reacción para la PCR-TR y en lugar de ADN se le adicionó 4µL de agua inyectable. El orden de las muestras estándar es el siguiente: Muestra adicionada, estándar de verificación, punto de la curva a [9.8%], punto de la curva a [5%], punto de la curva a [1%] y punto de la curva a [0.1%].

La muestra adicionada amplificó antes de las curvas de calibración [9.8%], a pesar de tener la misma concentración de estas; la curva de calibración [5%] amplificaron posteriormente, mientras que la muestra adicionada amplificó al mismo tiempo; posteriormente amplificaron las muestras [1%]; por último, amplificaron las curvas a [0.1%]. En contraste, el blanco de método y el blanco de reactivos no amplificaron, lo que indica que no hubo contaminación en la extracción de ADN y los reactivos no estaban contaminados.

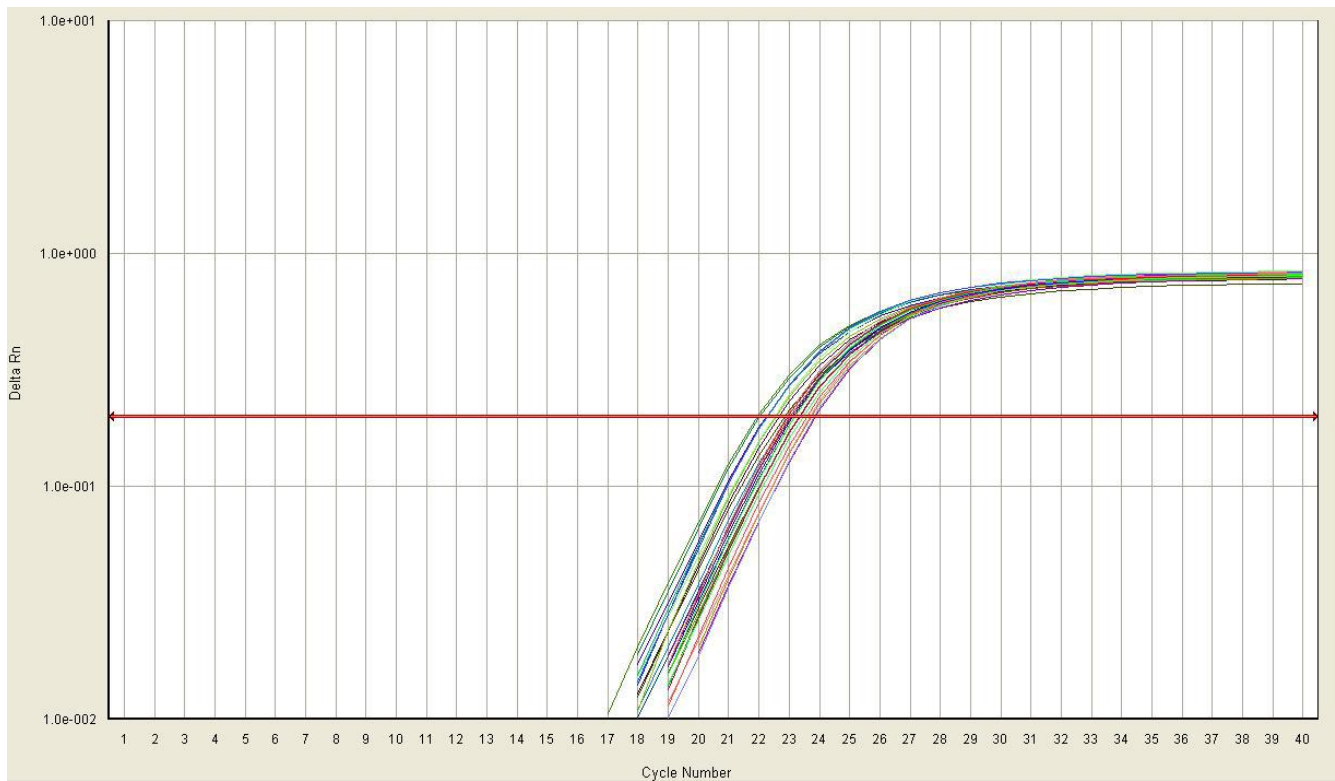


Figura 56: Las muestras de trabajo que se utilizaron en la PCR-TR fueron aquellas que presentaron secuencias positivas de ADN del promotor 35S durante los ensayos de la PCR de punto final. Las muestras que se analizaron en la PCR-TR fueron: 358, 361, 362, 370, 377, 383, 384, 386, 388, 389, 392, 393, 394, 395 y 406. Todas estas muestras se adicionaron por duplicado en la placa de PCR-TR.

En la figura, se comparan las curvas de amplificación entre las muestras estándar [9.8%] y las muestras de trabajo, se observa que las muestras de trabajo poseen una concentración mayor a 9.8% para el gen endógeno mhmG. Esto indica que la PCR-TR amplifica de manera correcta y su nivel de desempeño estaba en óptimas condiciones.

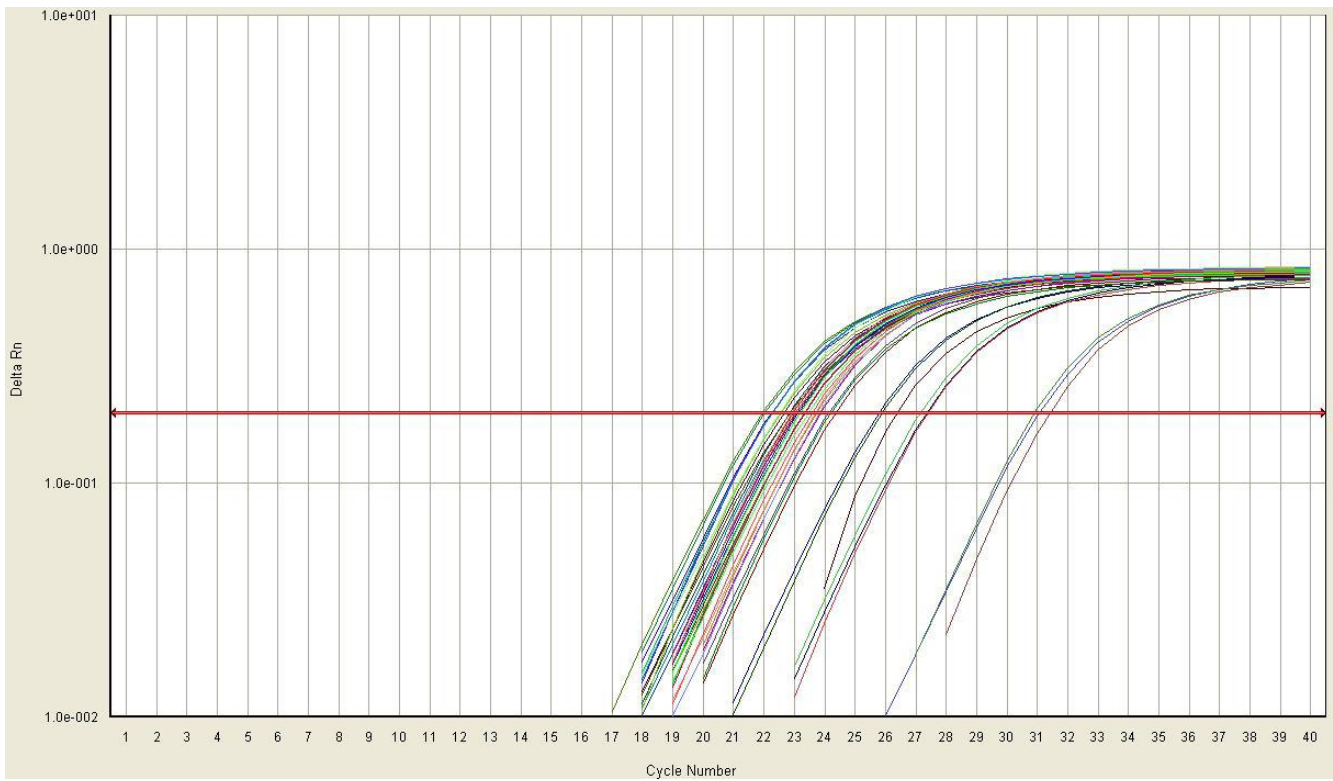


Figura 57: Aquí se observa la conjunción entre la amplificación de las muestras estándar con las muestras de trabajo para el gen endógeno mhmg. En esta figura se observa que las muestras de trabajo amplifican por arriba del umbral de detección incluso superan la concentración del estándar a una concentración de 9.8%.

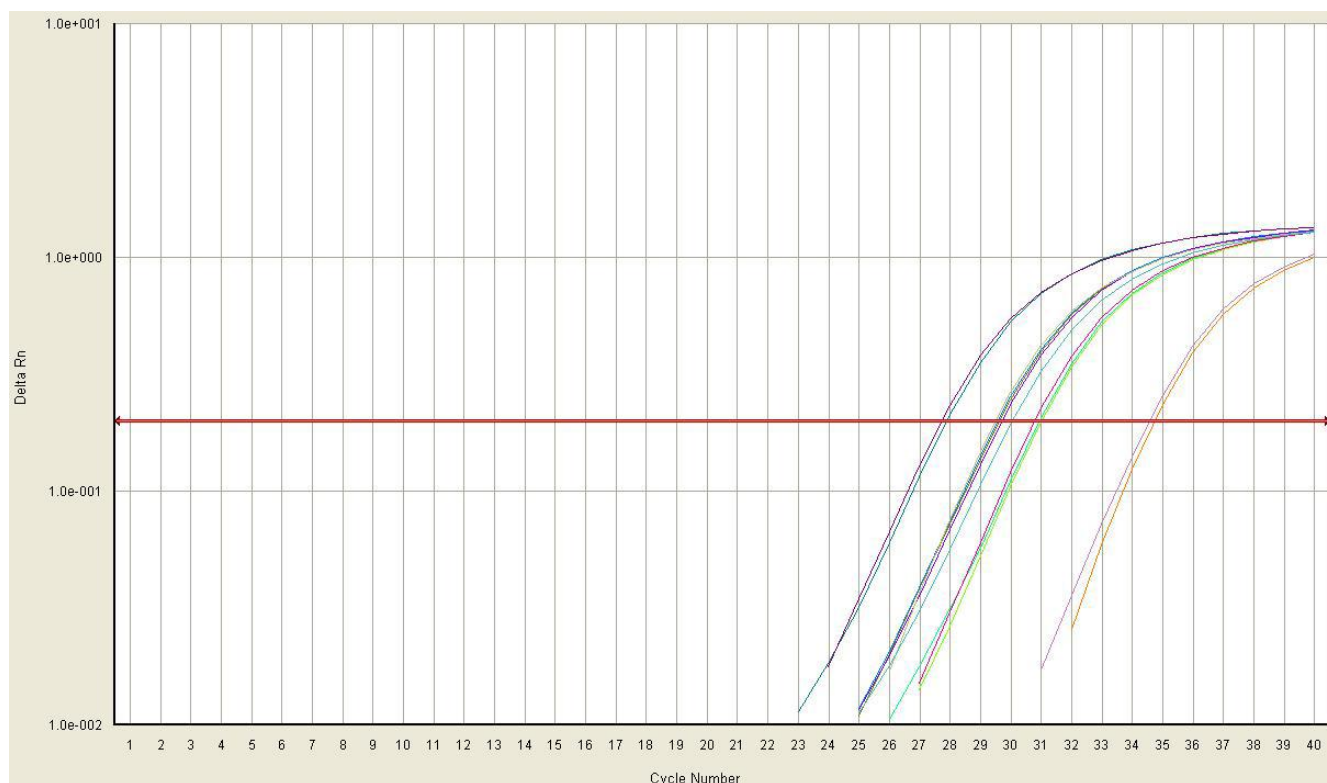


Figura 58: En esta imagen se observan los estándares para el promotor 35S, es decir, la curva de calibración, el estándar de verificación y la muestra adicionada. La curva de calibración consta de cuatro puntos a diferentes concentraciones: 9.8%, 5%, 1% y 0.1%; las cuales se prepararon mediante diluciones seriales a partir del evento de maíz transgénico TC1507 [9.8%]. Las curvas de calibración son muestras estándares con concentraciones conocidas de la secuencia del promotor 35S; sirven para determinar la presencia/ausencia de secuencias del promotor 35S en las muestras de trabajo y para comparar las concentraciones en las muestras de trabajo que son desconocidas. Cada punto de la curva de calibración, se colocó en la placa de PCR-TR por triplicado.

En la figura también se muestran la amplificación para el estándar de verificación y la muestra adicionada. El estándar de verificación que se empleó para este ensayo fue el evento MON810 [5%] y se colocó una sola vez en la placa. La muestra adicionada se preparó con 10µL de la muestra 358/10 + 10µL del evento TC1507 [9.8%] y se colocó una sola vez en la placa.

El orden de las muestras estándar es el siguiente: punto de la curva a [9.8%], muestra adicionada, punto de la curva a [5%], estándar de verificación, punto de la curva a [1%] y punto de la curva a [0.1%].

También cabe resaltar que se agregaron como controles negativos el blanco de reactivos y el blanco de método. El blanco de método, consiste en un tubo sin muestra de ADN pero que se trató en conjunto y de igual manera que las muestras de trabajo durante la extracción de ADN. El blanco de reactivos se preparó adicionando los componentes de la mezcla de reacción para la PCR-TR y en lugar de ADN se le adicionó 4µL de agua inyectable.

Estos dos controles no amplificaron en la prueba de PCR-TR, lo que indica que no hubo contaminación en la parte del método de extracción y los reactivos no se encontraban contaminados.



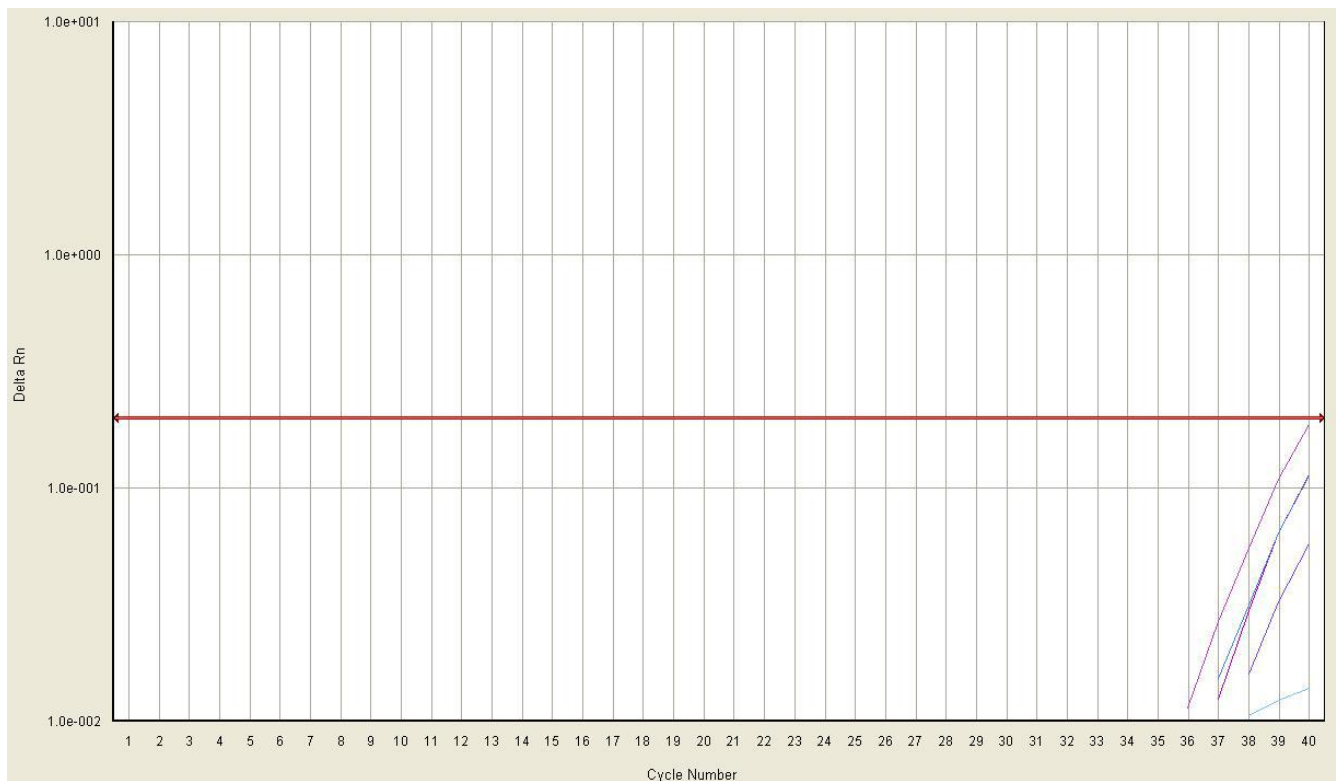


Figura 59: Las muestras de trabajo que se utilizaron en la PCR-TR fueron aquellas que presentaron secuencias positivas de ADN del promotor 35S durante los ensayos de la PCR de punto final. Las muestras que se analizaron en la PCR-TR fueron: 358, 361, 362, 370, 377, 383, 384, 386, 388, 389, 392, 393, 394, 395 y 406. Todas estas muestras se adicionaron por duplicado en la placa de PCR-TR. En esta figura, se observa como cinco de las muestras de trabajo (en el orden 358, 383, 361, 384, 406) comenzaron a amplificar para el promotor 35S en los últimos ciclos de la PCR-TR. Sin embargo, a pesar de que estas muestras amplificaron en los últimos ciclos, se descarta la posibilidad de la presencia del promotor 35S en estas cinco muestras debido a que el umbral de cuantificación y detección de la PCR es de [0.1%]. Si se comparan las muestras de trabajo con los estándares, podemos observar que las curvas de amplificación de las muestras de trabajo se encuentran por debajo de la curva estándar con la concentración de 0.1%.

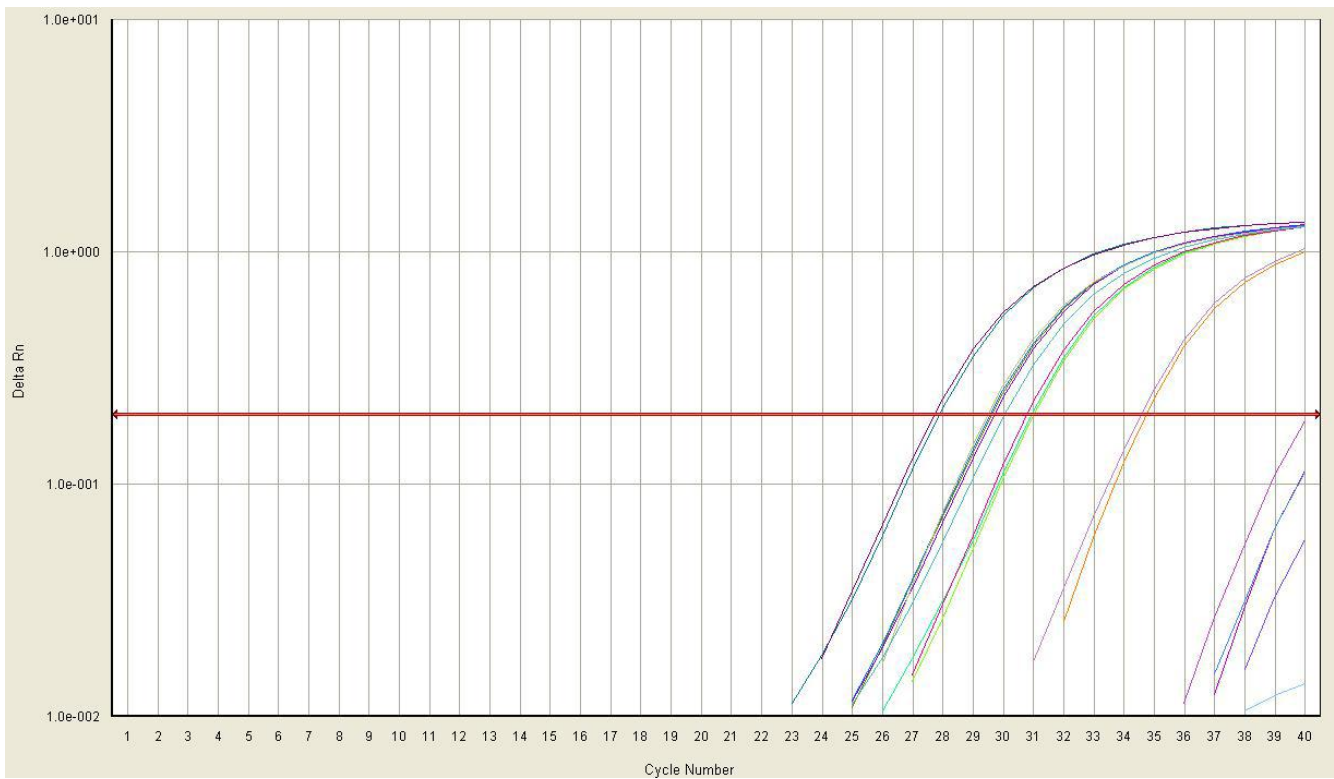


Figura 60: Aquí se observa la conjunción entre la amplificación de las muestras estándar (curvas de calibración) con las muestras de trabajo para el promotor 35S CaMV. Se observa claramente que las únicas cinco muestras de trabajo que amplificaron, lo hicieron por debajo del umbral de detección [0.1%]; lo que indica que dicha amplificación es inespecífica, y por tanto, no hay presencia del promotor 35S CaMV en las muestras de maíz.