

# DISEÑO DE UN PLAN DE MONITOREO DE SECUENCIAS TRANSGÉNICAS EN SITIOS PRIORITARIOS Y CONSOLIDACIÓN DEL LABORATORIO DE REFERENCIA EN ANALISIS DE OGM.

## Informe Final



2016-2017

## CONTAMINACIÓN Y SALUD AMBIENTAL



Elaborado por:

Dra Elena Álvarez-Buylla  
Laboratorio de Genética Molecular,  
Epigenética, Desarrollo y Evolución de  
Plantas. Instituto de Ecología-UNAM

Preparado para la:

Coordinación General de  
Contaminación y Salud Ambiental del  
Instituto Nacional de Ecología y  
Cambio Climático

Periférico Sur, No. 5000, Col.  
Insurgentes/Cuicuilco, Del. Coyoacán, México, D.F.  
C.P. 04530. Tel. +52 (55) 54246400. Fax. +52  
(55) 54245404.  
[www.gob.mx/inecc](http://www.gob.mx/inecc)

Marzo de 2017.

## **DIRECTORIO**

Dra. María Amparo Martínez Arroyo

Directora General del INECC

Dr. J. Víctor Hugo Paramo Figueroa

Coordinador General de Contaminación y Salud Ambiental

Dr. Miguel Gerardo Breceda Lapeyre

Coordinador General de Crecimiento Verde

Dr. Arturo Gavilán García

Director de Investigación sobre Contaminación, Sustancias, Residuos y Bioseguridad

## **SUPERVISIÓN GENERAL Y SEGUIMIENTO DEL ESTUDIO**

Dr. Arturo Gavilán García

Director de Investigación sobre Contaminación, Sustancias, Residuos y Bioseguridad

Biol. Mario Pérez Hernández

Jefe de Departamento de Evaluación de Efectos de Organismos Genéticamente

Modificados en el Ambiente

## Contenido

	Pág.
1. Antecedentes	1
1.1 Técnicas moleculares utilizadas en la detección de organismos genéticamente modificados (OGMs)	5
1.2 Métodos cualitativos de detección de OGMs por PCR	8
1.2.1 Estrategia de escrutinio de OGMs	9
1.2.2 Estrategia evento específica	9
2. Fundamento de la PCR en Tiempo Real	10
2.1 Sistema de detección por fluorescencia con química <i>SYBR® Green</i>	12
2.2 Sistema <i>TaqMan®</i> para detección de OGMs por PCR-tiempo real	15
3. Recepción, registro, clasificación y procesamiento de las muestras en el Laboratorio de Análisis de Organismos Genéticamente Modificados del INECC	17
4. Procesamiento de las muestras	18
5. Extracción de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) total a partir de granos de maíz	18
5.1 Protocolo de extracción de ADN total y su evaluación electroforética y espectrofotométrica	18
5.2 Procedimiento experimental para la extracción de ADN de grano/semilla de maíz	21
6. Diseño de ensayos y disposición de las muestras que serán analizadas por PCR Tiempo Real	23
6.1 Preparación de reacciones para ensayos de PCR en Tiempo Real utilizando <i>SYBR® Green</i>	24
6.2 Programa de ciclado en PCR en tiempo real usando la química <i>SYBR® Green</i> para determinar la presencia de secuencias recombinantes	27
7. Análisis de los datos obtenidos mediante la PCR en Tiempo Real usando la química <i>SYBR® Green</i> para determinar la presencia de secuencias recombinantes	27
8. Determinación de la especificidad de los iniciadores usados para identificar los elementos transgénicos CaMVp35S y T-NOS en PCR en Tiempo Real en la etapa de escrutinio de OGMs	28
9. Determinación de la especificidad de los iniciadores para la identificación de los eventos transgénicos específicos de maíz por medio de PCR en Tiempo Real, utilizando la química <i>SYBR® Green</i>	31
10. Detección del gen endógeno de maíz <i>hmgA</i> por PCR en Tiempo Real utilizando la química <i>SYBR® Green</i>	36
11. Determinación de la especificidad de los iniciadores para la identificación de los eventos transgénicos específicos de maíz por medio de PCR en Tiempo Real, utilizando la química <i>TaqMan®</i>	36
12. Reunión de expertos en maíz para la definición de criterios para el establecimiento de zonas o regiones prioritarias de muestreo para el monitoreo de la presencia de transgenes en poblaciones de maíz nativo, así como criterios para implementar una estrategia de muestreo	41
13. Formato de colecta de muestras de semillas de poblaciones de maíz nativo, híbridos comerciales y parientes silvestres de maíz	47
14. Formato de encuesta orientada a obtener información geográfica, agronómica, socioeconómica de los sitios de colecta de muestras	51
15. Consideraciones sobre la situación de los acervos de semilla de maíz en México	60

16. Estrategia de muestreo propuesta para obtener una estimación representativa de la frecuencia de transgenes en lotes de semillas de maíz nativo en hogares rurales mexicanos, a nivel de las regiones seleccionadas	65
17. Análisis y evaluación del primer periodo de ejecución del proyecto	68
18. Análisis y evaluación del segundo periodo de ejecución del proyecto	70
19. Recomendaciones	73
20. Bibliografía	74

## 1. Antecedentes

México es considerado el centro mundial de origen y diversificación del maíz con miles de variedades locales agrupadas en 59 razas que aún se siembran a lo largo y ancho del país (Kato, 2009). Este cultivo es parte nodal del patrimonio biocultural de la nación y es eje articulador de la actividad campesina y agrícola de México (Álvarez-Buylla *et al.*, 2013).

El maíz es el cultivo más importante del país desde el punto de vista alimentario, económico y social. En el año 2015 se sembraron alrededor de 7.6 millones de hectáreas de maíz (bajo condiciones de riego y temporal), de las cuales se cosecharon aproximadamente 5.4 millones de hectáreas, con un rendimiento promedio cercano a 3.5 toneladas por hectárea, siendo el rendimiento de temporal de 2.3 ton/ha y el de riego de 8.0 ton/ha (SIAP, 2016). Para el mismo año, el volumen de producción nacional de maíz alcanzó 24.7 millones de toneladas (SIAP, 2016). El cultivo participa con aproximadamente el 32.7% del valor de producción del sector agrícola (84.5 mil millones de pesos en 2015) y concentra el 48% de la superficie sembrada en el territorio nacional que equivale a 7.6 millones de hectáreas (SIAP, 2016). La producción media de maíz blanco es de 22,3 millones de toneladas, mientras que de maíz amarillo es de 3,0 (12% de la producción nacional).

En 2015, México importó alrededor de 880 mil toneladas de maíz blanco en su totalidad de Estados Unidos, y alrededor de 10 millones de toneladas de maíz amarillo, 99.68% provenientes de Estados Unidos y únicamente 0.32 % de Brasil (SAGARPA, 2015). Todas las entidades del país tienen algún nivel de producción de maíz, sin embargo, siete entidades concentran el 55.9% del volumen de producción nacional; Sinaloa es el principal productor al concentrar el 14.8% del total, le siguen en importancia Jalisco (7.8%), Chihuahua (7.8%), Sonora (7.2%), Michoacán(6.9%), Guanajuato (6.1%) y Estado de México (5.4%) (SIAP, 2016).

El promedio del consumo nacional aparente de maíz blanco en el período de octubre de 2014 a septiembre de 2015 fue de 20.4 millones de toneladas, mientras que el de grano amarillo oscila las 13.1 millones de toneladas (SAGARPA, 2015). El consumo *per cápita* de maíz en México es aproximadamente 10 veces mayor que el de Estados Unidos (Serna-Saldívar, 2008) y este grano es la base de la alimentación de la población mexicana: el consumo anual *per cápita* en México es de 123 kg, mientras que el promedio mundial es de 16.8 kg al año (Trejo, 2014).

El uso alimentario del maíz es sin duda el más destacable, ya que en el país se utilizan numerosas variedades de maíces nativos para elaborar una enorme cantidad de platillos tradicionales, lo que hace que este grano sea uno de los elementos esenciales de la cocina mexicana (Fernández-Suárez *et al.*, 2013). En forma de tortilla, el consumo humano directo equivale a unos 218 g diarios *per cápita* en zonas rurales y 155 g diarios por persona en las zonas urbanas (Fernández-Suárez *et al.*, 2013); es la principal fuente de energía, proteínas, almidones, fibra, hierro, y varias vitaminas en la dieta media aparente (Bourges, 2013). Al consumir maíz, un mexicano recibe diariamente en promedio 982 kcal y 25.3 g de proteína (FAOSTAT, 2011), si se toma como base una dieta de 2000 kcal y 56 g de proteína, el consumo de maíz en México equivale a casi el 50% de la ingesta diaria de una persona adulta (Serna-Saldívar & Amaya-Guerra, 2008). Se han contabilizado más de 700 platillos elaborados con maíz en México, por lo que la cocina tradicional nacional es considerada por la UNESCO como Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad (UNESCO, 2010).

Aunque México es el centro de origen y diversificación del maíz y este es el cultivo de mayor importancia en México, en el año 2000, investigadores de la Universidad de Berkeley, detectaron contaminación transgénica de maíces nativos en comunidades de la sierra de Oaxaca (Quist & Chapela, 2001). Los datos fueron confirmados por investigaciones posteriores y adicionalmente se detectó la presencia de maíz transgénico en otros estados del país (Dyer *et al.*, 2009; Piñeyro-Nelson *et al.*, 2009; Serratos-Hernández *et al.*, 2007). Esto confirmó que las variedades genéticamente modificadas habían logrado penetrar

a regiones remotas a pesar de la moratoria a la siembra y experimentación con granos transgénicos implementada por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) desde 1999 (Serratos-Hernández, 2009).

El maíz genéticamente modificado o maíz transgénico es aquel al que se han insertado mediante tecnología de ADN recombinante, uno o varios genes o construcciones recombinantes que en conjunto expresan proteínas de interés biotecnológico, o afectan vías metabólicas para dar lugar a característica de interés agronómico, alimentario o industrial (Key, Ma, & Drake, 2008). Un evento transgénico se refiere a la recombinación única de ADN que se inserta en las células usadas en cultivo de tejidos para dar lugar a una planta completa (GMO Compass, 2015). Las células que incorporaron exitosamente el o los transgenes de interés y que resultan en la expresión óptima del transgén son consideradas eventos “elite”; la línea transgénica derivada de dichas plantas, se identifica con una abreviación (p.ej. Bt176, NK603) (De Wolf *et al.*, 2010). Los eventos de transformación difieren unos de otros en los elementos y genes insertados, en los sitios de inserción en el genoma de la planta, en el número de copias del inserto y en los patrones y niveles de expresión de las proteínas de interés. Los eventos además pueden acumularse por cruza convencional, dando como resultado una planta con varias características combinadas, lo que se conoce como eventos apilados (Watson & Preedy, 2015).

Para llevar a cabo una modificación genética en una célula, se utilizan vectores de transformación, los cuales incluyen una construcción quimérica o *cassette* de transformación que contiene por lo menos tres secuencias: secuencia promotora, gen de interés y secuencia terminadora (Kato *et al.*, 2013).

La secuencia promotora es la encargada de regular la expresión de un gen, el transgén de interés codifica para la proteína que se quiere producir en el maíz genéticamente modificado, y la secuencia terminadora delimita hasta dónde llega la ADN polimerasa para la transcripción del transgén (Álvarez-Buylla *et al.*, 2013). El promotor más utilizado en los eventos transgénicos disponibles

es la secuencia correspondiente al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Álvarez-Buylla *et al.*, 2013) y el terminador mayormente utilizando es el T-NOS del gen de la nopalina sintasa de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*; (Holden, Levine, Scholdberg, Haynes, & Jenkins, 2010).

Mundialmente se encuentran disponibles a nivel comercial 148 eventos de maíz genéticamente modificado para diversos rasgos, la gran mayoría corresponden a maíz con tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos y un gran porcentaje de estos se presentan como eventos transgénicos apilados (ISAAA, 2016b). En 2015, se plantaron en algunos países 185 millones de hectáreas de maíz, de las cuales el 29% (53.6 millones de hectáreas) correspondían a variedades de maíz transgénico (ISAAA, 2016a).

Aunque en México actualmente no está permitida la siembra de maíz transgénico a nivel comercial, el país importa grano en su mayoría proveniente de Estados Unidos nominalmente destinado para procesos industriales. En el país se han aprobado para consumo humano y animal 68 eventos de maíz genéticamente modificado, de los cuales 57 contienen algún gen de tolerancia a herbicidas y 55 contienen algún gen de resistencia a insectos, encontrándose la mayoría como eventos transgénicos apilados (ISAAA, 2016b).

Entre los años 2005 y 2015, se otorgaron 202 permisos para sembrar maíz transgénico en el territorio mexicano, para la realización de actividades de liberación experimental y en programa piloto. El año en el que más permisos se otorgaron para sembrar maíz transgénico en el territorio nacional fue 2010, con 68 permisos otorgados. No se tiene certeza sobre el número de permisos otorgados entre los años 2012 y 2013 ya que, de acuerdo a la fuente consultada, algunas solicitudes para siembra no han sido resueltas (CIBIOGEM, 2017).

La liberación al ambiente de maíz genéticamente modificado en el Centro de Origen y Diversidad representa un riesgo debido a que se ha comprobado que existe flujo génico hacia las variedades nativas y por lo tanto no es posible la coexistencia entre ambos tipos de cultivo (Turrent-Fernández *et al.*, 2009). El



flujo génico ha añadido un nivel extra de riesgo a la biodiversidad, se debe reforzar el principio precautorio para proteger la integridad ecológica y evolutiva de la biodiversidad natural (Pimentel *et al.*, 2000), mediante la prevención de la propagación de OGM en el ambiente. También son necesarias herramientas regulatorias más severas para rechazar la liberación de organismos transgénicos que no pueden ser controlados en su dimensión espacio-temporal, especialmente si tienen consecuencias no intencionadas a largo plazo (Bauer-Panskus *et al.*, 2015).

### **1.1 Técnicas moleculares utilizadas en la detección de organismos genéticamente modificados (OGMs)**

La detección de OGMs consiste en evidenciar la presencia de secuencias recombinantes en el ADN de un organismo. Esto se realiza a través de la detección del ADN transgénico insertado en la muestras que se someten al análisis, detectando la nueva proteína expresada, o en el caso de que la proteína sea una enzima, utilizando el análisis químico para detectar el producto de la acción enzimática (Querci *et al.*, 2007).

Los dos métodos comúnmente utilizados para la detección de modificaciones genéticas en plantas son los métodos de ELISA y la PCR. El primero es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA, por sus siglas en inglés), basado en la especificidad de la unión entre el antígeno expresado por la proteína transgénica y un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable. El segundo método es la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR, por sus siglas en inglés) (Saiki *et al.*, 1988), basada en la detección de secuencias de ADN insertadas en el genoma de la planta por técnicas de ingeniería genética. Ambos métodos indican la presencia o ausencia de OGMs en la muestra y pueden dar una estimación de su contenido (López *et al.*, 2003).

El uso de la técnica ELISA está frecuentemente limitado por el bajo nivel de expresión de la proteína transgénica, o por la degradación de las mismas

durante el procesamiento de la muestra (Arleo, 2015). Adicionalmente, en el caso de los eventos transgénicos apilados, la presencia combinada de transgenes, puede influir en el silenciamiento de otros genes o de las mismas secuencias transgénicas, y cambiar la expresión de por ejemplo, secuencias reguladoras (De Schrijver *et al.*, 2007), situación que produciría la ausencia del promotor responsable de la expresión del transgén para su transcripción a ARN y posterior traducción a proteína (Alavez *et al.*, 2013).

Por otro lado, los métodos basados en la detección de ADN han resultado ser más específicos y sensibles y son además, los métodos aceptados y validados por las instancias regulatorias internacionales (Barbau-Piednoir *et al.*, 2014; EFSA, 2008; Gasparic *et al.*, 2010; Mazzara *et al.*, 2004). El método PCR permite la amplificación selectiva de fragmentos específicos de ADN presentes en baja frecuencia en una matriz que contiene otras secuencias de ADN.

Durante el desarrollo del presente proyecto se implementan u optimizan protocolos de extracción de ácidos nucleicos (ADN) de los materiales vegetales (semillas) que serán la base para la detección e identificación de secuencias recombinantes en los cultivos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (PCR-TR). Adicionalmente, se optimizan los protocolos de determinación de la presencia e identificación de elementos transgénicos tales como el promotor 35S CaMV, el terminador NOS y los eventos transgénicos específicos para maíz NK603, MON810, TC1507, GA21, Bt11, Bt176 DAS59122, MIR604, MON88017, MON89034, MIR162. En la Tabla 1 se presentan las características de los eventos transgénicos para los cuales se optimizan los protocolos de detección e identificación en el presente proyecto.

**Tabla 1.** Características de los eventos transgénicos específicos de maíz NK603, MON810, TC1507, GA21, Bt11, Bt176, DAS59122, MIR604, MON88017, MON89034, MIR162.

Evento transgénico	Rasgo(s)	Uso sugerido	Genes Insertados	Promotor CaMV 35S	Terminador T-NOS	Autorización en México*
<b>Bt11</b>	Resistencia a insectos lepidópteros Tolerancia a glufosinato de amonio	Consumo humano Forraje (alimento ganado)	cry1Ab pat	Si	Si	2007
<b>Bt176</b>	Resistencia a insectos lepidópteros Tolerancia a glufosinato de amonio	Consumo humano Forraje (alimento ganado)	cry1Ab bar	Si	No	No hay aprobación
<b>TC1507</b>	Resistencia a insectos lepidópteros Tolerancia a glufosinato de amonio	Consumo humano Forraje (alimento ganado)	Cry1Fa2 pat	Si	No	2003
<b>GA21</b>	Tolerancia a glifosato	Consumo humano Forraje (alimento ganado)	Epsps (modificado)	No	Si	2002
<b>MON810</b>	Resistencia a insectos lepidópteros Tolerancia a glifosato	Consumo humano Forraje (alimento ganado)	cry1Ab cp4 epsps goxv247	Si	No	2002
<b>NK603</b>	Tolerancia a Glifosato	Consumo humano Forraje (alimento ganado)	cp4 epsps	Si	Si	2002
<b>DAS59122</b>	Tolerancia a glufosinato Resistencia a insectos coleópteros	Consumo humano	pat cry34Ab1 cry35Ab1	Si	No	2004
<b>MIR604</b>	Resistencia a insectos coleópteros	Consumo humano Forraje (alimento para ganado)	mcry3a	No	Si	2007
<b>MON89034</b>	Resistencia a insectos lepidópteros	Consumo humano Forraje (alimento para ganado)	cry2Ab2 cry1A.105	Si	Si	2008
<b>MON88017</b>	Tolerancia a glifosato Resistencia a insectos coleópteros	Consumo humano Forraje (alimento para ganado)	cp4 epsps cry3Bb1	Si	Si	2006
<b>MIR162</b>	Resistencia a insectos lepidópteros	Consumo humano Forraje (alimento para ganado)	vip3Aa20	No	Si	2010

## 1.2 Métodos cualitativos de detección de OGMs por PCR

Existen varios niveles de especificidad para el análisis de detección de transgenes por PCR, dependiendo del blanco al cual están dirigidos los cebadores. En grado creciente de especificidad se encuentran las siguientes estrategias de detección: rastreo o escrutinio de OGMs, detección específica de gen, detección específica de construcción y detección específica de evento.

La diferencia entre ellas consiste en la secuencia blanco a la cual se unen los cebadores dentro de la construcción del transgén (*cassette* de expresión). Estas secuencias pueden ser: el promotor, un gen introducido, el terminador, o la unión entre dos de estos elementos (Arleo, 2015).

El promotor es una señal molecular para el inicio de la expresión génica (transcripción) y consecutivamente para la producción de la proteína de interés. El promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) es utilizado en más del 90% de las variedades de plantas GM liberadas (CERA, 2015). El gen introducido codifica para una proteína nueva que confiere a la planta cierta característica de interés agronómico, biotecnológico, industrial o alimentario (p.ej. el gen de la proteína cry1Ab para la resistencia a insectos). Los genes introducidos pueden existir en la naturaleza o pueden ser completamente sintéticos. La secuencia terminadora es la señal de finalización para la expresión de la proteína de interés. Aproximadamente el 70% de las plantas transgénicas liberadas, contienen en su construcción al terminador del gen (*nos*) de la enzima nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (CERA, 2015).

Debe tomarse en cuenta que estos elementos pueden originarse a partir de organismos de tipo silvestre, pueden estar presentes en más de una copia y en más de un evento transgénico; incluso pueden ser combinados de una manera similar en más de un OGM. De este modo, la elección del método debe ajustarse a la finalidad del análisis (Anklam *et al.*, 2002).

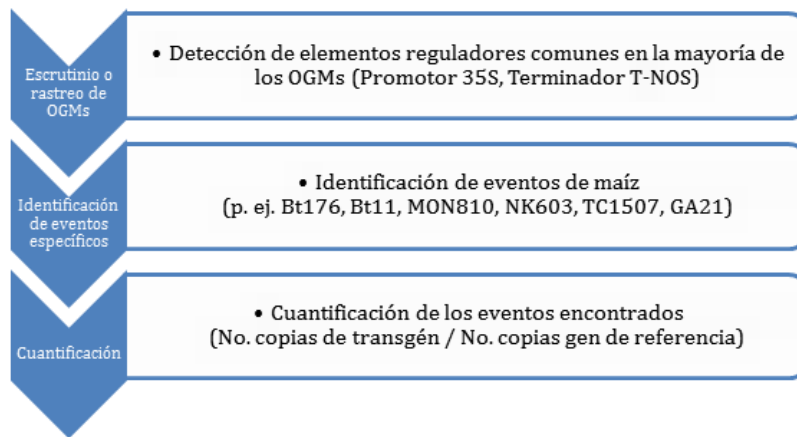
### **1.2.1 Estrategia de escrutinio de OGMs**

En el primer nivel de especificidad, se encuentra el escrutinio o rastreo de OGMs, que es capaz de detectar a la mayoría de eventos transgénicos autorizados actualmente. Se basa en la detección de las secuencias que controlan la expresión de los transgenes, como promotores y terminadores que flanquean al gen introducido en la planta. Entre las secuencias reguladoras más utilizadas se encuentra el promotor CaMV 35S y el terminador T-NOS. Esta aproximación establece en primera instancia si la muestra contiene o no rastros de material genéticamente modificado. Si bien tiene la virtud de poder detectar la presencia de varios eventos transgénicos en un solo ensayo, no existe un único rastreo que detecte todos los OGMs, ya que existen eventos que contienen promotores y terminadores distintos al promotor CaMV 35S (p. ej. Promotor FMV del virus del mosaico del higo y el terminador t-HSP17 de la proteína *heat shock* del trigo). Es un método cualitativo, cuya sensibilidad suele detectar alrededor de 0.01% de material GM (Griffiths, Partis, & Croan, 2002).

### **1.2.2 Estrategia evento específica**

La estrategia específica de evento permite identificar un único evento de transformación. Se logra una mayor especificidad ya que detecta la secuencia comprendida en el sitio de unión entre el ADN transgénico y el genoma del organismo huésped, que es único para cada evento de transformación (Markoulatos *et al.*, 2004).

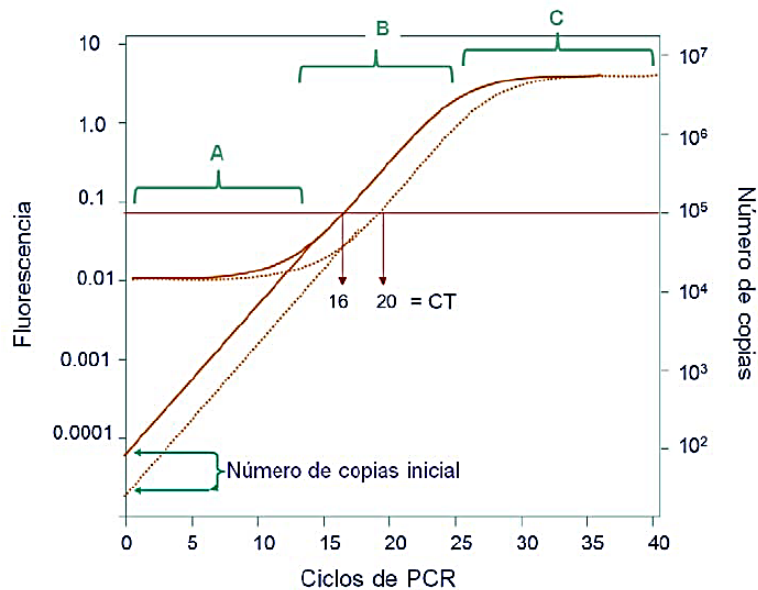
Debido a que los eventos apilados (que se obtienen mediante la cruce entre líneas de plantas GM) se consideran nuevos eventos transgénicos, mediante el uso de estos métodos es imposible distinguir entre un evento apilado, por ejemplo el evento MON810 X NK603, y la mezcla de los OGM parentales MON810 y NK603 en una muestra (Holst-Jensen *et al.*, 2006) (Figura 1).



**Figura 1.** Procedimiento general para la detección de OGMs. 1. Escrutinio de OGMs: se detecta la presencia de OGMs mediante una búsqueda dirigida de secuencias comunes presentes en distintos eventos. 2. Identificación de eventos específicos. 3. Cuantificación de los OGMs encontrados.

## 2. Fundamento de la PCR en Tiempo Real

La técnica de PCR en Tiempo Real representa una metodología práctica, rápida y confiable para detectar secuencias transgénicas en alimentos (Ahmed, 2002). La gran mayoría de los trabajos publicados para detectar OGMs en matrices complejas se respaldan en esta técnica (Barbau-Piednoir *et al.*, 2010; Huber *et al.*, 2013; Van den Bulcke *et al.*, 2010). Los sistemas de PCR en tiempo real monitorean la cantidad de producto amplificado a medida que se lleva a cabo la reacción. En este tipo de sistema, la PCR se acopla a la emisión de una señal fluorescente proporcional a la cantidad de producto generado en cada ciclo sucesivo de reacción. El primer incremento significativo de la fluorescencia se correlaciona con la cantidad inicial del molde de ADN blanco (Vinueza-Burgos, 2009). A medida que progresa la reacción de PCR, se recogen los datos de fluorescencia (valores  $R_n$ ) y se construye un gráfico respecto al tiempo de reacción (número de ciclos) como se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Esquema de las etapas de detección de fluorescencia en un sistema de PCR en tiempo real. En la etapa A, se detecta fluorescencia de fondo. En los ciclos incluidos en la fase B se observa incremento exponencial de fluorescencia (es posible analizar medidas tanto cualitativas como cuantitativas). En C la reacción ha llegado a una fase de saturación o agotamiento de los reactivos, el nivel de fluorescencia se iguala independientemente de la cantidad de ADN inicial y la medida sólo es relevante como dato cualitativo (tiempo final). El Ct de cada muestra representa el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el nivel de referencia (umbral), y es proporcional al número de copias de ADN iniciales en la reacción. Tomado de (López Andreo, 2013).

La cuantificación de la fluorescencia en el sistema se efectúa en la fase de crecimiento exponencial de la cantidad de ADN amplificado. El número de ciclo en el cual la emisión de la intensidad de fluorescencia se eleva por encima del ruido de fondo, se conoce como ciclo umbral o Ct (López Andreo, 2013). Cuanto mayor es la cantidad inicial de ADN genómico, más temprano se detecta el producto acumulado y más bajo resulta el valor de Ct. La cuantificación se realiza comparando el número de ciclo, Ct, en el cual la muestra problema alcanza un mismo nivel de fluorescencia que una muestra patrón, cuya concentración inicial o número de copias de ADN es conocida (Mason *et al.*, 2002). Si en cada ciclo de PCR se duplica el número de moléculas (asumiendo una eficiencia de la reacción del 100%), el valor de Ct debe ser proporcional al número de copias de ADN inicial en la muestra.

El número de copias de ADN cuando se alcanza el nivel de fluorescencia de referencia,  $N_{Ct}$ , será proporcional al número de copias diana inicial,  $N_i$ , según la ecuación:

$$N_{Ct} = N_i \times 2^{Ct}$$

Dado que experimentalmente, la cantidad de ADN producida en cada ciclo puede no ser exactamente el doble de la presente en el ciclo previo, se puede proponer una forma más general de la ecuación anterior:

$$N_{Ct} = N_i \times (1 + E)^{Ct}$$

En la que E es la eficiencia de la reacción de PCR, es decir, el número medio de copias de producto de reacción por ciclo de PCR (López Andreo, 2013). La eficiencia puede ser calculada experimentalmente, tomando el valor de la pendiente de una curva de calibración realizada con diluciones seriadas de un estándar de ADN de concentración conocida (Ct vs log[ADN]). E se calcula de acuerdo a la fórmula:

$$E = 10^{\left(\frac{1}{\text{pendiente}}\right)}$$

El cálculo de la eficiencia de PCR es importante en los métodos de cuantificación, ya que permite realizar comparaciones entre datos obtenidos a partir de amplificaciones independientes.

## **2.1 Sistema de detección por fluorescencia con química SYBR® Green**

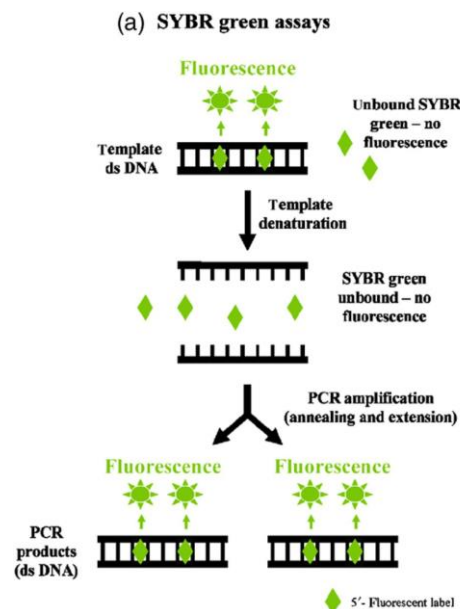
La especificidad del método de PCR en Tiempo Real depende del reactivo fluorescente utilizado para generar la señal de amplificación y del instrumento empleado para monitorearla. Los sistemas de detección por fluorescencia utilizan actualmente dos tipos de reactivos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos (Gasparic *et al.*, 2010).

Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble cadena. El más



empleado en PCR en Tiempo Real es el *SYBR<sup>®</sup> Green* (Figura 3). A medida que la reacción de PCR avanza, el producto amplificado se acumula, una mayor proporción de moléculas de *SYBR<sup>®</sup> Green* se unen a las dobles hebras de ADN generadas, lo que resulta en un aumento de la señal de fluorescencia (BIO-RAD Laboratories, 2012).

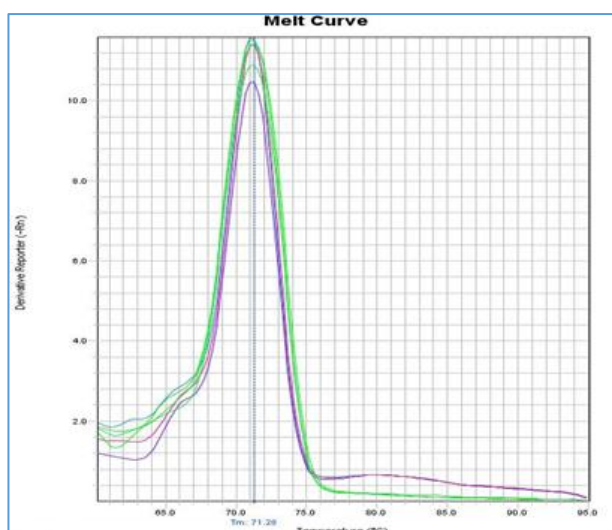
La utilización de *SYBR<sup>®</sup> Green* es ventajosa por su robustez, simplicidad y capacidad de detectar concentraciones bajas de ADN de doble cadena, además de ser más económico que las sondas específicas. La principal desventaja es la potencial falta de especificidad ya que el *SYBR<sup>®</sup> Green* se intercala a cualquier secuencia de doble cadena, emitiendo así una señal fluorescente, dificultando la distinción entre el ADN blanco y la amplificación de secuencias no diana o de la formación de dímeros de cebadores; además de la señal de fluorescencia de base de la técnica, emitida por el compuesto *SYBR<sup>®</sup> Green*. Por esta razón es importante implementar un análisis de la curva de disociación (*melt curve*), para verificar si se está amplificando la secuencia diana u otro artefacto (Hernández *et al.*, 2003).



**Figura 3.** Detección de productos de amplificación mediante agentes intercalantes fluorescentes (*SYBR Green*). El colorante se une al surco del ADN bicatenario, pero no al ADN monocatenario. Como consecuencia de esta unión, se produce un incremento de la señal fluorescente (representado con estrellas color verde).

Debido al aumento de la cantidad de ADN recién sintetizado tras cada ciclo de la PCR, la emisión de fluorescencia aumenta en proporción al número de moléculas del ADN bicatenario, tomado de (Smith & Osborn, 2009).

La curva de disociación es la representación gráfica del proceso experimental de amplificación por PCR-tiempo real, en la etapa en la que se aumenta la temperatura del sistema de reacción para que todas las cadenas de ADN que se encuentren en doble cadena se disocian a cadenas simples. De esta forma, las moléculas de *SYBR*<sup>®</sup> *Green* que se encontraban unidas al ADN de doble cadena se liberan, lo que se observa como una disminución de la fluorescencia. En una curva de disociación típica (Figura 4) se representa la intensidad de fluorescencia frente a la temperatura y se traza la primera derivada negativa ( $-d(\text{RFU})/dt$ ). Esta derivada representará un pico característico a cada amplificación, conocido como temperatura de disociación (*melting temperature*). La temperatura de *melting* o  $T_m$ , es la temperatura a la cual el 50% de los pares de bases de bases de una doble cadena de ADN se separan. La misma dependerá del tamaño del ADN de doble cadena y de su composición en bases nitrogenadas. Cuanto mayor sea el contenido de GC (guanina-citosina) y más grande sea el tamaño de amplicón, más alta será la temperatura de disociación. Mediante la comparación de las  $T_m$  de los amplicones conocidos, se puede detectar fácilmente la presencia de un amplicón secundario o inespecífico, o de la formación de dímeros de cebadores (Flores *et al.*, 2007).



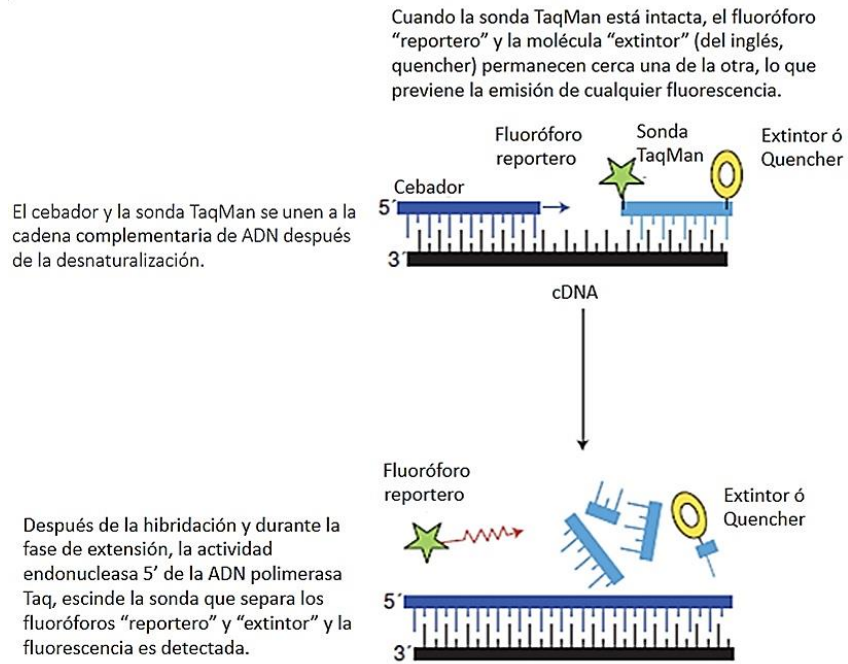
**Figura 4.** Curva de disociación (*melt curve*) típica generada a partir de los datos recolectados del análisis de PCR en tiempo real utilizando el colorante *SYBR Green*. Mediante la comparación de las temperaturas de disociación de los productos de PCR de cada muestra, se puede detectar la presencia de la secuencia diana, la presencia de un amplicón no blanco adicional, o la formación de dímeros de cebadores.

## 2.2 Sistema *TaqMan*<sup>®</sup> para detección de OGMs por PCR-tiempo real

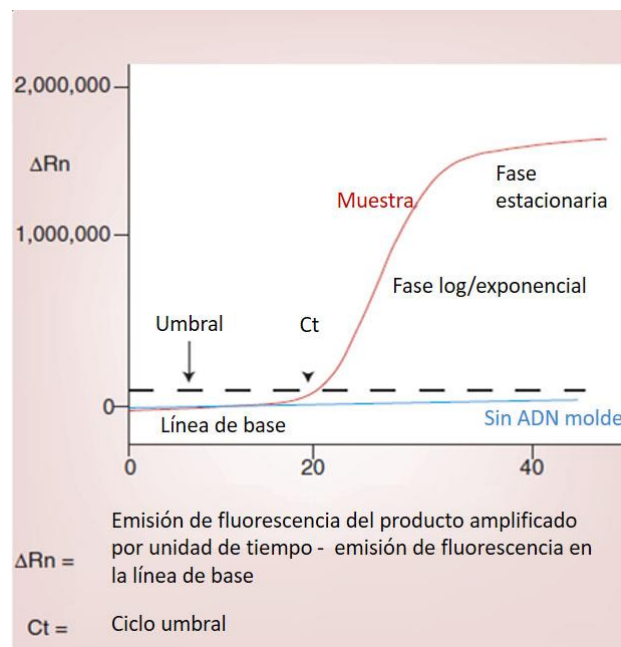
Otra variante de la técnica de identificación y cuantificación de OGM mediante PCR-tiempo real implica la utilización de la química *TaqMan*<sup>®</sup>. La cual requiere de sondas de oligonucleótidos doblemente marcadas con compuestos fluorogénicos. La sonda incluye un compuesto reportero fluorescente en el extremo 5' y un compuesto que extingue la fluorescencia unido al extremo 3' de la sonda. Durante la reacción de amplificación, mientras la sonda esté intacta, la proximidad del compuesto extintor, absorberá la fluorescencia emitida por el compuesto fluorógeno unido a la región 5' de la sonda. La emisión de la señal fluorescente será emitida únicamente cuando se degrade la sonda, basada en el principio de transferencia de la energía de resonancia de la energía fluorescente (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET, por sus siglas en inglés).

En esta variante de la PCR-tiempo real se utilizan sondas *TaqMan*<sup>®</sup>. Si la secuencia diana está presente, la sonda *TaqMan*<sup>®</sup> -diseñada específicamente para hibridar con la secuencia diana- se hibrida con esta, y posteriormente es hidrolizada debido a la actividad 5' exo nucleasa de la enzima Taq polimerasa durante la fase de extensión de la PCR. Mientras la sonda esté intacta, ocurre el principio FRET y la emisión de fluorescencia del compuesto reportero es absorbida por el compuesto extintor. La hidrólisis de la sonda por la Taq polimerasa durante la PCR separa a los compuestos reportero y extintor, por lo que la emisión de la fluorescencia no es absorbida y aumenta a medida de que se amplifican específicamente copias de la secuencia diana (Arya, Shergill, Williamson, Gommersall, & Arya, 2005). La Figura 5 muestra un esquema general del principio de la química *TaqMan*<sup>®</sup> para la amplificación específica de secuencias genéticas.

El software de la computadora asociada al termociclador de tiempo real construye curvas de amplificación con los valores de emisión de fluorescencia que son colectados durante la amplificación de la PCR. En la Figura 6 se muestra una gráfica de amplificación representativa y se indican términos relevantes asociados a la misma.



**Figura 5.** Esquema general del fundamento de PCR-tiempo real utilizando la química *TaqMan*<sup>®</sup> (Modificada de Manit *et al.*, 2005).



**Figura 6.** Curva de amplificación representativa de PCR-tiempo real empleando la química *TaqMan*<sup>®</sup>(Modificada de Manit *et al.*, 2005).

### **3. Recepción, registro, clasificación y procesamiento de las muestras en el Laboratorio de Análisis de Organismos Genéticamente Modificados del INECC**

La información mínima necesaria que debe acompañar a las muestras que serán analizadas en el Laboratorio de Análisis de Organismos Genéticamente Modificados del INECC debe ser registrada en los formatos denominados Cadena de Custodia y Orden de Trabajo.

En el formato de Cadena de Custodia se registra la información referente al nombre del solicitante del servicio, su domicilio (ciudad, estado y código postal); datos de contacto (correo electrónico, número telefónico y/o fax). En una sección posterior se registra la identificación asignada en campo para la muestra, la fecha y hora del muestreo, el tipo de muestra, matriz, material del contenedor, número de muestras y descripción (cantidad, presencia o ausencia de plagas, color y/o variedad de la semilla). También se incluye el tipo de análisis solicitado, en este caso, detección de secuencias transgénicas.

Una vez que se cuenta con la totalidad de la información requisitada, el responsable de recepción de muestras le asigna a cada una de las muestras una clave de identificación interna y un folio de cuatro dígitos.

Posteriormente se completa el formato de la Orden de Trabajo, en la cual se asigna el servicio al área correspondiente de atención dependiendo del análisis solicitado, en este caso, laboratorio de análisis de OGM. Par asegurar que el área de análisis realizará el procedimiento sin ningún conflicto de intereses se omite la información del solicitante y clave de identificación de campo y sólo se incluye la clave de identificación interna. Los formatos de Cadena de Custodia y Orden de Trabajo se oficializan con el nombre, firma, fecha y hora de quien recibe y entrega las muestras y los resultados.

#### **4. Procesamiento de las muestras**

Previo al procesamiento de las muestras para generar harina a partir de las muestras de granos, los molinos son limpiados sucesivamente con hipoclorito de sodio al 20% (v/v), etanol al 70% (v/v) y agua destilada (Anexo 3 y 4).

Las muestras a analizar se pulverizaron en molinos para granos destinadas específicamente para trabajo en laboratorio de biología molecular hasta obtener una harina fina. Las harinas obtenidas de la molienda se depositaron en bolsas transparentes de polietileno etiquetadas con la clave de identificación correspondiente a la muestra y se conservaron en un ambiente fresco y libre de humedad para evitar el crecimiento de microorganismos.

#### **5. Extracción de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) total a partir de granos de maíz**

Hasta ahora, el Laboratorio de Análisis de Organismos Genéticamente Modificados del INECC, utilizaba el 'Protocolo de extracción de ADN total y su evaluación espectrofotométrica y electroforética', para la extracción de ADN de muestras a las que se determina la presencia de secuencias transgénicas. Este protocolo está basado en la Norma ISO: 'ISO 21571: Foodstuffs- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- Nucleic acid extraction'. El protocolo se describe a continuación.

##### **5.1 Protocolo de extracción de ADN total y su evaluación electroforética y espectrofotométrica**

La extracción del material genético de cada una de las muestras se realiza por duplicado. En los casos que se requiera realizar extracciones del material genético a partir de 2g de muestra vegetal multiplicar por 10 los volúmenes a adicionar.

- 1) Pesar de 200 a 300 mg de muestra vegetal en un tubo estéril de 2 mL para microcentrífuga.

- 2) Añadir 1500  $\mu\text{L}$  de Buffer de extracción CTAB 2X (pre-calentado a  $65^{\circ}\text{C}$ ).  
Nota: En caso de que la muestra no se suspenda en su totalidad adicionar la cantidad de buffer que sea necesaria.
- 3) Añadir 20  $\mu\text{L}$  de RNAsa (10 mg/mL), mezclar con la ayuda de un vortex e incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  con una agitación de 450 rpm durante 30 minutos.  
Nota: En caso de ser necesario usar un asa estéril para mezclar la suspensión.
- 4) Añadir 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (20 mg/mL), agitar con el vortex e incubar a  $65^{\circ}\text{C}$  con una agitación de 450 rpm durante 30 minutos.
- 5) Centrifugar durante 20 minutos a 13 200 rpm aproximadamente.
- 6) Trasladar el sobrenadante a un tubo de 2 mL y adicionar cloroformo en una relación 0.7 a 1, agitar con el vortex los tubos durante 15 segundos.
- 7) Centrifugar durante 15 minutos a 13 200 rpm hasta que se separen las fases.
- 8) Trasladar 500  $\mu\text{L}$  de la capa superior a otro tubo de 2 mL que contenga 700  $\mu\text{L}$  de cloroformo y agitar con el vortex.  
Nota: En el caso de que el volumen de la capa superior sea mayor a 500  $\mu\text{L}$ , depositar el volumen restante en cuantos tubos sean necesarios y trabajarlos de manera independiente. En el paso 15 disolver todos los pellets resultantes con el mismo volumen de NaCl.
- 9) Centrifugar durante 15 minutos a 13 200 rpm.
- 10) Trasladar la capa superior a otro tubo nuevo de 2 mL.  
Nota: Cuidar de no trasladar la interfase.
- 11) Añadir 2 volúmenes de solución de precipitación a base de CTAB 0.5X y mezclar con el vortex.
- 12) Incubar a temperatura ambiente por 120 minutos.
- 13) Centrifugar durante 10 minutos a 13,200 rpm.
- 14) Desechar el sobrenadante.
- 15) Disolver el pellet en 350  $\mu\text{L}$  de NaCl 1.2 M y trasladar la mezcla a un tubo de 1.5 mL que contenga 350  $\mu\text{L}$  de cloroformo. Agitar con el vortex durante 15 segundos.
- 16) Centrifugar durante 10 minutos a 13,200 rpm hasta que se separen las fases.
- 17) Trasladar la capa superior a otro tubo de 1.5 mL.  
Nota: Cuidar de no trasladar la interfase.

- 18) Añadir 0.6 volúmenes de isopropanol a -20° C, agita e incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 19) Centrifugar durante 10 minutos a 13,200 rpm.
- 20) Desechar el sobrenadante.
- 21) Añadir  $\mu\text{L}$  de etanol al 70 % a -20° C y agitar con cuidado invirtiendo el tubo repetidas veces.
- 22) Centrifugar durante 10 minutos a 13,200 rpm.
- 23) Desechar el sobrenadante cuidando de no desechar el pellet.
- 24) Colocar los tubos en el evaporador y secar el pellet de ADN durante 10 minutos aproximadamente a 500 atm y 55° C.
- 25) Revisar que el pellet se encuentre completamente seco, de no estarlo, repetir el paso 24 de 5 a 10 minutos.
- 26) Rehidratar el ADN en 100  $\mu\text{L}$  de agua inyectable pre-calentada a 65°C e incubar por 15 min con una agitación de 300 rpm. La solución de ADN puede conservarse en refrigeración (4 °C) por dos meses como máximo, o en el congelador a -20 °C hasta un año.

Durante el desarrollo del proyecto 'Diseño de un plan de monitoreo de presencia de secuencias transgénicas en sitios prioritarios y consolidación del laboratorio de referencia en análisis de OGM', se implementó un protocolo de extracción de ácidos nucleicos que ha mostrado tener una mayor eficiencia en cuanto al tiempo requerido para la extracción de ADN, pero también en cuanto a los rendimientos de concentración de ácidos nucleicos obtenidos por unidad de masa de material de muestra empleado para la extracción. A continuación, se describe el protocolo implementado; el cual está basado en el protocolo modificado de Doyle and Doyle para tejidos vegetales (Doyle, J. J. and Doyle, J. L., 1990). (Anexo 5).

## **5.2 Procedimiento experimental para la extracción de ADN de grano/semilla de maíz**



Se pesaron 400 mg de harina de maíz en tubos de 1.5 mL para cada muestra a analizar. Protocolo de extracción de ADN de tejido vegetal Doyle, J. J. and Doyle, J. L., 1990. El protocolo se describe en el Anexo 5.

- 1) Agregar 1000 uL de Buffer de Extracción precalentado
- 2) Mezclar bien: Invertir el tubo varias veces
- 3) Incubar a 65°C, 1-2hs. Agitar c/15´.
- 4) Desproteínizar con 500 uL de Cloroformo: Octanol (24:1). Mezclar por inversión energética durante 5´.
- 5) Centrifugar 5´ a 12 krpm.
- 6) Tomar con cuidado la fase acuosa (superior) y colocarla en un tubo epp. 2.2 mL
- 7) Centrifugar 10´, 12 krpm
- 8) Tomar el sobrenadante y transferirlo a otro epp. 2.2 mL
- 9) Agregar 0,8 volúmenes de isopropanol frío (i-PrOH)
- 10) Invertir el tubo varias (10) veces
- 11) Centrifugar 5´, 12 krpm
- 12) Descartar sobrenadante con cuidado
- 13) Lavar con 1000 uL de EtOH 70%.
- 14) Centrifugar 1´, 12 krpm
- 15) Descartar sobrenadante con cuidado. Secar en vacuosecador rotatorio (Speed Vac).
- 16) Resuspender en 100 uL H<sub>2</sub>O mQ. Redissolver durante 10 horas en hielo (no olvidar rotular).

**Composición Buffer Extracción (Dellaporta *et al.* 1983)**

Tris.HCl	100 mM pH= 8.0
EDTA	50 mM pH= 8.0
NaCl	0.7 M
CTAB	2%
Beta-mercapto etanol	140 Mm

**Previo al uso:** Incubar buffer de extracción durante 5 minutos a 65°C.

Se añadió 1.5 µL de RNAsa (10mg/mL) al ADN extraído de las muestras para evitar interferencia en las reacciones de amplificación por PCR debido a la

presencia de ARN. El ADN extraído se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000® a las longitudes de onda 260nm y 280nm. Como criterio de pureza y calidad del ADN extraído, debe observarse que la relación de las lecturas de absorbancia arrojadas por el instrumento (260nm/280nm) sea de aproximadamente 1.8 (Thermo Scientific, 2012). A partir de la cuantificación del ADN extraído, se realizaron alícuotas de cada muestra de ADN extraídas, con agua grado mili Q hasta una concentración final de 50 ng/μL, para ser utilizadas en los ensayos de PCR en Tiempo Real. Las extracciones originales de ADN de las muestras obtenidas y las alícuotas generadas a partir de las extracciones originales se rotularon y almacenaron en un congelador a -20°C hasta su uso (Tabla 2).

**Tabla 2.** Cuantificación de ADN de muestras extraídas con los distintos protocolos.

Muestra	Protocolo 'Norma ISO 21571'			Protocolo 'Doyle & Doyle'		
	Concentración (ng/μL)	260/280	260/230	Concentración (ng/μL)	260/280	260/230
2602/16	71.8	1.74	2.74	387	2.19	1.1
2603/16	67.7	1.62	2.78	477.1	2.17	1.42
2604/16	72.4	1.91	2.19	542.6	2.25	1.61
2605/16	68.2	1.77	2.66	408.6	2.16	1.69
2606/16	46.7	2.06	1.78	403.4	2.19	1.51
2607/16	42.8	1.71	3.51	501.2	2.2	1.76
2608/16	50.9	1.69	2.23	421.9	2.19	1.62
2609/16	52.9	2.13	1.45	436.4	2.2	1.96
2610/16	98.7	1.62	2.98	459.3	2.18	1.93
2611/16	45.9	1.64	2.78	558.8	2.19	1.68
2612/16	45.4	2.17	1.58	392.2	2.2	1.64

## **6. Diseño de ensayos y disposición de las muestras que serán analizadas por PCR Tiempo Real**

Con el objetivo de optimizar las cantidades de reactivos utilizados en función del número de muestras por analizar, es recomendable realizar un diseño previo del experimento para la determinación de la presencia de secuencias transgénicas. Para ello, durante el desarrollo de este proyecto, se propone seguir los pasos descritos a continuación:

- Diseñar una plantilla que muestre la distribución física de las muestras en la placa óptima de PCR tiempo real; en la cual se incluyan tanto los controles positivos (Material de Referencia Certificado) y los controles negativos; el blanco (sin ADN molde) y el control negativo proveniente del MCR. Cada muestra se analiza por triplicado en cada experimento.
- Dilución de iniciadores (oligonucleótidos) (directo (Fwd) y reverso (Rev)): Debe ajustarse la concentración de los iniciadores a la concentración predeterminada. En este proyecto, se optimizó la técnica de PCR en tiempo real, que requiere una concentración final de los iniciadores de  $1\mu\text{M}$ .
- Incluir controles en los experimentos de determinación de presencia de secuencias transgénicas a muestras determinadas.
- Tratamiento de las muestras a analizar: antes de la realización de cualquier experimento en PCR tiempo real, es necesario homogenizar las muestras de ADN mediante el uso de un vortex, posteriormente, también se realizará la centrifugación de cada uno de los tubos.

**Nota:** para todos los pasos anteriores, como para los posteriores, es necesario el uso de material estéril y agua destilada estéril o grado Milli-Q.

A continuación, se describen sistemáticamente los pasos para la preparación de un experimento de PCR en Tiempo Real.

## 6.1 Preparación de reacciones para ensayos de PCR en Tiempo Real utilizando *SYBR® Green*

La metodología de este ensayo se descubre en el formato PT-LOGM-EX-02 (Anexo 6). Es necesario mezclar los iniciadores (oligonucleótidos); la mezcla de reacción para PCR en Tiempo Real y el *SYBR® Green* en las proporciones que se muestran en la Tabla 3, en un tubo eppendorf de 1.5 mL previa y debidamente etiquetado (nombre del marcador o evento transgénico a evaluar). El tubo con la mezcla de reacción debe protegerse de la luz (utilizar papel aluminio), debido a que el *SYBR® Green* es fotosensible (Anexo 6).

**Tabla 3.** Cantidades de reactivos usados para ensayos con PCR en Tiempo Real.

	Para un pocillo	Para placa de 48 pocillos	Para placa de 96 pocillos
<b>Mezcla de reacción PCR</b>	1X	50X	100X
<b><i>SYBR® Green</i></b>	3 µl	150 µl	300 µl
<b>Mezcla de iniciadores (oligonucleótidos)</b>	2 µl	100 µl	200 µl
<b>(Dilución final 1µM)</b>			
<b>ROX</b>		0.7 µl	1.4 µl

- Llenado de la placa óptica de PCR en Tiempo Real.

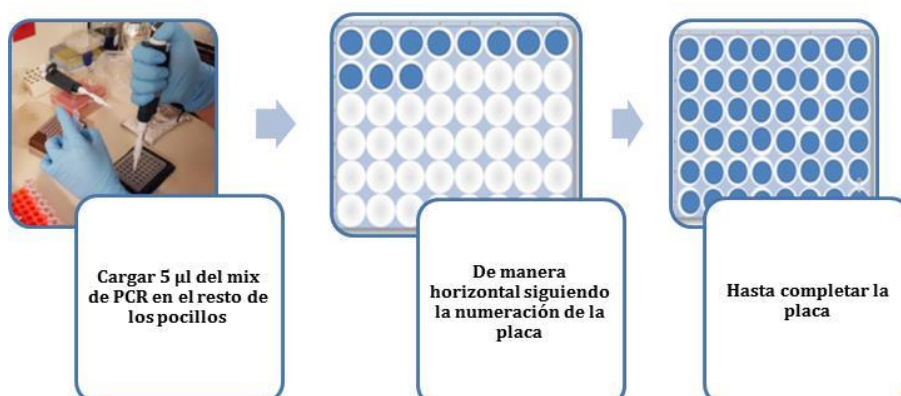
Cubrir la placa de PCR con papel aluminio (ver Figura 7). Adicionar a cada pocillo de la placa 5 µL de la mezcla de reacción previamente preparada. El llenado debe realizarse siguiendo de manera estricta el diseño experimental. Añadir los reactivos de siguiendo la secuencia numérica indicada en la placa (coordenadas A1, después el pocillo A2 y así sucesivamente hasta llegar al pocillo A8 (ver Figura 8). Realizar la misma secuencia con las filas inferiores hasta completar toda la placa (véase Figura 9). Al finalizar el llenado de la placa, realizar un pulso de centrifugación a la placa para que todo la mezcla de reacción se homogeneice en el fondo del pocillo.



**Figura 7.** Placa con pocillos para ensayo de PCR Tiempo Real en base cubierta de papel aluminio.



**Figura 8.** Carga de la mezcla de reacción de PCR en la primera fila.



**Figura 9.** Carga del mix de PCR para el resto de la placa.

**Nota:** Procurar que la placa con la mezcla de reacción esté protegida de la luz en todo momento.

- Adición de muestras a analizar y controles del ensayo:

Colocar las muestras de ADN a analizar por triplicado en la placa de acuerdo al diseño experimental previamente establecido. Para cargar las muestras de ADN problema, se utilizarán las coordenadas de la placa agrupadas en triadas, por ejemplo: en el caso de la muestra 1 (M1), se colocará ésta en los pozos correspondientes a las coordenadas A1, A2 y A3, cambiando la punta a la pipeta entre cada carga de ADN (Figura 10); posteriormente, colocar la Muestra 2 (M2) en los pozos correspondientes a B1, B2 y B3. Por último, se cargan los controles del experimento en la placa óptica de PCR, empezando por cargar el control negativo por triplicado en cada uno de los pocillos asignados, después el blanco y finalmente el control positivo.



**Figura 10.** Carga del ADN molde y los calibradores en la placa.

- Cubrimiento de la placa: se coloca una película plástica sobre la placa, evitando tener contacto para no ensuciarla y que esto obstaculice la lectura en el termociclador. Al final, se centrifuga la placa.

## **6.2 Programa de ciclado en PCR en tiempo real usando la química SYBR® Green para determinar la presencia de secuencias recombinantes**

Realización PCR en tiempo real: para este ejemplo, el ciclado se realizará en un termociclador ABI 7500 PCR System (Applied Biosystems), en cuyo software se introduce el programa de ciclado, que consiste en: un único ciclo de activación de la enzima ADN polimerasa durante 2 min a 50°C y 10 minutos a 95°C; posteriormente, 40 ciclos de amplificación con una duración de 15 segundos a 95°C (fase de desnaturalización), y finalmente se lleva a cabo otro ciclo con duración de 1 minuto a 60°C (*annealing* y extensión). Al finalizar la reacción de amplificación, se efectúa el análisis simultáneo de los parámetros, tales como: la temperatura de *melting* en los productos amplificados, para ello se programarán los siguientes intervalos: 15 segundos a 95°C, 1 min a 60°C y 15 segundos a 95°C.

## **7. Análisis de los datos obtenidos mediante la PCR en Tiempo Real usando la química SYBR® Green para determinar la presencia de secuencias recombinantes**

Los valores obtenidos para cada reacción se normalizaron contra la señal de fluorescencia de la zona de referencia interna ROX (referencia pasiva). El Software StepOne v.2.3 de Applied Biosystems, calcula automáticamente la línea de base y el umbral (*threshold*) para cada reacción, en algunas ocasiones se ajustaron estos parámetros manualmente. Para cada muestra se registró el ciclo umbral (Ct), que corresponde al número de ciclo en el que la fluorescencia generada por el SYBR® Green sobrepasó la línea umbral (*threshold*).

Se establecieron cuatro criterios simultáneos para considerar a una muestra como positiva para la presencia de un marcador transgénico (CaMV 35S o T-NOS y/o algún evento transgénico específico de maíz):

- 1) Cuando la señal de fluorescencia obtenida sobrepasa la línea umbral de detección.

- 2) Cuando se registra una señal detectable en el control positivo y no se observa fluorescencia en el control negativo (blanco).
- 3) Cuando el valor de Ct de la muestra analizada no sobrepasa el ciclo número 36.5 (definido experimentalmente). La señal de fluorescencia detectada en un ciclo (Valor de Ct) posterior podría deberse a la amplificación inespecífica de ADN.
- 4) Cuando el producto de amplificación presenta un único pico de temperatura en la curva de disociación, con un valor de Tm igual al obtenido para el respectivo control positivo. Se toleró una desviación de  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

#### **8. Determinación de la especificidad de los iniciadores usados para identificar los elementos transgénicos CaMVp35S y T-NOS en PCR en Tiempo Real en la etapa de escrutinio de OGMs**

Se evaluó la capacidad de los iniciadores CaMV 35S F/R y T-NOS F/R de amplificar de manera específica la secuencia blanco correspondiente. Se analizaron el material certificado de referencia (MCR): correspondiente a la línea de maíz transgénico Bt11 que contiene tanto la secuencia transgénica CaMV 35S como la T-NOS; la línea de maíz transgénico GA21 que no contiene la secuencia transgénica CaMV 35S pero si la secuencia de T-NOS; la línea de maíz transgénico MON810 que si contiene la secuencia transgénica CaMV 35S pero no la secuencia de T-NOS. Adicionalmente, como controles negativos se incluyó ADN de *Arabidopsis thaliana*, Col-0, y soya transgénica (evento MON89788). Las combinaciones de oligonucleótidos y las muestras de ADN se muestran en la Tabla 4. La disposición de las muestras de ADN a analizar y las combinaciones de oligonucleótidos en la placa se muestran en la Tabla 5 y los resultados del ensayo se presentan en la Tabla 6.



**Tabla 4.** Combinaciones de oligonucleótidos y las muestras de ADN usados en el ensayo de especificidad de los iniciadores usados en PCR en Tiempo Real en la etapa de escrutinio de OGMs.

Material de Referencia	Combinación de iniciadores Fwd/Rev			
Evento	CaMV 35S (Fwd +Rev)	TNOS (Fwd +Rev)	CaMV 35S (Fwd) + TNOS (Rev)	CaMV 35S (Rev) + TNOS (Fwd)
BT11				
GA21				
MON810				

**Tabla 5.** Disposición del experimento para determinar especificidad de los iniciadores usados en PCR en Tiempo Real en la etapa de escrutinio de OGMs. En el diagrama se describen los ADN usados como templados y en colores las combinaciones de iniciadores empleados en cada pocillo (representado en la cuadrícula).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	BT11	BT11	BT11	BT11	BT11	BT11	BT11	BT11	BT11	BT11	BT11	BT11
<b>B</b>	GA 21	GA 21	GA 21	GA 21	GA 21	GA 21	GA 21	GA 21	GA 21	GA 21	GA 21	GA 21
<b>C</b>	MON810	MON810	MON810	MON810	MON810	MON810	MON810	MON810	MON810	MON810	MON810	MON810
<b>D</b>	<i>A. Thaliana</i>	<i>A. Thaliana</i>	<i>A. Thaliana</i>	<i>A. Thaliana</i>	<i>A. Thaliana</i>	<i>A. Thaliana</i>	<i>A. Thaliana</i>	<i>A. Thaliana</i>	<i>A. Thaliana</i>	<i>A. Thaliana</i>	<i>A. Thaliana</i>	<i>A. Thaliana</i>
<b>E</b>	Soya	Soya	Soya	Soya	Soya	Soya	Soya	Soya	Soya	Soya	Soya	Soya
	MON89788	MON89788	MON89788	MON89788	MON89788	MON89788	MON89788	MON89788	MON89788	MON89788	MON89788	MON89788
<b>F</b>												
<b>G</b>	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC
<b>H</b>												

	P35S (Fwd&Rev)
	TNOS (Fwd&Rev)
	P35S (Fwd) TNOS (Rev)
	P35S (Rev) TNOS (Fwd)

**Tabla 6.** Resultados del ensayo de especificidad de especificidad de los iniciadores usados en PCR en Tiempo Real en la etapa de escrutinio de OGMs.

Marcador genético	MUESTRA	Pozo 1		Pozo 2		Pozo 3	
		CT	Tm	CT	Tm	CT	Tm
CaMVP35S (Fw) + TNOS (Rv)	BT11	Indeterminado	70.692	37.05	82.72	Indeterminado	65.346
	GA21	Indeterminado	71.286	Indeterminado	86.284	Indeterminado	87.175
	MON810	Indeterminado	74.85	Indeterminado	84.354	Indeterminado	84.948
CaMVP35S (Rv) + TNOS (Fw)	BT11	29.852	85.096	29.892	84.948	30.279	84.799
	GA21	Indeterminado	73.81	Indeterminado	88.066	Indeterminado	70.395
	MON810	Indeterminado	61.188	Indeterminado	85.69	Indeterminado	61.039
<b>CONTROLES POSITIVOS</b>							
		CT	Tm	CT	Tm	CT	Tm
CaMV P35S (Fw & Rv)	BT11	28.405	75.889	27.886	74.256	27.96	75.889
	MON810	27.948	76.038	27.956	75.889	28.107	76.186
TNOS (Fw & Rv)	BT11	28.889	71.434	29.094	71.583	29.922	71.583
	GA21	24.798	71.583	24.534	71.731	24.341	71.731
<b>CONTROLES NEGATIVOS</b>							
		CT	Tm	CT	Tm	CT	Tm
CaMV P35S (Fw & Rv)	GA21	Indeterminado	75.444	Indeterminado	64.752	Indeterminado	75.295
	<i>A thaliana</i>	Indeterminado	60.594	Indeterminado	76.636	35.134	76.186
	MON89788	Indeterminado	71.434	39.228	75.741	Indeterminado	70.692
	NTC	Indeterminado	64.006	Indeterminado	64.455	Indeterminado	64.009
TNOS (Fw & Rv)	MON810	Indeterminado	63.118	Indeterminado	85.839	Indeterminado	86.878
	<i>Athaliana</i>	35.187	72.028	34.06	71.88	35.932	72.028
	MON89788	Indeterminado	63.564	Indeterminado	61.188	Indeterminado	64.603
	NTC	Indeterminado	61.188	Indeterminado	61.039	Indeterminado	61.188
CaMV P35S (Fw) + TNOS (Rv)	<i>A thaliana</i>	Indeterminado	61.039	Indeterminado	81.087	Indeterminado	61.336
	MON89788	Indeterminado	64.455	Indeterminado	63.118	Indeterminado	64.306
	NTC	Indeterminado	61.93	Indeterminado	88.512	Indeterminado	84.354
CaMV P35S (Rv) + TNOS (Fw)	<i>Athaliana</i>	Indeterminado	61.039	Indeterminado	60.891	Indeterminado	61.039
	MON89788	Indeterminado	89.403	Indeterminado	60.891	Indeterminado	61.336
	NTC	Indeterminado	61.188	Indeterminado	88.66	Indeterminado	61.336

En los casos en los que el ADN molde empleado contiene las secuencias recombinantes blanco (ya sea el promotor 35S del CaMV o TNOS) y la combinación de iniciadores directo (Fwd) y reverso (Rev) específicas para estas secuencias, se detectó amplificación específica (valores de CT y Tm similares y dentro de los criterios de aceptación -CT:  $\pm 10$  ciclos; Tm:  $\pm 1^\circ\text{C}$ ) para cada uno de sus triplicados. Por su parte, los controles negativos no amplificaron y presentaron Tm indeterminada.

En los casos en los que se combinaron primers diseñados para diferente secuencia diana se obtuvieron los resultados esperados. Como ejemplo, en el ensayo en el que se combinaron los iniciadores CaMV P35S (Fwd) + TNOS(Rv), no se detectó amplificación específica. En el caso de la combinación CaMV P35S (Rv) + TNOS (Fwd), solamente el material de referencia para el evento Bt11 amplificó de manera específica en sus tres replicados al compararlo con los valores de CT de las pruebas específicas, sin embargo, los valores de Tm no cumplen el criterio de aceptación, por lo que se considera como una amplificación inespecífica.

### **9. Determinación de la especificidad de los iniciadores para la identificación de los eventos transgénicos específicos de maíz por medio de PCR en Tiempo Real, utilizando la química SYBR® Green**

Se analizó la especificidad de cada juego de iniciadores diseñados para amplificar de manera específica los eventos transgénicos específicos de maíz NK603, MON810, TC1507, GA21, Bt11, Bt176, DAS59122, MIR604, MON88017, MON89034, MIR162. Se realizaron los ensayos sobre los materiales de referencia correspondientes a cada par de iniciadores, sobre las demás líneas transgénicas, así como sobre líneas no GM (blancos) y sobre los controles negativos de PCR (sin ADN) para determinar la presencia de dímeros de iniciadores y analizar la señal de base de fluorescencia, así como para identificar posibles falsos positivos.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un equipo ABI 7500 PCR System (Applied Biosystems), en un volumen final de 7µL, conteniendo: 2µL de ADN (50ng/µL), 3µL de SYBR® Green PCR Mastermix con ROX (Life Technologies, Thermo Scientific), 5mM de cada iniciador. El programa de ciclado consta de: un ciclo de activación de la enzima ADN polimerasa de 2 minutos a 50°C y posteriormente 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificación de 15 segundos a 95°C (desnaturalización) y 1 minuto a 60°C (*annealing* y extensión). Adjunto al ciclado de amplificación, se programa un ciclo para las curvas de fusión (*melting curve*) de los productos obtenidos. Se concreta un ascenso de temperatura desde 60°C a 95°C y se recolectan los datos de intensidad de fluorescencia cada minuto.

En la Tabla 7 se presentan las secuencias de los iniciadores (oligonucleótidos) utilizados en esta etapa del proyecto para la optimización de los ensayos de especificidad de los iniciadores para identificación de los eventos transgénicos específicos por medio de PCR en Tiempo Real.

**Tabla 7.** Secuencias de oligonucleótidos empleados para la identificación de los eventos transgénicos específicos de maíz.

<b>Nombre</b>	<b>SECUENCIA 5'-3'</b>	
<b>NK603</b>	Fwd	ATG AAT GAC CTC GAG TAA GCT TGT TAA
	Rev	AAG AGA TAA CAG GAT CCA CTC AAA CAC T
<b>MON810</b>	Fwd	TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CGT
	Rev	GCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT
<b>TC1507</b>	Fwd	TAG TCT TCG GCC AGA ATG G
	Rev	CTT TGC CAA GAT CAA GCG
<b>GA21</b>	Fwd	CTTATCGTTATGCTATTTGCAACTTTAGA
	Rev	TGGCTCGGATCCTCCT
<b>Bt11</b>	Fwd	GCG GAA CCC CTA TTT GTT TA
	Rev	TCC AAG AAT CCC TCC ATG AG
<b>Bt176</b>	Fwd	TGT TCA CCA GCA GCA ACC AG
	Rev	ACT CCA CTT TGT GCA GAA CAG ATCT
<b>DAS59122</b>	Fwd	GGG ATA AGC AAG TAA AAG CGC TC
	Rev	CCT TAA TTC TCC GCT CAT GAT CAG
<b>MON88017</b>	Fwd	GAG CAG GAC CTG CAG AAG CT
	Rev	TCC GGA GTT GAC CAT CCA
<b>MON89034</b>	Fwd	TTC TCC ATA TTG ACC ATC ATA CTC ATT
	Rev	CGG TAT CTA TAA TAC CGT GGT TTT TAA A
<b>MIR162</b>	Fwd	GCGCGGTGCATCTATGTTACTAG
	Rev	TGCCTTATCTGTTGCCTTCAGA

Para el ensayo de especificidad de los iniciadores para identificación de los eventos transgénicos específicos de maíz por medio de PCR en Tiempo Real se diseñó el experimento de acuerdo a la Tabla 8.

**Tabla 8.** Disposición del experimento para determinar especificidad de los iniciadores empleados en PCR en Tiempo Real con química *SYBR® Green* para identificación de los eventos transgénicos específicos de maíz. En el diagrama se describen los ADN usados como templados y en colores las combinaciones de iniciadores empleados en cada pocillo (representado en la cuadrícula).

	EVENTO 1			EVENTO 2			EVENTO 3					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Bt11	Bt11	Bt11	MON89034	MON89034	MON89034	MON810	MON810	MON810	Bt176	Bt176	Bt176
<b>B</b>	Ga21	Ga21	Ga21	MIR162	MIR162	MIR162	MON88017	MON88017	MON88017	DAS59122	DAS59122	DAS59122
<b>C</b>	NK603	NK603	NK603	Bt11	Bt11	Bt11	MON89034	MON89034	MON89034	MON810	MON810	MON810
<b>D</b>	TC1507	TC1507	TC1507	Ga21	Ga21	Ga21	MIR162	MIR162	MIR162	MON88017	MON88017	MON88017
<b>E</b>	Bt176	Bt176	Bt176	NK603	NK603	NK603	Bt11	Bt11	Bt11	MON89034	MON89034	MON89034
<b>F</b>	DAS59122	DAS59122	DAS59122	TC1507	TC1507	TC1507	Ga21	Ga21	Ga21	MIR162	MIR162	MIR162
<b>G</b>	MON810	MON810	MON810	Bt176	Bt176	Bt176	NK603	NK603	NK603	CN	CN	CN
<b>H</b>	MON88017	MON88017	MON88017	DAS59122	DAS59122	DAS59122	TC1507	TC1507	TC1507	NTC	NTC	NTC

En la Tabla 9 se presentan los resultados obtenidos para el ensayo de especificidad de los iniciadores usados para la identificación de eventos transgénicos específicos de maíz por medio de PCR en Tiempo Real. En los casos de combinación de los iniciadores específicos para un evento transgénico y el ADN molde del mismo evento (recuadros azules) tanto los valores de Ct como de Tm obtenidos son distintos al resto de combinaciones de iniciadores, lo que indica la especificidad de la combinación.

**Tabla 9.** Resultados del ensayo para determinar especificidad de los iniciadores usados para la identificación de eventos transgénicos específicos de maíz por medio de PCR en Tiempo Real, utilizando la química del fluoróforo *SYBRGreen*.

Material de Referencia		Combinación de iniciadores F/R INECC																					
Evento	%GM (m/m)	BT176		NK603		TC1507		GA21		BT11		MON810		59122		MON88017		MON89034		MIR162		MIR604	
		Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm
<b>BT176</b>	5	24.51	80.33	Ind	63.53	35.68	81.76	34.11	80.01	37.08	82.40	37.08	80.85	34.73	72.11	33.62	74.86	Ind	68.26	Ind	84.74	Ind	67.52
<b>NK603</b>	4.91	33.78	82.26	29.10	79.76	34.15	85.94	35.44	71.15	Ind	80.96	35.48	80.55	33.98	75.29	34.52	74.07	Ind	70.55	Ind	84.89	Ind	69.89
<b>TC1507</b>	9.86	33.52	81.72	37.89	66.27	25.72	77.52	34.82	71.00	34.55	84.25	33.97	80.15	36.18	72.56	34.34	78.06	Ind	78.77	Ind	76.38	Ind	70.48
<b>GA21</b>	>99.98	35.44	80.63	Ind	69.81	35.88	82.35	24.18	82.15	Ind	69.51	36.97	82.29	33.50	79.71	32.90	73.08	Ind	72.35	Ind	81.51	Ind	82.29
<b>BT11</b>	4.89	34.05	80.09	36.34	66.02	34.18	79.72	35.45	70.32	26.68	71.10	35.54	81.40	37.64	71.27	32.56	76.68	Ind	86.04	Ind	82.01	Ind	68.36
<b>MON810</b>	9.9	33.70	72.73	36.26	71.80	35.11	76.18	34.30	68.51	Ind	68.46	27.26	76.03	36.57	67.30	33.70	74.17	Ind	61.29	Ind	71.40	Ind	78.65
<b>59122</b>	9.87	35.70	76.73	38.21	66.57	37.44	81.31	33.69	71.30	Ind	73.34	Ind	75.74	26.13	75.49	33.37	78.95	Ind	61.29	Ind	72.50	Ind	70.18
<b>MON88017</b>	>99.05	33.60	79.20	38.13	68.66	35.22	83.15	34.27	71.61	Ind	82.60	38.59	77.13	34.72	75.29	22.81	78.76	36.94	64.73	36.04	80.56	36.03	61.37
<b>MON89034</b>	>99.42	33.98	78.85	35.36	73.64	35.12	76.58	33.83	71.15	Ind	77.97	Ind	80.65	34.27	71.37	32.84	78.41	24.96	71.80	Ind	79.76	Ind	65.90
<b>MIR162</b>	>99.98	34.16	79.55	Ind	69.31	34.58	82.85	33.78	71.26	32.41	71.02	36.55	80.11	33.37	73.25	32.63	77.28	Ind	61.34	25.05	77.87	25.05	69.49
<b>MIR604</b>	9.85																					26.88	77.17

Ind: Valor indeterminado (nulo) debido a la inexistencia de la amplificación específica, debida a la combinación de iniciadores y ADN molde

## **10. Detección del gen endógeno de maíz *hmgA* por PCR en Tiempo Real utilizando la química *SYBR® Green***

Para confirmar la presencia de ADN de maíz de la muestra bajo análisis y para descartar la presencia de inhibidores de la PCR en Tiempo Real, se amplificó por PCR tiempo real el gen endógeno *hmgA* (High Mobility Group proteins) en cada muestra.

El gen *hmgA* codifica para una proteína del grupo de alta movilidad de maíz, y se ha demostrado que dicho gen está presente en el genoma haploide de maíz en una sola copia. Aunque esto podría ser una desventaja cuando se utilizan plásmidos como moléculas de referencia, se han desarrollado metodologías, como la PCR en Tiempo Real en donde el gen *hmgA* se ha seleccionado como un gen de referencia endógeno de maíz en muchos de los protocolos validados por la European Commission para la detección de secuencias transgénicas en maíz y sus derivados (Salvi *et al.*, 2008).

Las reacciones de PCR en Tiempo Real se efectuaron en un volumen total de 7 µl, conteniendo: 2 µl de ADN molde (50ng/µl), 2 µl de mezcla de iniciadores (1 µM), que está compuesto por Iniciador directo (2µM) e iniciador reverso (2µM), cada uno específico al evento a analizar; y 3 µl de *SYBR® Green* PCR Mastermix con ROX (Life Technologies, Thermo Scientific).

## **11. Determinación de la especificidad de los iniciadores para la identificación de los eventos transgénicos específicos de maíz por medio de PCR en Tiempo Real, utilizando la química *TaqMan®***

Usando la química *TaqMan®* se determinó la especificidad de cada juego de iniciadores y sondas diseñados para amplificar los eventos transgénicos específicos de maíz NK603, MON810, TC1507, GA21, Bt11, Bt176, DAS59122, MIR604, MON88017, MON89034, MIR162, MIR604. Los ensayos se realizaron sobre los materiales de referencia correspondientes a cada par de iniciadores, sobre las demás líneas transgénicas, así como sobre líneas no GM (blancos) y sobre los controles negativos de PCR (sin ADN).



Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un equipo ABI 7500 PCR System (Applied Biosystems). Los iniciadores correspondientes para cada se diluyeron a una concentración de 10 ng/ $\mu$ L. La sonda utilizada en cada ensayo correspondió a una secuencia complementaria del evento transgénico a identificar más el extintor (Quencher) TAMRA, esta se diluyó a una concentración de 5 ng/ $\mu$ L. A su vez, el ADN templado se preparó a una concentración de 50 ng/ $\mu$ L. En la Tabla 10 se muestran los oligonucleótidos sonda empleados en PCR-tiempo real con sistema *TaqMan*<sup>®</sup>

**Tabla 10.** Secuencias de los oligonucleótidos sonda empleados en PCR-tiempo real con química *TaqMan*<sup>®</sup>.

Nombre	Secuencia 5'-3'
NK603-Fwd <i>TaqMan</i>	atgaatgacctcgagtaagcttgtaa
NK603-Rev <i>TaqMan</i>	aagagataacaggatccactcaaact
NK603-PT <i>TaqMan</i>	[FAM]tggtaccacgcgacacttccactc[TAMRA]
MON810-Fwd <i>TaqMan</i>	tccaaggaacgaaggacttaactg
MON810-Rev <i>TaqMan</i>	gccaccttcttttccactatctt
MON810-PT <i>TaqMan</i>	[FAM]aacatcctttgccattgccagc[TAMRA]
TC1507-Fwd <i>TaqMan</i>	tagtcttcggccagaatgg
TC1507-Rev <i>TaqMan</i>	ctttccaagatcaagcg
TC1507-PT <i>TaqMan</i>	[FAM]taactcaaggccctcactccg[TAMRA]
GA21-Fwd <i>TaqMan</i>	cttatcgttatgctatttgcaactttaga
GA21-Rev <i>TaqMan</i>	tggtcgcgatcctct
GA21-PT <i>TaqMan</i>	[FAM]catataactcatatcttttctcaacagcaggtggg[TAMRA]
Bt11-Fwd <i>TaqMan</i>	gcggaaccctattgttta
Bt11-Rev <i>TaqMan</i>	tccaagaatccctccatgag
Bt11-PT <i>TaqMan</i>	[FAM]aaatacattcaaatatgtatccgctca[TAMRA]
Bt176-Fwd <i>TaqMan</i>	tggtcaccagcagcaaccag
Bt176-Rev <i>TaqMan</i>	actccactttgtgcagaacagatct
Bt176-PT <i>TaqMan</i>	[FAM]ccgacgtgaccgactaccacatcga[TAMRA]
Das59122-Fwd <i>TaqMan</i>	gggataagcaagtaaaagcgctc
Das59122-Rev <i>TaqMan</i>	ccttaattctccgctcatgatcag
Das59122-PT <i>TaqMan</i>	[FAM]tttaaactgaaggcgggaaacgaca[TAMRA]
MIR604-Fwd <i>TaqMan</i>	ggcacgcaattcaacag
MIR604-Rev <i>TaqMan</i>	ggtcataacgtgactcccttaattct
MIR604-PT <i>TaqMan</i>	[FAM]aggcgggaaacgacaatctgatcatg[TAMRA]
MON88017-Fwd <i>TaqMan</i>	gagcaggacctgcagaagct
MON88017-Rev <i>TaqMan</i>	tccggagttgacctcca
MON88017-PT <i>TaqMan</i>	[FAM]tcccgccttcagtttaaacagatcgggt[TAMRA]
MON89034-Fwd <i>TaqMan</i>	ttctcatattgacctcactcatt
MON89034-Rev <i>TaqMan</i>	cggtatctataatccgtggttttaaa
MON89034-PT <i>TaqMan</i>	[FAM]atccccggaattatgtt[MGBNFQ]
MIR162-Fwd <i>TaqMan</i>	gcgcggtgtcatctatgttactag
MIR162-Rev <i>TaqMan</i>	tgcttatctgttcctcaga
MIR162-PT <i>TaqMan</i>	[FAM]tctagacaattcagatcattaaaaactcggcca[TAMRA]

En la Tabla 11 se muestran los volúmenes de reactivos usados en los ensayos en los que se realizó la reacción de PCR-tiempo real en dos volúmenes distintos: 25  $\mu\text{L}$  y 15  $\mu\text{L}$ . Los volúmenes mostrados corresponden a un solo pocillo, por lo que se multiplicó el número de pozos utilizados en cada placa para previamente preparar el volumen total requerido por ensayo. En las Tablas 12 y 13 se muestran los resultados de Ct obtenidos para cada una de las combinaciones de iniciadores específicos y los materiales certificados correspondientes utilizando dos volúmenes totales diferentes: 25  $\mu\text{L}$  y 15  $\mu\text{L}$ .

**Tabla 11.** Volúmenes de reactivos empleados en la determinación de la especificidad de los iniciadores para la identificación de los eventos transgénicos específicos de maíz por medio de PCR en Tiempo Real, utilizando la química *TaqMan*<sup>®</sup>.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen total de reacción:</b>	<b>Volumen total de reacción 15</b>
	<b>25 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b><math>\mu\text{L}</math></b>
	<b>(<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>(<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Agua	7.5	4.2
<i>TaqMan</i> Real-Time PCR Master Mix	12.5	8.2
Iniciador Forward	0.375	0.225
Iniciador Reverse	0.375	0.225
Sonda	0.25	0.15
DNA (muestra)	4	2
<b>TOTAL (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>25</b>	<b>15</b>

**Tabla 12.** Resultados de los valores de Ct obtenidos en los ensayos de especificidad de los oligonucleótidos sonda con los materiales de referencia certificados correspondientes a los eventos transgénicos analizados por medio de PCR-tiempo real, empleando química *TaqMan*® en un volumen de reacción de 25 µL.

Material de Referencia		Juego de cebadores F/R y sonda <i>TaqMan</i> INECC (25 µL)										
Evento	%GM (m/m) (100ng ADN)	BT176	NK603	TC1507	GA21	BT11	MON810	59122	MON88017	MON89034	MIR162	MIR604
		Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
<b>BT176</b>	5	30.546	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
<b>NK603</b>	4.91	Ind	36.727	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
<b>TC1507</b>	9.86	Ind	Ind	32.662	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
<b>GA21</b>	>99.98	Ind	Ind	Ind	35.242	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
<b>BT11</b>	4.89	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
<b>MON810</b>	9.9	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	35.715	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
<b>59122</b>	9.87	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	30.546	Ind	Ind	Ind	Ind
<b>MON88017</b>	>99.05	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	29.163	Ind	Ind	Ind
<b>MON89034</b>	>99.42	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	30.965	Ind	Ind
<b>MIR162</b>	>99.98	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	31.726	Ind
<b>MIR604</b>	9.85	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	29.19

Ind: Valor indeterminado (nulo) debido a la inexistencia de la amplificación específica, debida a la combinación de iniciadores y ADN molde

**Tabla 13.** Resultados de los valores de Ct obtenidos en los ensayos de especificidad de los oligonucleótidos sonda con los materiales de referencia certificados correspondientes a los eventos transgénicos analizados por medio de PCR-tiempo real, empleando química *TaqMan*® en un volumen de reacción de 15 µL.

Material de Referencia		Juego de cebadores F/R y sonda <i>TaqMan</i> INECC (15 µL)										
Evento	%GM (m/m) (100ng ADN)	BT176	NK603	TC1507	GA21	BT11	MON810	59122	MON88017	MON89034	MIR162	MIR604
		Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
<b>BT176</b>	5	32.79	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
<b>NK603</b>	4.91	Ind	35.873	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
<b>TC1507</b>	9.86	Ind	Ind	33.018	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
<b>GA21</b>	>99.98	Ind	Ind	Ind	34.871	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
<b>BT11</b>	4.89	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
<b>MON810</b>	9.9	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	36.206	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
<b>59122</b>	9.87	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	34.13	Ind	Ind	Ind	Ind
<b>MON88017</b>	>99.05	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	30.231	Ind	Ind	Ind
<b>MON89034</b>	>99.42	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	36.404	32.261	Ind	Ind
<b>MIR162</b>	>99.98	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	31.489	Ind
<b>MIR604</b>	9.85	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	32.131

Ind: Valor indeterminado (nulo) debido a la inexistencia de la amplificación específica, debida a la combinación de iniciadores y ADN molde

**12. Reunión de expertos en maíz para la definición de criterios para el establecimiento de zonas o regiones prioritarias de muestreo para el monitoreo de la presencia de transgenes en poblaciones de maíz nativo, así como criterios para implementar una estrategia de muestreo**

**Sede:** Centro de Ciencias de la Complejidad, UNAM, Ciudad Universitaria.

**Día:** 13 de febrero de 2017.

**Asistentes:**

Dr. Antonio Serratos Hernández, UACM

Dr. Alejandro Espinosa Calderón, INIFAP

Dr. Eckart Boege Schimdt, INAH

Dr. Osva Montesinos, Universidad de Colima

Dra. Carolina Ureta Sánchez Cordero, UNAM

Dr. José Luis Chávez Servia, CIIDIR Oaxaca

Dr. Fernando Castillo, COLPOS

Dr. Ángel Kato Yamakake, COLPOS

Dr. Emmanuel González Ortega, UNAM

Dra. Ma. Elena Álvarez-Buylla Roces, UNAM

Dra. Alma Piñeyro Nelson, UAM-X

Pas. De Ing. Agr. Yair Rodríguez de la Peña, UAM-X

Pas. De Ing. Agr. Emilio Ramírez Araujo, UAM-X

Pas. De Quim. Al. Elsa Gómez Hernández UNAM

Pas. De Quim. Al. Eduardo Monterrubio Vázquez, UNAM

## **Relatoría de la reunión con expertos**

La presente relatoría está dividida en tres fases con la finalidad de brindar una mayor claridad en la lectura de los resultados obtenidos del encuentro llevado a cabo con los expertos convocados.

### **Etapas I.** Presentación de los expertos y planteamiento de los objetivos.

En esta etapa, se establecieron las bases necesarias para generar un eje primario de discusión, enfocado principalmente al abordaje de los temas pertinentes para establecer criterios de prioridad en la elección de sitios prioritarios o relevantes para muestrear maíz y posteriormente analizarlo para detectar la presencia de secuencias recombinantes. A través de las diversas intervenciones de los expertos participantes, se revisó el panorama general sobre la historia y situación actual del biomonitoreo de transgenes en el maíz en México desde la primera evidencia sobre secuencias transgénicas en variedades nativas de maíz en Oaxaca en el año 2001.

Se señalaron las principales fuentes de entrada y dispersión de transgenes hacia las variedades nativas mexicanas tales como la importación de maíz desde los Estados Unidos –en donde no hay segregación entre el maíz transgénico y el convencional- y a las variedades híbridas comerciales que potencialmente podrían contener secuencias transgénicas. De manera importante, se mencionó que deben considerarse las rutas de movimiento de granos, a las empresas que realizan acopio de granos y a los programas gubernamentales de asistencia social, como puntos de recolección de muestras para monitoreo.

Adicionalmente se mencionó la importancia de monitorear la presencia de secuencias recombinantes en los parientes silvestres del maíz, por ejemplo, teocintle. También se mencionó que es esencial el contemplar un mayor esfuerzo de monitoreo en las áreas de mayor riqueza biocultural de México, que son áreas en las que históricamente ha coincidido la diversidad biológica con la convivencia de los pueblos

nativos mexicanos y en esta coexistencia se ha generado una gran proporción de la diversidad del maíz mexicano conocida actualmente. Como un punto potencial de dispersión de transgenes en zonas de siembra de maíz en el territorio nacional, se mencionó que deben considerarse áreas de simpatria entre variedades de maíz nativo y maíz híbrido que sea potencialmente transgénico. De manera esencial, se comentó la importancia de considerar la situación socioeconómica actual en cuanto a la siembra de maíz en México.

Estas consideraciones permitieron proponer posibles rutas críticas para cumplir los objetivos del proyecto con el Laboratorio de Análisis de Organismos Genéticamente Modificados del INECC en cuanto a la elaboración de una estrategia de muestreo y la elección de zonas prioritarias.

**Etapas II.** Planteamiento de criterios fundamentales para establecer las zonas prioritarias de biomonitorio en México.

En esta etapa se sentaron las bases para generar criterios válidos articulados entre sí, que incluyeran los aspectos mencionados anteriormente, con el fin de llevar a cabo la construcción de un modelo de monitoreo, el cual tuviese dos características deseables: a) la robustez estadística adecuada y la capacidad de obtener resultados representativos de las diferentes regiones a muestrear y b) una buena viabilidad logística, para poder ser implantado en las zonas que se determinen como prioritarias para levantar un muestreo, a partir de esta sesión.

Como abordaje de esta etapa, se discutieron trabajos previos que permitieron vislumbrar los retos y desafíos que implicaba el escoger o prescindir de ciertos criterios. A través de las diferentes intervenciones de los expertos se definieron algunos parámetros básicos que tuvieran potencial para satisfacer los requerimientos de eficiencia estadística y que permitieran no sólo hacer un diagnóstico de la actual situación nacional, sino que tuvieran la capacidad de incluir variables temporales y

secuenciadas, de tal manera que eventualmente permitan la construcción de modelos predictivos a través de un adecuado diseño metodológico.

Se definieron tres aspectos fundamentales que son complementarios entre sí para entender las dinámicas de flujo y movimiento de los transgenes en el territorio nacional. Estos aspectos son:

- I. Fuente: esto se refiere a los puntos de entrada de grano de maíz de importación al territorio nacional, bajo la lógica de que la introducción de dicho maíz, es potencialmente uno de los orígenes principales de flujo de transgenes a través de grano/semilla hacia las comunidades rurales del país. Este rubro se encuentra conformado por los siguientes elementos:
  - A) Puertos de entrada.
  - B) Vías de transporte terrestre.
  - C) Centros de acopio de semilla (nacional y/o importada).
  - D) Puntos de venta de grano de importación.
  - E) Semillas de maíz híbrido sembrados en nuestro país (no se conoce sobre la existencia de datos o antecedentes de biomonitoreo)
  - F) Programas de asistencia social gubernamentales
  
- II. Destino: en este rubro, están consideradas todas las regiones donde se siembre maíz, en particular variedades nativas (consideradas como *sumideros*), focalizando especialmente a todas aquellas zonas que tienen una alta diversidad biocultural, o bien, zonas con un alto índice de siembra y conservación del maíz nativo.
  
- III. Zonas de simpatría: a *grosso modo*, la simpatría contempla aquellos puntos geográficos donde dos especies o más son capaces de encontrarse entre ellas, en este sentido y ligado al propósito del biomonitoreo, las zonas de simpatría consideradas, corresponderán a los espacios geográficos que se encuentran entre las zonas fuente del maíz (puertos de entrada, vías de transporte, puntos de venta y lugares de siembra de semilla híbrida de maíz) y las poblaciones aledañas en las



cuales existen comunidades que siembren maíz nativo (sumideros o zonas con alta diversidad biocultural).

Los aspectos anteriormente mencionados deberán entrecruzarse con distintas capas geográficas, sociales, biológicas y culturales y ser plasmadas en representaciones cartográficas. Además, se acordó acumular los datos previos que se tienen acerca de los diferentes esfuerzos de biomonitoreo que han sido llevados a cabo en el territorio nacional, integrando también la información referida a las rutas comerciales que sigue el maíz de importación.

Articulando dichos datos, se delimitarán las zonas prioritarias de muestreo a nivel nacional, donde cabe destacar que con base en la unificación de los datos recabados y con el apoyo de los expertos en cartografía, se pretenden generar polígonos geográficos con diversos indicadores útiles para llevar a cabo el biomonitoreo de manera más eficaz.

Los datos necesarios para establecer de manera sistemática los criterios que definan las zonas prioritarias para ser muestreadas y posteriormente determinar la presencia de transgenes en maíz son:

- a) Riqueza y distribución de variedades nativas de maíz en México.
- b) Distribución de las zonas de siembra de variedades mejoradas de maíz en México.
- c) Tipos de sistemas agrícolas.
- d) Presencia de grupos indígenas con producción de maíz.
- e) Puntos de venta de semilla mejorada.
- f) Puntos de entrada de grano importado, centros de acopio y vías de distribución.
- g) Registros previos que documenten la presencia de maíz transgénico en diferentes partes del país.

Con base en un análisis cartográfico detallado en el que se incorporen los datos disponibles que sean considerados sean utilizados como capas, se definirán las zonas

prioritarias a ser muestreadas para la detección de transgenes, en función de que los criterios considerados estén mayormente representados en una región particular de México.

**Etapa III.** Sugerencia de estrategias viables para llevar a cabo un muestreo representativo.

Una vez definidos los parámetros considerados importantes para inferir de manera sistemática las zonas donde será prioritario llevar a cabo esfuerzos de biomonitorio, se pasó a discutir los criterios para llevar a cabo un muestreo a nivel nacional.

Se planteó la necesidad de trabajar a dos escalas: una a nivel nacional, desarrollando un esquema de muestreo estratificado que sea similar a la Encuesta Nacional a Hogares Rurales (ENHRUM), aplicada a finales de 2002 y principios del 2003. En esta encuesta, se dividió al país en 5 regiones con base a criterios sociales, económicos y demográficos recabados de las bases de datos del INEGI. A su vez, durante el esfuerzo de levantamiento de la encuesta se colectó semilla de maíz, que posteriormente fue analizada para determinar la presencia de transgenes (Dyer *et al.*, 2009). Dado que estos resultados fueron publicados, sirven de referente histórico que permitirá contrastar lo que eventualmente se encuentre y a su vez, establecer posibles vías de entrada y diseminación de semilla transgénica en las diferentes regiones del país. Una diferencia que se implementará en este nuevo diseño experimental, será modificar el número de mazorcas/semilla colectadas por lote de semilla disponible, con el fin de obtener muestras representativas de cada acervo de semillas que permitan realizar un estimado de frecuencias por unidad productiva (familia) colectada.

Los estratos del muestreo preliminarmente propuestos fueron: región, localidad, manzana, casa, lote de semilla, mazorca, siendo esta última la unidad propuesta de muestreo. De tal manera que se busca obtener al menos 10 mazorcas (idealmente 20) de cada variedad cultivada por el agricultor consultado. Estos

estimados del tamaño de la submuestra de maíz a tomar por lote de semilla considerado serán ajustados con base en un análisis del número de elementos y otros parámetros de genética de poblaciones.

Se destacó la necesidad de generar un índice matemático que permita ponderar la vulnerabilidad y contribución al muestreo total de estas comunidades. Dicho índice, puede ser interpretado como un peso estadístico asignado de acuerdo al tamaño de la localidad muestreada y otras variables a considerar que deben definirse en su construcción.

### **13. Formato de colecta de muestras de semillas de poblaciones de maíz nativo, híbridos comerciales y parientes silvestres de maíz**

Se diseñó un formato de colecta de muestras de semillas que contempla la obtención de información concerniente a diferentes variedades de maíz nativo, maíz híbrido, parientes silvestres del maíz. Se contempla obtener información sobre la ubicación geográfica de obtención de la muestra, el área en el que la muestra obtenida se siembra, la cantidad de grano/semilla muestreada, características de la mazorca de la cual se obtienen los granos (forma, número de hileras, número de granos por hilera, diámetro y longitud del olote, etc).

Nombre completo del colector: \_\_\_\_\_

Iniciales: \_\_\_\_\_ Institución de adscripción del colector: \_\_\_\_\_

Fecha de colecta: \_\_\_\_\_ N° de Encuesta \_\_\_\_\_

<b>Datos del agricultor</b>	Nombre		<b>Datos geográficos</b>	Estado	Municipio	Localidad:	Comunidad:
	Género M ( ) F ( )	Edad		Domicilio	G. indígena	<b>Datos del sitio de colecta</b>	Predio agrícola
					Troje		
					Bodega		Geolocalización
<b>Hábitat</b>	Llanura ( ) Valle ( ) Cuenca ( ) Meseta ( ) Ladera ( ) Colina ( ) Barranca ( ) Montaña ( ) Otro ( ) Especifique:				Mercado		<b>N</b>
					Otro	<b>W</b>	
					Especifique:	<b>msnm</b>	
¿Cuántas variedades diferentes de maíz cultiva?							
¿Cuáles son?							
Nombre local/común por variedad							
<b>Tamaño de la muestra</b>			Cantidad de Mazorcas		Granos de semilla		Cantidad de plantas
<b>Área sembrada</b>	( ) Km <sup>2</sup>		( ) Ha	( ) m <sup>2</sup>			
<b>Cantidad de semilla sembrada</b>	( ) Bultos ( ) Mazorcas ( ) Granos de semilla ( ) Otra unidad Especifique:						
<b>Uso de la producción</b>	Grano ( ) Nixtamal ( ) Forraje ( ) Combustible ( ) Hoja ( ) Otro:						
<b>Destino de la</b>	Venta en mercado ( ) Especifique el tipo de mercado:			Autoconsumo ( )		Ambos ( ) Especifique porcentaje:	

<b>producción</b>			Venta % Autoconsumo %
<b>Tipo de variedad</b>	Nombre	¿Cultivada por cuantos años?	Procedencia
Producida por el Agricultor			
Variedad Mejorada (o comprada)			
Introducida			
Mezcla de variedades (Especifique los nombres)			
Otro ( ) Especifique:			
<b>Datos fenológicos</b>	Rendimientos:	Época de Siembra	Época de Floración
		E F M A M J J A S O N D n e a b a u u g e c o i e b r r y n l o p t v c	E F M A M J J A S O N D n e a b a u u g e c o i e b r r y n l o p t v c
¿Ha cambiado las fechas por variaciones en el temporal? SI ( ) No ( ) Especifique cambios:		Época de Madurez	Época de Cosecha
		E F M A M J J A S O N D n e a b a u u g e c o i e b r r y n l o p t v c	E F M A M J J A S O N D n e a b a u u g e c o i e b r r y n l o p t v c
<b>Método de siembra</b>	Mecanizado ( ) Tracción animal ( ) Otro:		
<b>Sistema de siembra</b>	Monocultivo ( ) Policultivo ( ) Especifique los cultivos Asociados:		
¿Fertiliza el suelo de siembra de maíz?	Si( ) No( )	¿Qué fertilizante usa?:	
¿Utiliza algún herbicida?	Si( ) No( )	¿Qué tipo de herbicida?:	
¿Utiliza algún plaguicida?	Si( ) No( )	¿Qué tipo plaguicida?:	
<b>Riego</b>	Especificar detalles:		
¿Qué características le gustan de la variedad?			

¿Qué características <b>NO</b> le gustan de la variedad?						
¿Continuará produciendo esta variedad? Si ( ) No ( ) ¿Por qué?:						
<b>Características morfo-fisiológicas básicas de la variedad</b>						
Altura de la planta	cm	Cantidad de ramas en inflorescencia			Central:	Laterales:
Color de estigmas:		Color de anteras:			Color de granos:	
<b>Resistencias y susceptibilidades</b>	Resistente		Susceptible		Lo desconoce ( )	
	Género	Especie	Subespecie	Raza	Raza secundaria	
Nombre del determinador (incluir iniciales):				Fecha de determinación:		
<b>Mazorca</b>		<b>Granos</b>			<b>Presencia de híbridos naturales</b>	
Forma					Si ( ) No ( )	
Número de hileras		Color		Maíz <i>tripsacum</i> ( )		
Granos por hilera		Textura		Maíz <i>teocintle</i> ( )		
				Características:		

Diámetro de olote		Ancho en mm		
Longitud en cm		Longitud en mm		
Diámetro en cm		Grosor en mm		
Longitud/Diámetro		Ancho/Longitud		
Color de olote		Peso de 100 granos		g

#### **14. Formato de encuesta orientada a obtener información geográfica, agronómica, socioeconómica de los sitios de colecta de muestras**

Se ha diseñado un formato de encuesta que puede ser aplicada a diferentes tipos de productores agrícolas (desde el nivel de producción para autoconsumo, producción agroecológica, hasta sistemas productivos agrícolas intensivos). La propuesta de formato contiene preguntas para obtener información sobre la propiedad del terreno de siembra y extensión del mismo; también solicita información sobre el tipo de manejo agrícola que se realiza en el terreno de siembra; si se poseen acervos de semilla o si se utilizan paquetes tecnológicos que incluye la utilización de semillas modificadas genéticamente. El formato de encuesta contempla también preguntas sobre el destino de la producción agrícola: si esta se destina para el mercado, para la alimentación de animales de crianza, etc. Y también contempla la obtención de

información sobre el valor económico del cultivo o cultivos que maneje el productor agrícola.

### Formato de Encuesta

<b>Instrucciones generales de llenado de la encuesta</b>	<b>(Para uso del encuestador)</b>
1.- A través de un diálogo con la persona entrevistada, formule las preguntas completas.	
2.- Escriba las respuestas únicamente con lápiz, <b>no</b> abrevie palabras.	
3.- Escriba con letra de molde mayúscula.	
4.- En el caso de tener que corregir un dato o respuesta, no sobrescriba, borre cuidadosamente y anote el dato o la respuesta correcta.	

Nombre de encuestador (a) \_\_\_\_\_ N<sup>o</sup>

Encuesta \_\_\_\_\_

Nombre de encuestado (a) \_\_\_\_\_

Estado \_\_\_\_\_ Municipio \_\_\_\_\_ Localidad \_\_\_\_\_

CP \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_ N<sup>o</sup> de hoja(s) de colecta \_\_\_\_\_

### Terreno

1. Superficie del terreno sembrado: \_\_\_\_\_

Unidades: ( ) Ha ( ) Km<sup>2</sup> ( ) m<sup>2</sup>

2. Estado legal del terreno:

a) Ejido      b) Propiedad comunal      c) Propiedad privada d) Federal

Nombre del ejido, razón social o

institución \_\_\_\_\_

3. El terreno es:



a) Propiedad del productor   b) Rentado o prestado   c) Concesionado   d)

Otro: \_\_\_\_\_

4. ¿Cuál fue la actividad a la que se dedicó el terreno en el último año?

a) Agricultura      b) Ganadería      c) Ambos      d)

Otra: \_\_\_\_\_

Principal(es) cultivo(s) sembrado(s) regularmente (últimos 5 años)

---

---

---

5. ¿Su parcela es de riego o de temporal?

Especifique: \_\_\_\_\_

---

---

---

6. ¿En los últimos 5 años ha utilizado otros terrenos diferentes a los suyos para sembrar maíz?

a) No      b) Si ¿Dónde y qué variedades sembró?

---

---

---

7. ¿En los últimos 5 años ha prestado o rentado alguno de sus terrenos para la siembra de maíz?

a) No      b) Si ¿Dónde, a quién y qué variedades fueron sembradas? \_\_\_\_\_

---

---

## Características del productor y manejo de la parcela

1. Escolaridad:      a) Primaria      b) Secundaria      c) Medio Superior  
d) Superior

2. ¿Cuáles son sus principales fuentes de ingreso económico? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

3. La mano de obra utilizada en el manejo del cultivo proviene de:

a) Familia    b) Vecinos    c) Jornaleros

Especifique: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

4. ¿Ha recibido asistencia técnica para el manejo de su parcela?      Si (  )    No (  )

Especifique: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

5. En el último año ha utilizado en su terreno (especificar los insumos de cada apartado):

(  ) Fertilizantes químicos:

(  ) Abonos naturales:

(  ) Biofertilizantes u otros preparados:

(  ) Herbicidas:

(  ) Insecticidas:

(  ) Animales de tiro o yunta:

(  ) Tractor:

( ) Sembradora o cosechadora:

( ) Otra maquinaria agrícola:

( ) Control biológico:

( ) Quemadas controladas:

( ) Asociación de cultivos:

6. ¿Realiza rotación de cultivos? SI ( ) No ( )

En caso afirmativo, describa brevemente cómo es la dinámica que maneja:

---

---

---

---

### **Manejo de acervos de semilla**

1. ¿Cuántas variedades de semilla de maíz siembra? \_\_\_\_\_

- Llenar el Anexo 1.
- Considerar los datos del último año productivo para los apartados de superficie sembrada y toneladas producidas.

2. Las variedades de semilla de maíz que usted maneja, ¿Desde hace cuántos años las tiene?: \_\_\_\_\_

3. Sus semillas actuales provienen de (puede elegir más de una opción):

a) Herencia familiar                      b) Parte de un programa de gobierno                      c) Compradas

d)

Otro: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Mencionar programa o punto de venta \_\_\_\_\_

---

---

---

4. ¿Alguna vez ha perdido sus variedades y ha tenido que reponerlas?

( ) No      ( ) Sí      En caso de que la respuesta sea afirmativa, describa el cómo las repuso:

---

---

---

---

---

5. En los últimos 5 años ha sembrado semilla (puede elegir más de una opción):

a) Propia      b) De amigos/ vecinos/ familiares      c) De programas de gobierno  
d) De semilleras

e)

Otras: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Especifique: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

6. ¿En el pasado, ha compartido o regalado alguna de sus semillas?    ( ) Si    ( ) No

En caso de que la respuesta sea afirmativa:

¿Cuáles  
semillas? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ ¿Con quién las compartió? (puede elegir más de una opción).

a) Familiares b) Vecinos c)Ferias d)Instituciones e)

Otro:\_\_\_\_\_

Especifique:\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

¿Qué cantidad aproximada de semilla

compartió?\_\_\_\_\_

¿Para qué fines? a) Siembra b) Alimento c) Venta c) Otros:

Especifique:\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

¿Sabe a qué lugar(es) fue llevada la semilla que compartió? ( ) Si ( ) No

Especifique lugar(es):

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

¿Hace cuánto tiempo que compartió sus

semillas?\_\_\_\_\_

¿Acostumbra a compartir sus semillas de manera

regular?\_\_\_\_\_

### **Destino de la comercialización de la producción agrícola**

1. ¿Qué variedades de maíz y cultivos asociados sembró en el último

año?\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

2. ¿Cuál fue el precio por tonelada de la última cosecha?

<i>Nombre del cultivo</i>	<i>Mes</i>	<i>Año</i>	<i>hectáreas/m2</i>	<i>Toneladas</i>	<i>Pesos (\$)</i>

3. ¿Seleccionó semilla de maíz para siembra? a) No b) Si

¿Cuánta? Especifique

unidad: \_\_\_\_\_

4. ¿Cuánto grano de maíz aproximadamente, destinó para el consumo de su familia?

Especifique

unidad: \_\_\_\_\_

—

5. ¿En el último año cuánto grano de maíz vendió?

\_\_\_\_\_

6. ¿A qué figura(s) vendió su producción?

a) Directamente al consumidor final b) Mayorista c) Intermediario d)

Otro: \_\_\_\_\_

¿En qué

cantidades?: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Anexo 1.

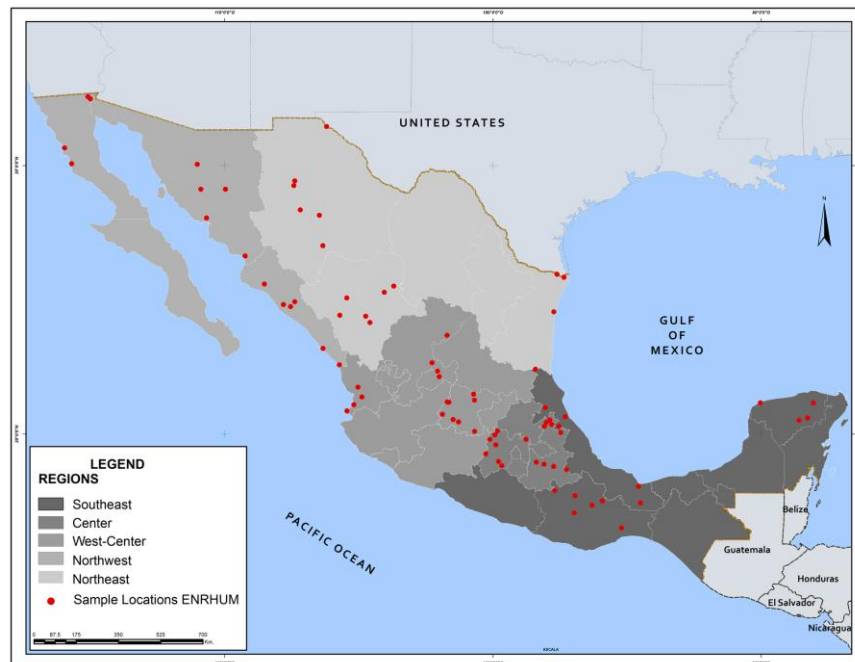
Nº Encuesta \_\_\_\_\_

Nombre de la variedad	Categoría Híbridos, Nativos, Criollos o Mezcla (especificar)	Usos Alimento, Venta Forraje u otros	Características Color, tamaño, resistencias y susceptibilidades	Ciclo Prematuro Medio Largo	Superficie sembrada/ Toneladas producidas	Origen de la semilla Herencia, Compra, Regalada u otro (detallar claramente)
					Superficie	
					Toneladas	
					Superficie	
					Toneladas	
					Superficie	
					Toneladas	
					Superficie	
					Toneladas	

## 15. Consideraciones sobre la situación de los acervos de semilla de maíz en México

Con la finalidad de establecer una agenda en torno a los lugares prioritarios de muestreo para monitoreo de presencia de transgenes en acervos de semilla nativa en México, es necesario comprender previamente los diferentes sistemas agrícolas que existen en nuestro país.

En este sentido, estudios previos sugieren que la agricultura del maíz en México no es homogénea y que de hecho existen diversos sistemas de manejo de semilla los cuales impactan en las tasas de introducción y subsecuente diseminación de semilla foránea dentro de una comunidad particular (Dyer *et al.*, 2009; Dyer y López-Feldman, 2013), dependiendo de la región del país de la que se trate (ver Figura 11).



**Figura 11.** Se ilustran en escala de grises las diferentes regiones del país, con base a criterios socioeconómicos y de producción. En rojo los puntos de la ENRHUM (Dyer *et al.*, 2009). Modificada de Dyer y López-Feldman, 2013.



Como ejemplo de lo anterior, Dyer y López-Feldman (2013) estiman con base en las dinámicas de manejo, introducción y reemplazo de acervos de semilla inferidas con base en la Encuesta Nacional a Hogares Rurales (ENHRUM) llevada a cabo en 2002, la tasa de introducción y difusión de acervos de semillas en diferentes regiones del país, contrastándolas con: la altitud con respecto al origen del acervo (local o foráneo) y la altitud y la región, respectivamente (ver Tabla 10). El resultado de este análisis arrojó que si bien las zonas de altitud media son en las que hay una mayor introducción de semilla foránea, esto es más marcado en la región de centro-occidente (ver Tabla 10). Cabe resaltar que la región donde más rápidamente se difunden nuevos acervos de semilla una vez introducidos, es en la región sudeste, que coincidentemente es aquella en donde se agrupan los estados que tienen un mayor número de variedades nativas de maíz, como son los estados de Oaxaca y Chiapas; así como estados con variedades nativas con características fenológicas y agronómicas singulares –crecimiento en suelos calcáreos, precocidad o ciclo de vida extendidos– presentes en los estados que comprenden a la Península de Yucatán (Kato *et al.*, 2009).

Introduction rates		B. Region (N = 744)							C. Region (N = 739)								
Altitude	A. Seed source (N = 744)			Other	Southeast	Central	West-central	North	Mexico	Southeast	Central	West-central	North	Mexico			
	Informal																
Lowlands	0.03	0.50	0.03	0.01	0.27	0.09	0.50	0.09	0.19	0.30	0.38	0.04	0.23				
Mid-altitudes	0.09	0.74	0.06	0.07	0.58	0.22	0.22	0.22	0.34	0.10	0.21	0.01	0.21				
Highlands	0.06	0.56	0.02	0.07	0.25	0.03	0.03	0.09	0.30	0.18	0.24	0.14	0.22				
Total	0.06	0.61	0.03	0.06	0.37	0.31	0.12	0.12	0.25	0.19	0.25	0.04	0.22				
G test for altitude	G = 10.6** (4 d.f.)			G = 26.4*** (8 d.f.)							G = 10.6** (4 d.f.)						
source	G = 131.9*** (3 d.f.)																
region	G = 111.8*** (9 d.f.)										G = 34.4*** (6 d.f.)						

**Table 4. Rates of seed introduction and diffusion in Mexico, by altitude, seed source and region<sup>1</sup>.**

Significance at the 0.01 level is indicated by \*\*\* 0.05 level indicated by \*\* G-tests exclude seed from formal seed systems.

**Tabla 10.** Tomada de Dyer y López-Feldman (2013).

En este contexto, los criterios para determinar las zonas prioritarias de colecta de maíces nativos para labores de biomonitorio de secuencias transgénicas, y la implementación activa de medidas de bioseguridad, deben considerar no sólo las zonas de alta diversidad de variedades nativas, pero también aquellas regiones donde las tasas estimadas de difusión de semilla son altas. La tasa de difusión puede afectar no sólo la diseminación de acervos de semilla transgénica a través de una comunidad y su potencial amplificación vía cruce con los acervos existentes (Dyer *et al.*, 2009), sino que puede también provocar el favorecimiento y aceleramiento de los procesos de sustitución de acervos de semilla por otros, consolidando procesos de extinción local que, de volverse comunes en diferentes regiones del país, se pueden sumar a los diferentes fenómenos socioeconómicos (abandono del campo, desplazamiento de la agricultura por actividades de manufactura y servicios, envejecimiento del campesinado), ecológicos (erosión del suelo, degradación del microambiente agrícola, escasez de agua, prácticas de monocultivo, entre otros factores que favorecen una reducción de la resiliencia de los agroecosistemas) y agrícolas (baja productividad) que han sido considerados clave en incrementar el potencial de erosión genética del maíz *sensu lato* a través de aumentar la probabilidad de extinción de variedades de maíz nativo en México (Dyer *et al.*, 2014).

Si bien el peso relativo y los elementos más urgentes a considerar como agentes causales de este fenómeno complejo (la erosión genética del maíz en México) siguen bajo debate entre especialistas (Kato *et al.*, 2009; Dyer *et al.*, 2014; Brush *et al.*, 2015; Dyer *et al.*, 2015), existe un consenso generalizado de que la erosión genética es un proceso para el cual hay que tomar urgentes medidas de Estado para frenar dicho fenómeno (Kato *et al.*, 2009; Dyer *et al.*, 2014; Brush *et al.*, 2015; Dyer *et al.*, 2015).

Estas medidas deben incluir no sólo aspectos de manejo de semilla y conservación *in situ*, como se han venido implementando en los últimos años bajo un esquema que se asemeja a un acuerdo de agricultura por contrato (como parecen ser los “guardianes de semilla” financiados por diferentes instancias de

la SAGARPA), sino a través de medidas más amplias que permitan la preservación y optimización de los procesos de mejoramiento genético autóctono llevado a cabo por campesinos y agricultores en pequeña escala en todo el país, y que podría utilizarse como insumo fundamental para recuperar la soberanía alimentaria en este grano (Turrent *et al.*, 2012). Este proceso es fundamental para mantener de manera dinámica la diversidad genética de este grano. Para lograr este objetivo, es necesario implementar mecanismos que no sólo incluyan subsidios y posible transferencia de tecnologías, sino un esquema integral que permita la vida digna de los agricultores.

Otro consenso importante entre especialistas, es la importancia de la conservación de la diversidad genética del maíz a través de sus diferentes variedades nativas, como insumo para el mejoramiento genético de variedades que permitan hacer frente a los cambios ambientales derivados del cambio climático (Brush *et al.*, 2015; Dyer *et al.*, 2015). En este sentido, se han llevado a cabo simulaciones donde se modifican diferentes parámetros climáticos con el objetivo de observar la contracción y expansión de diferentes variedades de maíz nativo en los nichos ecológicos, encontrándose que algunas variedades particulares son más resilientes que otras y que aumentarán, potencialmente, su distribución, ergo volviéndose blancos importantes para la conservación (Ureta *et al.*, 2012).

Estas son algunas de las consideraciones que se están tomando en cuenta en el presente proyecto, y que serán discutidas en una próxima reunión de expertos en el tema, para finalizar el delineado de zonas/regiones/estados prioritarios para su muestreo en el futuro mediato. Mientras tanto, otros acervos de semilla que se considera son importantes de analizar, por su potencial papel como vectores de transgenes a los acervos nativos de maíz en México, son las variedades de semilla híbrida que se utiliza en casi la mitad del territorio nacional.

Según los últimos datos recabados en el Atlas Agroalimentario de la SAGARPA, nuestro país produce anualmente 76% del maíz que se consume en el

país. De esta fracción una parte importante del maíz para forraje (28% del total) y del maíz para consumo humano (48% del total) que sale al mercado, es producido utilizando semilla híbrida amarilla o blanca, respectivamente. Del universo de semilla híbrida que se utiliza para siembra en amplias extensiones del noroeste, región centro y en algunas zonas del sur del país, no se han documentado esfuerzos de monitoreo de estos acervos de semilla, para evaluar la presencia de secuencias recombinantes y estimar su frecuencia. Tampoco se llevan a cabo esfuerzos de biomonitoreo en las aduanas por las que entran las importaciones de maíz como grano, el cual en su mayoría proviene de Estados Unidos, y que actualmente constituye el 24% restante del maíz que se utilizó en el último año, cuyo volumen en 2015 ascendió a 49,677,987 toneladas (Atlas Agroalimentario 2016).

## **16. Estrategia de muestreo propuesta para obtener una estimación representativa de la frecuencia de transgenes en lotes de semillas de maíz nativo en hogares rurales mexicanos, a nivel de las regiones seleccionadas**

### **Esquema general**

Proponemos seguir un esquema de muestreo con el mismo criterio de estratificación del usado en 2002 a nivel nacional para México en la Encuesta Nacional a Hogares Rurales (ENHRUM) (Anexo 1 y 2) [“Rural Household Survey”; descrita en: Dyer & Taylor 2008].

El esquema de muestreo de la ENHRUM fue diseñado en 2002 y la encuesta fue aplicada a nivel de comunidad a finales de 2002 y a nivel de hogar, a inicios de 2003. Esta encuesta dividió al país en 5 regiones según lo establecido previamente en el (Plan Nacional de Desarrollo 2001-2006), las cuales fueron establecidas con base en criterios demográficos, sociales y económicos previamente recabados por el INEGI (2000). El muestreo de ENHRUM es probabilístico, estratificado, multietápico y por conglomerados, donde la última unidad de selección fue el hogar. El retomar el diseño de muestreo ENHRUM nos permitirá hacer comparaciones con los datos de presencia de transgenes en

muestras de lotes de maíz en una muestra representativa de los hogares rurales mexicanos. Estas cinco Regiones constituirán los estratos del esquema de muestreo que proponemos.

Esta estrategia muestral y sus encuestas asociadas, además permitieron evaluar en 2002 la dinámica de introducción (externa), difusión, pérdida y sustitución de los lotes de semillas existentes por comunidad.

### **Estratos y hogares rurales**

ENHRUM, se llevó a cabo por el Programa de Estudios del Cambio Económico y la Sustentabilidad del Agro Mexicano, El Colegio de México, y por el “Rural Economies of the Americas Program, University of California, Davis”, en colaboración con el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, INEGI. La encuesta es representativa de la población rural (localidades de 500 hasta 2499 habitantes) a nivel nacional.

El esquema propuesto es estratificado en un esquema de tres etapas de muestreos agregados, diseñados por el INEGI. Dentro de cada región, se seleccionó una muestra de los estados, localidades y hogares. Estos rubros corresponden a las unidades primarias, secundarias y terciarias de muestreo. En nuestro caso, para el presente estudio, se propone considerar todas las variedades manejadas por cada hogar o unidad de producción, con un tamaño de muestra comprendido por 20 mazorcas de cada variedad y 20 granos por cada mazorca. En total se muestreará 1765 hogares en 80 localidades y 14 de los 32 estados de la República mexicana. En 2002 se colectaron 861 lotes de semillas de 606 hogares para realizar algunos cálculos.

La estratificación ayuda a tener una mayor precisión en estimados en comparación con una muestra aleatoria. La ganancia de precisión se calculó en aproximadamente 21%. Mientras que, dentro de cada estrato, la elección de los hogares se hizo al azar.

## **Mazorcas y semillas a muestrear por hogar**

Proponemos tomar 20 muestras (mazorcas) de cada una de las variedades de maíz (lotes de semillas) que maneje cada hogar rural encuestado. En caso de que no tengan ya mazorcas completas, se tomará el equivalente en granos.

Para cada acervo o lote de semillas se tomarán datos acerca de sus características morfológicas, color, origen. Se tomarán fotografías con el fin de determinar la raza a la que podrían pertenecer, aunque se sabe que hay mucha variabilidad poblacional. Se tomarán fotos de las poblaciones y de las mazorcas individuales.

Ya en el laboratorio se tomarán 20 granos de cada mazorca que se analizarán en 4 lotes de 5 granos cada uno. Los granos se tomarán de hileras completas para maximizar el muestreo de los eventos de polinización implicados en la formación de los granos de cada una de las mazorcas.

El número de lotes a coleccionar dependerá del número de tipos o poblaciones manejados por cada hogar. En 2003 se coleccionaron más de 400 lotes. En su momento se considerará si germinar una sub-muestra de semillas para poder hacer otros análisis y dar seguimiento a los resultados.

En resumen, nuestro protocolo implica muestrear 400 semillas por lote de semilla, a partir de 20 plantas madre. Esto permite una detección de transgénicos a frecuencias menores  $>0.004$  (i.e.,  $>.4\%$ ) con una probabilidad de error  $P<0.05$  (Piñeyro-Nelson *et al.*, 2009). Esta propuesta implica un aumento de casi 10 veces en la precisión para la estimación de frecuencias en comparación a la que se obtuvo en 2002, en que se obtenían 60 semillas o granos por lote.

## **17. Análisis y evaluación del primer periodo de ejecución del proyecto 'Diseño de un plan de monitoreo de presencia de secuencias transgénicas en sitios prioritarios y consolidación del laboratorio de referencia en análisis de OGM'**

Durante el primer periodo de ejecución del proyecto 'Diseño de un plan de monitoreo de presencia de secuencias transgénicas en sitios prioritarios y consolidación del laboratorio de referencia en análisis de OGM', se implementó un protocolo de extracción de ADN a partir de granos de maíz. El método de extracción que se ha implementado en el Laboratorio de Análisis de Organismos Genéticamente Modificados del INECC permite una mayor eficiencia en cuanto al tiempo invertido en la extracción de ADN, así como a los rendimientos de ácido nucleico obtenidos por unidad de masa empleada para la extracción.

En la Tabla 2, se comparan las concentraciones de ADN obtenidas mediante el protocolo previamente utilizado en el Laboratorio de Análisis de Organismos Genéticamente Modificados del INECC, contra los rendimientos en la cantidad de ADN obtenido al utilizar el protocolo de extracción de ADN implementado durante la ejecución del presente proyecto. Aunque los materiales a partir de los cuales se realizó la extracción de ADN fueron los mismos, puede observarse claramente que la media de las concentraciones obtenida mediante el método implementado durante la ejecución de esta parte del proyecto es en promedio 8 veces mayor a aquellas obtenidas mediante el método de extracción de ADN que hasta ahora se utiliza en el Laboratorio de Análisis de Organismos Genéticamente Modificados del INECC.

Adicionalmente, en ocasiones posteriores a esa evaluación inicial (durante la ejecución del segundo periodo de este proyecto), el protocolo técnico utilizado en el Laboratorio de Análisis de Organismos Genéticamente Modificados del INECC ha confirmado ser altamente ineficaz e inconsistente para obtener resultados aceptables en la cantidad de ADN extraído, al punto de que hubieron sesiones de trabajo de laboratorio en las cuales no logró extraerse ADN de las muestras bajo proceso, lo que implica el desperdicio de materiales y



reactivos, y tiempo del personal técnico que labora en el Laboratorio de Análisis de Organismos Genéticamente Modificados del INECC. Se recomienda ampliamente la adopción del método de extracción de ADN implementado en el contexto de este proyecto.

En el primer periodo de ejecución del proyecto, se realizaron pasos importantes para la implementación de la detección e identificación de secuencias recombinantes en muestras de grano de maíz. El protocolo para la determinación de la presencia de secuencias recombinantes en granos de maíz que se está implementando durante la ejecución de este proyecto ha optimizado el uso de los insumos requeridos para la detección de secuencias transgénicas (reactivos de la mezcla de reacción de PCR en Tiempo Real). Se está implementando la utilización de la PCR en Tiempo Real usando la química *SYBR® Green* para el análisis de muestras para la presencia de transgenes.

El protocolo que se empleaba en el análisis de presencia de secuencias transgénicas en el Laboratorio de Análisis de Organismos Genéticamente Modificados del INECC contemplaba el uso de 25 µl por cada reacción de PCR en Tiempo Real; se ha implementado un protocolo de análisis de muestras para la detección de OGMs que requiere de un total de 7 µl totales por reacción de PCR en Tiempo Real, lo cual, a mediano y largo plazo permitirá al Laboratorio de Análisis de Organismos Genéticamente Modificados del INECC analizar una mayor cantidad de muestras con aproximadamente la misma cantidad de insumos presupuestados originalmente.

Con el objetivo de asegurar la consistencia, confiabilidad, y robustez del método de realizaron ensayos moleculares con PCR en Tiempo Real para confirmar la especificidad de los oligonucleótidos utilizados como iniciadores para amplificar los marcadores transgénicos CaMV 35S y T-NOS, así como los oligonucleótidos utilizados como iniciadores para detectar los eventos transgénicos específicos de maíz: NK603, MON810, TC1507, GA21, Bt11, Bt176, DAS59122, MIR604, MON88017, MON89034, MIR162. Como se mostró en las Tablas 6 y 9, los iniciadores son específicos para cada una de las secuencias que

respectivamente fueron diseñadas, lo que permite tener certidumbre en los análisis que se realizarán posteriormente durante la continuación del proyecto y durante la labor cotidiana del Laboratorio de Análisis de Organismos Genéticamente Modificados del INECC.

### **18. Análisis y evaluación del segundo periodo de ejecución del proyecto 'Diseño de un plan de monitoreo de presencia de secuencias transgénicas en sitios prioritarios y consolidación del laboratorio de referencia en análisis de OGM'**

Durante el segundo periodo de ejecución del proyecto 'Diseño de un plan de monitoreo de presencia de secuencias transgénicas en sitios prioritarios y consolidación del laboratorio de referencia en análisis de OGM' se han revisado los protocolos empleados para la identificación de secuencias recombinantes en maíz por medio de PCR-tiempo real utilizando la química *TaqMan*<sup>®</sup>. Se realizaron ensayos de especificidad de los oligonucleótidos sonda con cada uno de los templados de ADN extraídos a partir de los materiales de referencia. Aunque por la naturaleza misma de la química *TaqMan*<sup>®</sup> se esperaba que los oligonucleótidos sonda fueran altamente específicos para la secuencia de ADN del evento transgénico específico de maíz para el cual fueron diseñados, se realizó el ensayo para confirmarlo. Con el objetivo de conocer los valores de Ct de oligonucleótidos sonda y el ADN templado del evento transgénico correspondiente en la reacción de PCR-tiempo real y la posibilidad de optimizar las condiciones de la reacción de PCR-tiempo real, se realizaron las reacciones de PCR en dos diferentes volúmenes totales de reacción: 25  $\mu$ L y 15  $\mu$ L.

Se observó de manera general una variación promedio de 6.36 unidades en los valores de Ct obtenidos en la PCR-tiempo real empleando la química *TaqMan*<sup>®</sup>, con respecto a los valores de Ct obtenidos en los ensayos de especificidad de los oligonucleótidos en los ensayos de PCR-tiempo real en los que se empleó la química *SYBR*<sup>®</sup> *Green*, en las reacciones que se realizaron en un volumen total de 25  $\mu$ L; mientras que en las reacciones en las que el volumen total de reacción fue de 15  $\mu$ L, se observó una variación promedio de 7.11

unidades en los valores de Ct obtenidos en la PCR-tiempo real empleando la química *TaqMan*<sup>®</sup>, con respecto a los valores de Ct obtenidos en los ensayos de especificidad de los oligonucleótidos en los ensayos de PCR-tiempo real en los que se empleó la química *SYBR*<sup>®</sup> *Green*.

Las diferencias en los valores de Ct obtenidos se deben fundamentalmente a las particularidades entre las químicas *SYBR*<sup>®</sup> *Green* y *TaqMan*<sup>®</sup>; mientras que en la química *SYBR*<sup>®</sup> *Green* el aumento en la cantidad de emisión de fluorescencia es debido al intercalamiento del químico *SYBR*<sup>®</sup> *Green* en las cadenas de ADN bicatenario que se van produciendo durante el desarrollo de los ciclos de la reacción de PCR, sin que dichas cadenas necesariamente correspondan a la secuencia diana. Por otro lado, el aumento de la fluorescencia en la química *TaqMan*<sup>®</sup> es debido a la degradación de los oligonucleótidos sonda, lo que a su vez permite una separación entre el compuesto fluoróforo y el compuesto extintor de la fluorescencia (quencher). Dado que la emisión de fluorescencia en el sistema *TaqMan*<sup>®</sup> es dependiente de la interacción entre la secuencia del oligonucleótido sonda y el ADN templado diana, el sistema de PCR-tiempo real requiere de un mayor número de ciclos (valores de Ct) para que la fluorescencia producida por la amplificación específica de la secuencia diana rebase el umbral de detección del sistema de PCR-tiempo real.

Se convocó a científicos nacionales, expertos en diversos aspectos del maíz tales como biología, genética, diversidad de variedades en las regiones de México, agricultura, y monitoreo de transgenes, y estadística, a discutir sobre los criterios socio-ecológicos a considerar para definir los sitios prioritarios para realizar colectas de maíz con el objetivo de monitorear la presencia de transgenes en variedades nativas y variedades híbridas de maíz. Se revisó el panorama general sobre la historia y situación actual del biomonitoreo de transgenes en el maíz en México desde la primera evidencia sobre secuencias transgénicas en variedades nativas de maíz en Oaxaca en el año 2001. Se hizo un análisis y discusión puntual y breve sobre los datos de presencia de maíz transgénico generados más recientemente por el Laboratorio de Genética, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología de la

UNAM, y se evidenció la necesidad de hacer extensivo el monitoreo a zonas del país en las que exista riqueza de variedades de maíz, y que por lo tanto se encuentren en riesgo ante la potencial presencia de transgenes en variedades híbridas.

Se señalaron las principales fuentes potenciales de dispersión de transgenes hacia las variedades nativas mexicanas tales como la importación de maíz desde los Estados Unidos –en donde no hay segregación entre el maíz transgénico y el convencional- y a las variedades híbridas potencialmente transgénicas. De manera importante, se mencionó que deben considerarse las rutas de movimiento de granos, a las empresas que realizan acopio de granos y a los programas gubernamentales de asistencia social, como puntos de recolección de muestras para monitoreo.

Adicionalmente se mencionó la importancia de monitorear la presencia de secuencias recombinantes en los parientes silvestres del maíz, por ejemplo, teocintle. De manera relevante, se mencionó que es esencial el contemplar un mayor esfuerzo de monitoreo en las áreas de mayor riqueza biocultural de México, que son áreas en las que históricamente ha coincidido la diversidad biológica con la presencia de los pueblos nativos mexicanos y en esta coexistencia se ha generado una gran proporción de la diversidad del maíz mexicano conocida actualmente. Como un punto potencial de dispersión de transgenes en zonas de siembra de maíz en el territorio nacional, se mencionó que deben considerarse áreas de simpatría entre variedades de maíz nativo y maíz híbrido que sea potencialmente transgénico.

Estas consideraciones permitieron proponer posibles rutas críticas para cumplir los objetivos del proyecto con el Laboratorio de Análisis de Organismos Genéticamente Modificados del INECC en cuanto a la elaboración de una estrategia de muestreo y la elección de zonas prioritarias.

## **19. Recomendaciones**

Con el objetivo de hacer más eficiente la generación de harinas a partir de los granos de maíz que se analizarán, se recomienda la adquisición de licuadoras o molinos adecuados para el procesamiento de granos, (menos de 50 granos de maíz) y la cantidad reducida de equipo para moler disponible en el laboratorio de análisis de OGMs del INECC.

El protocolo de extracción de ADN implementado en esta etapa del proyecto permite procesar más muestras de granos de maíz en menor tiempo, lo que hace más eficiente el proceso global de detección e identificación de secuencias transgénicas en maíz. Adicionalmente, se comprobó que el rendimiento de ADN obtenido es mayor en comparación con el protocolo utilizado previamente. Se recomienda la práctica del protocolo de extracción de ADN implementado en esta etapa, con la finalidad de incrementar progresivamente la cantidad de ADN obtenido en cada evento de extracción.

Se realizaron ensayos de especificidad de los iniciadores (oligonucleótidos) ante el ADN para el cual fueron diseñados y sintetizados. Se recomienda realizar este tipo de análisis cada vez que se incluyan nuevos iniciadores al proceso de detección e identificación de secuencias recombinantes.

En cuanto al diseño de los experimentos de identificación de secuencias transgénicas utilizando placas para el ensayo de PCR en tiempo real, se sugiere cambiar de un diseño que analice las muestras en estudio por duplicados, como se hace hasta ahora, por un diseño que considere analizar cada muestra por triplicado. Lo anterior con la finalidad de aumentar los datos que son considerados como criterios de caracterización e identificación de las muestras analizadas, de tal forma que el conjunto de datos obtenidos para una muestra individual pero analizada por triplicado permita conocer con certeza el estado de presencia o ausencia de transgenes en dicha muestra.

Se diseñó un formato de ficha de recolección de datos de las muestras de maíz colectadas. Se recomienda capacitar a las personas que recojan dicha información previa a la realización de los muestreos.

Se diseñó una encuesta orientada a obtener información socioeconómica de las personas y el entorno en el cual se obtengan muestras para ser analizadas para la presencia de secuencias recombinantes. Debe considerarse que toda encuesta tiene un sesgo de origen, por lo que se recomienda adaptar la encuesta, analizar previamente el contexto de su aplicación, así como capacitar previamente al personal técnico que aplicará las encuestas en campo.

## 20. Bibliografía

- Ahmed, F. E. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology*, 20(5), 215–223.
- Alavez, V., Álvarez-Buylla, et. al. (2013). Las líneas de maíz transgénico disponibles para la agricultura: promesas, hechos y potencial en el contexto de México. In *El maíz en peligro ante los transgénicos*. (p. 61). México, D.F.: UNAM, Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad.
- Álvarez-Buylla, E., Piñeyro-Nelson, A., Turrent, A., Wegier, A. (2013). Incertidumbre, riesgos y peligros de la liberación de maíz transgénico en México. In *El maíz en peligro ante los transgénicos*. (p. 111–163.). México, D.F.: UNAM, Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad.
- Álvarez-Buylla E., Carrillo-Truba C., Olivé-León, Piñeyro-Nelson, A. (2013). Introducción. In *El maíz en peligro ante los transgénicos*. (pp. 15–24). México, D.F.: UNAM, Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad.
- Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H., & Van Eede, G. Den. (2002). Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology*, 214(1), 3–26. <http://doi.org/10.1007/s002170100415>
- Arleo, M. (2015). *Detección y cuantificación de Organismos Genéticamente Modificados en cultivos de maíz y alimentos derivados , mediante análisis*

- molecular*. Universidad de la República, Montevideo.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., & Arya, N. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 5(2), 1–11.
- Barbau-Piednoir, E., Lievens, A., Mbongolo-Mbella, G., Roosens, N., Sneyers, M., Leunda-Casi, A., & Van den Bulcke, M. (2010). *SYBR® Green* qPCR screening methods for the presence of “35S promoter” and “NOS terminator” elements in food and feed products. *European Food Research and Technology*, 230(3), 383–393.
- Barbau-Piednoir, E., Stragier, P., Roosens, N., Mazzara, M., Savini, C., Van den Eede, G., & Van den Bulcke, M. (2014). Inter-laboratory Testing of GMO Detection by Combinatory *SYBR® Green* PCR Screening (CoSYPS). *Food Analytical Methods*, 1–10.
- Bauer-Panskus, Andreas, Hamberger Sylvia, Schumm, Mirjam, Then, C. (2015). *Testbiotech: Escape of genetically engineered organisms and unintentional transboundary movements: Overview of recent and upcoming cases and the new risks form SynBio organisms*. Munich: Testbiotech. Retrieved from [www.testbiotech.org](http://www.testbiotech.org)
- Bourges, H. (2013). El maíz: su importancia en la alimentación de la población mexicana. In *El maíz en peligro ante los transgénicos*. (Primera ed, pp. 231–248). México, D.F.: UNAM, Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad.
- CERA. (2015). GM Crop Database, Center for Environmental Risk Assessment. Retrieved from <http://www.cera-gmc.org/GMCropDatabase>
- CIBIOGEM. (2017). Sistema Nacional de Información sobre Bioseguridad. Retrieved from <http://conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/sistema-nacional-de-informacion/estadisticas>
- Comm-, E., Food, E., Authority, S., Food, U. N., Organisation, A., Additives, F., ... Sweet, J. (2008). Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. *Food and Chemical Toxicology*, 46(SUPPL. 1). <http://doi.org/10.1016/j.fct.2008.02.008>
- Compass, G. (2015). Glossary. Retrieved from <http://www.gmo-compass.org/eng/glossary/>
- Cottenet, G., Blancpain, C., Sonnard, V., & Chuah, P. F. (2013). Development and

- validation of a multiplex real-time PCR method to simultaneously detect 47 targets for the identification of genetically modified organisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(21), 6831–6844.
- De Schrijver, A., Devos, Y., Van den Bulcke, M., Cadot, P., De Loose, M., Reheul, D., & Sneyers, M. (2007). Risk assessment of GM stacked events obtained from crosses between GM events. *Trends in Food Science and Technology*, 18(2), 101–109. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.09.002>
- De Wolf, J., Duchateau, L., Verbeke, G., & Schrevens, E. (2010). Discovering transgenic elite events: Using information from early screening trials for improving experimental design. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, 15(3), 403–415. <http://doi.org/10.1007/s13253-010-0022-x>
- Dyer, G. A., & López-Feldman, A. (2013). Inexplicable or simply unexplained? The management of maize seed in Mexico. *PloS one*, 8(6), e68320.
- Dyer, G. A., Serratos-Hernández, J. A., Perales, H. R., Gepts, P., Piñeyro-Nelson, A., Chávez, A., ... Alvarez-Buylla, E. R. (2009). Dispersal of transgenes through maize seed systems in Mexico. *PLoS ONE*, 4(5), e5734. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0005734>
- Dyer G, Taylor JE. A crop population perspective on maize seed systems in Mexico. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:470–475. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2206560/>
- Fernández-Suárez, R., Morales-Chávez, L. A., & Gálvez-Mariscal, A. (2013). Importance of Mexican Maize Landraces in the National Diet. an Essential Review. *Rev. Fitotec. Mex.*, 36(3–A), 275–283.
- Ficha técnica ENHRUM (2002). Disponible en: <http://bdsocial.inmujeres.gob.mx/index.php/enhrum-36/encuesta-nacional-a-hogares-rurales-de-mexico>
- Flores, Y. A. C., Herrera, R. R., Aguilar, C. N., Carlos, J., & Esquivel, C. (2007). Nuevos métodos para la detección de residuos de organismos genéticamente modificados en alimentos basados en el ADN. *BioTecnología*, 11(236), 28–36. Retrieved from [http://www.smbb.com.mx/revista/Revista\\_2007\\_2/Alimentos\\_ADN.pdf](http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2007_2/Alimentos_ADN.pdf)
- Gasparic, M. B., Tengs, T., La Paz, J. L., Holst-Jensen, A., Pla, M., Esteve, T. &



- Gruden, K. (2010). Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6), 2023–2029.
- Griffiths, K., Partis, M. L., & Croan, D. (2002). *Review of Technologies for Detecting Genetically Modified Materials in Commodities and Food*. Retrieved from [www.foodstandards.gov.au](http://www.foodstandards.gov.au)
- Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., Esteve, T., Prat, S., & Pla, M. (2003). Development of melting temperature-based *SYBR Green I* polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Analytical Biochemistry*, 323(2), 164–170.
- Holden, M. J., Levine, M., Scholdberg, T., Haynes, R. J., & Jenkins, G. R. (2010). The use of 35S and Tnos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 2175–2187. <http://doi.org/10.1007/s00216-009-3186-x>
- Holst-Jensen, A., De Loose, M., & Van Den Eede, G. (2006). Coherence between legal requirements and approaches for detection of genetically modified organisms (GMOs) and their derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 2799–2809. <http://doi.org/10.1021/jf052849a>
- Huber, I., Block, A., Sebah, D., Debode, F., Morisset, D., Grohmann, L. & Busch, U. (2013). Development and validation of duplex, triplex, and pentaplex real-time PCR screening assays for the detection of genetically modified organisms in food and feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(43), 10293–10301.
- ISAAA. (2016a). Biotech Crop Highlights in 2015. Retrieved December 14, 2016, from <http://isaaa.org/resources/publications/pocketk/16/default.asp>
- ISAAA. (2016b). GM Approval Database. Retrieved December 14, 2016, from <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/advsearch/default.asp?CropID=6&TraitTypeID=Any&DeveloperID=Any&CountryID=Any&ApprovalTypeID=Any>
- Kato, A., Ortega, P.R., Boege, E. Wegier, A., Serratos, H., Alavez, V., Jardón, B., Moyers, L. Ortega, D. (2013). El maíz, aspectos biológicos: Sistemas agrícolas tradicionales con Maíz. In *El maíz en peligro ante los transgénicos*. (Primera ed, pp. 25–53). México, D.F.: UNAM, Unión de Científicos Comprometidos

con la Sociedad.

Kato, T. A., Mapes, C., Mera, L. . M., Serratos, J. A., & Bye, R. A. (2009). *Origen y diversificación del maíz. Origen y diversificación del maíz*. (Primera Ed). México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Key, S., Ma, J. K.-C., & Drake, P. M. (2008). Genetically modified plants and human health. *J R Soc Med*, 101(6), 290–298. <http://doi.org/10.1258/jrsm.2008.070372>

Laboratories, B.-R. (2012). Biotechnonology Explorer GMO investigator kit: A quantitative Real Time PCR Extension. Retrieved from [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/literature/16625\\_05.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/literature/16625_05.pdf)

López, M., Mallorquín, P., & Vega, M. (2003). *Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria. Informe de Vigilancia Tecnológica*. (S. Enriquez, Ed.). Madrid, España: Funfacción Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica, Universidad Autónoma de Madrid. Retrieved from [http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/TRAZABILIDAD\\_ALIMENTARI A.pdf](http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/TRAZABILIDAD_ALIMENTARI A.pdf)

López Andreo, M. (2013). *Identificación y cuantificación de especies en productos alimenticios mediante PCR en tiempo real*. Universidad Complutense de Madrid.

Markoulatos, P., Siafakas, N., Papathoma, a, Nerantzis, E., Betzios, B., Dourtoglou, V., & Moncany, M. (2004). Qualitative and quantitative detection of protein and genetic traits in genetically modified food. *Food Reviews International*, 20(3), 275–296. <http://doi.org/10.1081/lfri-200029418>

Mason, G., Provero, P., Vaira, A. M., & Accotto, G. P. (2002). Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnology*, 2(1), 20. Retrieved from <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-2-20>

Mazzara, M., Cordeil, S., & Van den Eede, G. (2004). Event-specific method for the quantitation of maize line NK 603 using real-time PCR Validation Report, 1/10. Retrieved from <http://gmo->

[crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/NK603report\\_mm.pdf](http://crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/NK603report_mm.pdf)

- Nota metodológica ENHRUM (2002). Disponible en: <http://bdsocial.inmujeres.gob.mx/index.php/enhrum-36/encuesta-nacional-a-hogares-rurales-de-mexico>
- Pimentel, D., Westra, L., Noss, R. F. (2000). *Ecological integrity: integrating environment, conservation, and health*. Washington: Island Press.
- Piñeyro-Nelson, A., Van Heerwaarden, J., Perales, H. R., Serratos-Hernández, J. A., Rangel, A., Hufford, M. B., ... Álvarez-Buylla, E. R. (2009). Transgenes in Mexican maize: Molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Molecular Ecology*, 18(4), 750–761. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03993.x>
- Querci, M., Jermini, M., Van den Eede, G. (2007). *Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos*. Luxemburgo: Joint Research Centre European Commission. Retrieved from <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual ES/User Manual ES full.pdf>
- Quist, D., & Chapela, I. H. (2001). Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature*, 414(6863), 541–543. <http://doi.org/10.1038/35107068>
- SAGARPA. (2015). Disponibilidad-consumo de maíz blanco y maíz amarillo. Retrieved from <http://www.numerosdelcampo.sagarpa.gob.mx/publicnew/productosAgricolas/>
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S. Scharf, S., Higuchi, E., Horn, G., Mullis, K. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, (239), 487–491.
- Salvi, S., D'Orso, F., & Morelli, G. (2008). Detection and quantification of genetically modified organisms using very short, locked nucleic acid *TaqMan* probes. *J Agric Food Chem*, 56(12), 4320–4327. <http://doi.org/10.1021/jf800149j> [doi]
- Scientific, T. (2012). Assessment of Nucleic Acid Purity. *Thermo Fisher Scientific*. Retrieved from <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>

- Serna-Saldívar S O, C. A. A.-G. (2008). El papel de la tortilla nixtamalizada en la nutrición y la alimentación. In F. S.-S. M E Rodríguez-García, S O Serna-Saldívar (Ed.), *Nixtamalización del Maíz a la Tortilla. Aspectos Nutrimientales y Toxicológicos*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Serratos-Hernández, J.A., Gómez-Olivares, J.L, Salinas-Arreortua, N. (2007). Transgenic proteins in maize in the Soil Conservation area of Federal District , Mexico. *Frontiers in Ecology ...*, 5(5), 247–252. [http://doi.org/Doi10.1890/1540-9295\(2007\)5\[247:Tpimit\]2.0.Co;2](http://doi.org/Doi10.1890/1540-9295(2007)5[247:Tpimit]2.0.Co;2)
- Serratos-Hernández, J. A. (2009, March). Bioseguridad y dispersión de maíz transgénico en México. *Revista Ciencias*, 130–141.
- SIAP. (2016). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Retrieved from [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/icultivo/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp)
- Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), 6–20. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>
- Trejo Pastor V. (2014). *Tesis: Resistencia a Glifosato En Maíces Nativos De Veracruz E Híbridos Comercializados En México*. Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas Campus Montecillo.
- Turrent-Fernández, A., Serratos-Hernández, A., Mejía-Andrade, H., Espinosa-Calderón, A. (2009). Propuesta de cotejo de impacto de la acumulación de transgenes en el maíz nativo mexicano. *Agrociencia*, (43), 257–265.
- UNESCO, O. de las N. U. para la E., & Cultura, la C. y la. (2010). La Lista Representativa del Patrimonio Cultural Inmaterial de la UNESCO se enriquece con 46 nuevos elementos.
- Van den Bulcke, M., Lievens, A., Barbau-Piednoir, E., MbongoloMbella, G., Roosens, N., Sneyers, M., & Casi, A. L. (2010). A theoretical introduction to Combinatory SYBR® Green qPCR Screening, a matrix-based approach for the detection of materials derived from genetically modified plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6), 2213–2123.
- Vinueza-Burgos, C. (2009). PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(2), 1–13.
- Watson, R. , Preedy, V. (2015). *Genetically modified organisms in food: Production,*

*safety, regulation and public health.* United States: Nikki Levy.

**FICHA TÉCNICA**

<b>Nombre de la encuesta y siglas</b>	Encuesta Nacional a Hogares Rurales de México (ENHRUM)
<b>Institución que la elaboró</b>	Diseño muestral lo elaboró el INEGI y el levantamiento, diseño de cuestionarios y manuales estuvo a cargo de del Programa de Estudios del Cambio Económico y la Sustentabilidad del Agro Mexicano (PRECESAM) del Centro de Estudios Económicos de El Colegio de México y del Rural Economies of the Americas and Pacific Rim (REAP) de la Universidad de California en Davis
<b>Institución o sitio que difunde o tiene a resguardo la información</b>	Colegio de México (COLMEX)
<b>Medio por el cual se obtuvo</b>	Internet Consultada el día 20 de agosto de 2008 en <a href="http://precesam.colmex.mx/ENHRUM/PAG%20PRIN_ENHRUM_.htm">http://precesam.colmex.mx/ENHRUM/PAG%20PRIN_ENHRUM_.htm</a>
<b>Vigencia del derecho de la información</b>	No aplica
<b>Forma parte de un conjunto de encuestas, ¿cuál(es)?</b>	No
<b>Periodo de la información</b>	Para las preguntas de tipo económico (ingresos y gastos) el periodo de referencia de la encuesta fue del 1º de enero al 31 de diciembre de 2002. Para las variables sociodemográficas, como parentesco, sexo, edad, religión, lengua, estado civil, escolaridad, etc., el periodo de referencia fue el momento de la entrevista (enero a mediados de marzo de 2003). Las historias de trabajo de los miembros del hogar abarcan un periodo de 1980 a 2002.
<b>Año de publicación</b>	
<b>Contenidos temáticos</b>	Encuesta Comunitaria : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Las relaciones de cada comunidad con su entorno (comercio, trabajo, migración, etc.);</li> <li>- Las unidades de medida locales;</li> <li>- La infraestructura económica y social;</li> <li>- Las principales actividades económicas;</li> <li>- El tipo de propiedad de la tierra;</li> <li>- Acceso y uso de los recursos naturales;</li> <li>- Los mercados del maíz.</li> </ul> Encuesta a Hogares: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Análisis multisectoriales de impactos de las reformas a partir de la construcción de matrices de contabilidad social;</li> <li>- Niveles de pobreza y desigualdad económica entre hogares y por género;</li> <li>- Estudios de capital social y humano;</li> <li>- Historia laboral y el papel de la migración y las remesas en la economía de los hogares; y</li> <li>- Cambios en la tenencia de la tierra.</li> </ul>
<b>Contenidos temáticos relevantes para la investigación de género</b>	Encuesta Comunitaria : <ul style="list-style-type: none"> <li>- El tipo de propiedad de la tierra;</li> <li>- Acceso y uso de los recursos naturales;</li> </ul>

**FICHA TÉCNICA**

	<p>Encuesta a Hogares:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Análisis multisectoriales de impactos de las reformas a partir de la construcción de matrices de contabilidad social;</li> <li>- Niveles de pobreza y desigualdad económica entre hogares y por género;</li> <li>- Estudios de capital social y humano;</li> <li>- Historia laboral y el papel de la migración y las remesas en la economía de los hogares; y</li> <li>- Cambios en la tenencia de la tierra.</li> </ul>
<b>Objetivo(s)</b>	Obtener por vez primera información representativa en el plano nacional sobre la economía y sociedad rural de México y, con ella, elaborar, entre otros, estudios empíricos sobre los efectos de las reformas agropecuarias y comerciales en la producción, ingreso y migración de los hogares y del sector rural.
<b>Unidad(es) de análisis</b>	Comunidades, los hogares y los individuos que residen en las viviendas.
<b>Diseño muestral</b>	Probabilístico, estratificado, multietápico y por conglomerados, donde la última unidad de selección es el hogar
<b>Cobertura geográfica y desglose geográfico</b>	La cobertura geográfica es a nivel nacional en poblaciones rurales de 500 a 2499 habitantes. La encuesta se levantó en 80 localidades rurales de 14 estados de la República, a partir de una división del país en 5 regiones: Sur-Sureste (Oaxaca, Veracruz y Yucatán), Centro (Edo. de México y Puebla), Centro-Occidente (Guanajuato, Nayarit y Zacatecas), Noroeste (Chihuahua, Durango y Tamaulipas),
<b>Número de registros en base de datos</b>	N = 1, 765 Véase “características adicionales”.
<b>Características adicionales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se presentan dos bases de datos: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ “Hogares”. Información sobre los 1, 765 hogares y de los miembros del hogar (sociodemográfica, historia de laboral, parentesco, parcelas, ganadería, recursos naturales, activos, otros gastos e ingresos, herencia y crédito, tiendas y negocios y pesca).</li> <li>○ “Comunidades”, Información de 397 comunidades con información sobre datos generales de la comunidad, generalidades de la agricultura, cultivos principales, producción de maíz, generalidades de la ganadería, crianza o engorda de ganada principal, generalidades del sector de bienes y servicios y producción de bienes y servicios.</li> </ul> </li> </ul>

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

**Encuesta Nacional a Hogares Rurales de México (ENHRUM)**

<b>Número de cuestionario aplicados para recoger la información</b>	Para la Encuesta Nacional a Hogares Rurales de México (ENHRUM) se aplicaron 23 cuestionarios, de los cuales 10 corresponden a la Encuesta Comunitaria y 13 a la Encuesta Hogares.		
<b>Número de bases. ¿Qué información contienen estas bases?</b>	La ENHRUM contiene 204 bases de datos, sin contar las bases que corresponden a catálogos y códigos:		
	<b>Encuesta comunitaria: 124 bases</b>		
	<b>APARTADO</b>	<b>TABLA</b>	<b>CONTENIDO</b>
	<b>1.- Datos Generales de la Comunidad</b>	Tbl I Datos Generales de la Comunidad	Estado, Municipio y Localidad
	2.-Principales actividades productivas de la comunidad	Tbl I2 Principales actividades productivas en la comunidad Tbl I2 Principales actividades productivas en la comunidad 1 Tbl I2 Principales actividades productivas en la comunidad 2 Tbl I2 Principales actividades productivas en la comunidad 3 Tbl I2 Principales actividades productivas en la comunidad 4 Tbl I2 Principales actividades productivas en la comunidad 5 Tbl I2 Principales actividades productivas en la comunidad 6	Principales actividades productivas como cultivos, animales, productos que aprovechan del bosque o monte, ríos y lagos o de minas, la existencia de talleres de costura o industria , tipos de servicios que se ofrecen , otras actividades que se dedica la gente, así como las principales actividades que aportan a los ingresos de los hogares.
	3.- Obras Públicas y su financiamiento	Tbl I3 Obras públicas y su financiamiento	Destino de las obras públicas (escuelas caminos, pozo de agua, centro de salud etc.), tipo de obra (nueva, ampliación, mejora), origen de la aportación (gobierno, comunidad, migrantes, etc.)
	4.- Migración	Tbl I4 Migración Internacional Tb1 I4 Migración Nacional Tb1 I4 Remesas Tbl I4 Remesas final Tbl I4 Envió de dinero	Actividades de los migrantes, porcentaje de la población nacida en la comunidad que vive en los Estados Unidos, a que comunidades emigran, métodos de envío de dinero, lugares donde cambian los



**DIAGNÓSTICO INICIAL**

	Tbl I4 Envió de dinero 1 Tbl I4 Cambio de dólares	dólares, etc.
5.- Mercados	Tbl I5 Compra de productos Tbl I5 Compra de productos 1 Tbl I5 Pago de Servicios Tbl I5 Servicios Tbl I5 Venta de productos	Origen y destino de las ventas y compras de productos , tipos de servicios en la comunidad, lugar donde pagan los servicios y los impuestos
6.- Precios	Tbl I6 Precios	Precios de canasta básica de cada comunidad
7.- Educación	Tb1 I7 Educación Tb1 I7 Educación 1	Escuelas públicas, privadas, su infraestructura, planta de maestros, educación fuera de la comunidad.
8.- Salud	Tb1 I8 Salud	Clínicas, hospitales, médicos particulares en la comunidad, farmacias
9.- Transporte	Tb1 I9 Transporte	Medios de transporte, costo de pasajes, tiempo de viaje y distancia entre comunidades más cercanas. Infraestructura carretera
10.- Programas gubernamentales	Tb1 I10 Programas gubernamentales	Principales programas gubernamentales, su aportación a la comunidad y problemas con la ejecución del programa
11.- Uso y tenencia de la tierra en el año 2002	Tb1 I11 Uso de la tierra Tb1 I11 Uso de la tierra 1 Tb1 I11 Uso de la tierra 2 Tb1 I11 Uso de la tierra 3 Tb1 I11 Uso de la tierra 4 Tb1 I11 Uso de la tierra 5 Tb1 I11 Venta y renta de tierras	Usos y tenencia de la tierra
12.- Política y religión	Tb1 I12 Política y religión	Partidos políticos, número de iglesias y familias católicas.
<b>Ila Generalidades de la agricultura</b> 1.- Características generales de la producción	Tb1 Ila1 Características generales de la producción Tb1 Ila1 Características generales de la producción 1 Tb1 Ila1 Características generales de la	Principales cultivos, veces al año que se siembra en la comunidad

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

	producción 2	
2.- Otros productores en la comunidad	Tbl II a2 Otros productores en la comunidad	Existencia de productores que no sean vecinos pero que cultiven la tierra en la comunidad, mano de obra, tipos de cultivos.
3.- Organización	Tbl IIa3 Organización Tbl IIa3 Organización 1	Organizaciones sociales en la comunidad para ayudar a la producción agrícola, propósitos y labores de las organizaciones
4.- Financiamiento de la producción de cultivos	Tbl IIa4 Financiamiento de la producción de cultivos	Fondos propios, ayuda de familiares, créditos bancarios, etc.
5.- Asesoría	Tbl IIa5 Asesoría	Asesoría para cultivar, organización o institución que la proporciona, costo y oficinas centrales
6.- Siniestros	Tbl IIa6 Siniestros Tbl IIa6 Siniestros 1 Tbl IIa6 Siniestros 2	Principales siniestros en la comunidad, fechas en que se presentó, si se declaró zona de desastre, ayuda a los agricultores y tipos de seguros para cultivos.
<b>IIb Cultivo Principal</b>		
1.- Calendario	Tbl IIb1 Calendario Tbl IIb1 Calendario 1	Cultivo principal, trabajos que se realizan para producir el cultivo, cuantas veces al año siembran y tipos de herramientas que utilizan para el cultivo
2.- Financiamiento	Tbl IIb2 Financiamiento	Como pagan los productores los trabajos para la producción de el cultivo
3.- Insumos, maquinaria y factores de la producción	Tbl IIb3 Insumos Tbl IIb3 Mano de obra Tbl IIb3 Maquinaria y equipo Tbl IIb3 Renta de la tierra	Que producto o servicio se usan para producir el cultivo, en donde se obtiene, como se obtiene (se compra o del gobierno), cuanto se usa por hectárea. Maquinaria o equipo que usan los productores Renta de la tierra, el pago en efectivo o en especie Mano de obra familiar, mano de obra asalariada

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

4.- Destino de la producción	Tbl IIb4 Destino de la producción	Los productores usan el producto para vender, consumo familiar, consumo animal, fabrican algo y que fabrican.
5.- Comercialización	Tbl IIb5 Almacenamiento Tbl IIb5 Compradores	A quien se vende el cultivo y el almacenamiento en bodegas.
<b>IIc Producción de maíz</b> 0.- Tipos de maíz	Tbl IIc Tipos de maíz Tbl IIc Tipos de maíz 1 Tbl IIc Tipos de maíz 2 Tbl IIc Tipos de maíz 3	
1.- Calendario	Tbl IIc1 Calendario	Trabajos que se realizan para producir maíz en el ciclo en que fechas. Herramientas que se utilizan
2.- Financiamiento	Tbl IIc2 Financiamiento	Como pagan los productores los trabajos en el cultivo del maíz: fondos propios, prestamos, cajas de ahorro, créditos bancarios, etc.
3.- Insumos, maquinaria y factores de la producción	Tbl IIc3 Insumos Tbl IIc3 Mano de obra Tbl IIc3 Maquinaria y equipo Tbl IIc3 Renta de la tierra	Productos o servicios que se usan para producir maíz, equipo o maquinaria que se utiliza para el cultivo, renta de la tierra, mano de obra familiar y asalariada
4.- Destino de la producción	Tbl IIc4 Destino de la producción	Los productores usan el producto para consumo familiar, consumo animal, fabricar algo más, etc.
5.- Comercialización	Tbl IIc5 Almacenamiento Tbl IIc5 Compradores Tbl IIc5 De la milpa a la tortilla Tbl IIc5 De la milpa a la tortilla 1 Tbl IIc5 De la milpa a la tortilla 2 Tbl IIc5 De la milpa a la tortilla 3	Preparación de tortillas para el hogar y para la venta.
<b>IIIa Generalidades de la Ganadería</b> 1.- Características generales de la producción	Tbl IIIa1 Características de la producción Tbl IIIa1 Características de la producción 1 Tbl IIIa1 Características de la producción 2	Tipos de animales en la comunidad y rastros o carnicerías.

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

2.- Otros productores de ganado en comunidad	Tbl IIIa2 Otros productores en la comunidad	Existencia de productores que no sea vecino pero que críe o engorde animales en la comunidad
3.- Organización	Tbl IIIa3 Organización Tbl IIIa3 Organización 1	Tipos de organizaciones que apoyen a la cría o engorda de animales
4.- Financiamiento de la cría o engorda de animales	Tbl IIIa4 Financiamiento de la cría o engorda de animales	Como se pagan los trabajos y financian los demás gastos de la cría o engorda de el ganado
5.- Asesoría	Tbl IIIa5 Asesoría	Asesoría para la cría o engorda de el ganado
6.- Siniestros	Tbl IIIa6 Siniestro Tbl IIIa6 Siniestros 1 Tbl IIIa6 Siniestros 2	Siniestros que causan problemas para la cría o engorda de animales
<b>III.b Crianza o engorda de ganado principal</b>		
1.- Calendario	Tbl IIIb1 Calendario Tbl IIIb1 Calendario 1	Principales ganados en la comunidad, trabajos que realizan para la cría o engorda del ganado y para el mantenimiento de la infraestructura
2.- Financiamiento	Tbl IIIb2 Financiamiento	Como pagan los productores los trabajos para la cría o engorda del ganado
3.- Insumos, maquinaria y factores de la producción	Tbl IIIb3 Insumos Tbl IIIb3 Mano de obra Tbl IIIb3 Maquinaria y equipo Tbl IIIb3 Renta de pastos	Productos o servicios que se utilizan para criar o engordar al ganado, de quien es el equipo, maquinaria o infraestructura que se utiliza. Renta de pastos, mano de obra familiar y asalariada
4.-Destino de la producción	Tbl IIIb4 Destino de la producción	Productos que se obtienen de el ganado y su utilidad
5.- Comercialización	Tbl IIIb5 Compradores	A quien se vende el ganado o el producto del ganado, precios
<b>IV.a Generalidades del sector bienes y servicios</b>		
1.- Características generales de la producción	Tbl IVa1 Características generales de la producción	Actividades fuera del campo (talleres, negocios, artesanías, etc.)
2.- Otros productores en la comunidad	Tbl IVa2 Otros productores en la comunidad	Existencia de alguien que no sea vecino pero que practique alguna actividad fuera del campo en la comunidad

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

3.- Organización	Tbl IV a3 Organización Tbl IV a3 Organización 1	Organizaciones sociales en la comunidad que ayuden al desarrollo de actividades fuera de la agricultura o ganadería
4.- Financiamiento de la actividad	Tbl IVa 4 Financiamiento de la actividad	Como se pagan los trabajos y financian los demás gastos para el desarrollo de la actividad
5.- Asesoría	Tbl IVa5 Asesoría	Asesoría para el desarrollo de la actividad y quien lo proporciona
<b>IV.b Producción de Bienes y Servicios</b>	Tbl IVb1 Calendario	Principales bienes y servicios a los que se dedica la comunidad
1.- Calendario	Tbl IVb1 Calendario 1	
2.- Financiamiento	Tbl IVb2 Financiamiento	Como pagan los productores los trabajos relacionados a la actividad (fondos propios, créditos bancarios, cajas de ahorro, etc.)
3.- Insumos, maquinaria y factores de la producción	Tbl IVb3 Insumos Tbl IVb3 Mano de obra Tbl IVb3 Maquinaria y equipo Tbl IVb3 Renta de la tierra y locales	Insumos, maquinaria y equipo, renta de la tierra o locales y mano de obra familiar o asalariada
4.- Destino de la producción o servicios	Tbl IVb4 Destino de la producción o servicios	Productos o servicios generados por la actividad, destino (consumo familiar, animal o venta)
5.- Comercialización	Tbl IVb5 Compradores	A quien se vende el producto o servicio generado en la actividad
<b>V.a. Generalidades del aprovechamiento de Recursos Naturales</b>	Tbl Va1 Características generales de la producción	Tipos de recursos naturales que se aprovechan del bosque o montes, ríos y lagos, o minas, instalaciones para el procesamiento de los recursos
1.- Características generales de la producción	Tbl Va1 Características generales de la producción 1	
2.- Otros productores en la comunidad	Tbl Va2 Otros productores en la comunidad	Existencia de personas que no sea vecino pero que aproveche los recursos naturales de la comunidad
3.- Organización	Tbl Va3 Organización Tbl Va3 Organización 1	Organizaciones sociales en la comunidad que ayudan al aprovechamiento de los recursos naturales
4.- Financiamiento	Tbl Va4 Financiamiento del aprovechamiento	Como se pagan los trabajos y financian los demás gastos para el

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

			aprovechamiento de los recursos naturales
5.- Asesoría	Tbl Va5 Asesoría		Asesoría para el aprovechamiento de los recursos naturales
6.- Siniestros	Tbl Va6 Siniestros Tbl Va6 Siniestros 1 Tbl Va6 Siniestros 2		Principales siniestros para el aprovechamiento de recursos naturales en la comunidad
<b>V.b Aprovechamiento de recursos principal</b>			
1.- Calendario	Tbl Vb1 Calendario Tbl Vb1 Calendario 1		Principales recursos naturales que son aprovechados en la comunidad
2.- Financiamiento	Tbl Vb2 Financiamiento		Como pagan los productores los trabajos relacionados al aprovechamiento de el recurso natural
3.- Insumos, maquinaria y factores de la producción	Tbl Vb3 Insumos Tbl Vb3 Mano de obra Tbl Vb3 Maquinaria y equipo Tbl Vb3 Renta de la tierra y locales		Productos, materias primas o servicios que se usan para el aprovechamiento del recurso natural principal. Tipo de maquinaria o infraestructura que se utilizan para el recurso natural. Renta de la tierra y locales Mano de obra familiar o asalariada
4.- Destino de la producción	Tbl Vb4 Destino de la producción		Productos generados por el aprovechamiento de el recurso natural principal de la comunidad
5.- Comercialización	Tbl Vb5 Compradores		A quien se vende el recurso o producto aprovechado, a que precio, en que fechas, de donde es el comprador.
<b>ENCUESTA HOGARES: 80 bases</b>			
SECCIÓN	NOMBRE DE LA TABLA EN LA BASE DE DATOS		INFORMACIÓN CONTENIDA
1. Vivienda	1 Vivienda		<b>Materiales de construcción y servicios de la vivienda.</b>
2. Miembros del hogar	2 NiñosEHijosFuera		<b>Niños menores de 6 años e hijos del jefe que no viven en el hogar.</b>

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

	2 Sociodemografía	Datos sociodemográficos y escolaridad de los miembros del hogar.
	2 GastosEducación	Gastos en educación de los miembros del hogar.
	2 HistoriaDeTrabajo	Historia laboral de los miembros del hogar
	2 HistoriaTrabajoLocalidad	Historia laboral en la localidad de residencia por sector y de 1980-2002.
	2 HistoriaTrabajoMexico	Historia laboral en otras partes de México, por sector, estado y de 1980-2002.
	2 HistoriaTrabajoEUA	Historia laboral en EUA por sector, estado y de 1980- 2002.
	2 TrabajoEUA2002	Lugar y meses de trabajo en EUA, gastos de viaje, ingresos y remesas.
	2 TrabajoMexico2002	Lugar y meses de trabajo en otras partes de México, gastos de viaje, ingresos y remesas.
	2 TrabajoLocalCampo	Meses y lugar de trabajo, salario y gastos en transporte como trabajador de planta y/o jornalero en el campo.

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

	2 TrabajoLocalFueraCampo	Tipo, meses y lugar de trabajo, salario, gastos en transporte como trabajador de planta y/o eventual fuera del campo.
	2 ParientesA	Escolaridad, lengua y algunos datos de migración de padre y madre del jefe de hogar y su cónyuge.
	2 ParientesB	Número de hermanos y su lugar de residencia del jefe del hogar y cónyuge
3. Parcelas	3 CaracterísticasGenerales	Características generales de las parcelas del hogar: superficie, calidad del suelo y tenencia.
	3 OtrasCaracterísticas	Uso de la parcela, cultivos practicados en 2002, ciclos agrícolas y tipo de riego.
	3 RentayPréstamo	Información sobre parcelas rentadas y/o prestadas a otras personas y de otras personas.*
	3 Producción	Volumen de la producción de los cultivos practicados y superficie sembrada. Problemas en las parcelas.*
	3 ProcampoySemilla	Tipo de semilla utilizada, cantidad, precio y lugar de compra. Si el hogar recibió PROCAMPO o no.*
	3 AbonoyFertilizantes	Fertilizantes utilizados: cantidad, precio y lugar de compra.*
	3 Plaguicidas	Plaguicidas utilizados: cantidad, precio y lugar de compra.*
	3 Asalariados	Salario y número de personas contratadas por mes para las labores agrícolas.*
	3 MaqHastaSiembra	Tipo y costo de maquinaria utilizada en las actividades hasta la siembra.*
	3 ManoObraHastaSiembra	Empleo de mano de obra contratada y familiar en actividades hasta la siembra.*
	3 MaqDSiembrayACosecha	Tipo y costo de maquinaria utilizada en las



**DIAGNÓSTICO INICIAL**

			actividades después de la siembra y antes de la cosecha.*
		3 ManoObraDSiembrayACosecha	Empleo de mano de obra contratada y familiar en actividades después de la siembra y antes de la cosecha.*
		3 CosechaMaqManoObra	Tipo y costo de maquinaria utilizada en las actividades después de la siembra y antes de la cosecha. Empleo de mano de obra contratada y familiar en la cosecha.*
		3 InversiónMaq	Inversión para el mejoramiento de las parcelas, tipo y costo de materiales y maquinaria utilizados.*
		3 InversiónManoObras	Empleo de mano de obra familiar y contratada en el mejoramiento de las parcelas.*
4. Cultivos		4 ContabilidadCultivos	Volumen de almacenaje, producción, compras, ventas y consumo total de cultivos. Consumo del hogar, tanto humano como para los animales, de los cultivos.*
		4 VentasCultivos	Volumen de ventas de cultivos. Precio, tipo de comprador y lugar de venta. Gastos en transporte por la venta.*
		4 ComprasCultivos	Volumen de compras de cultivos. Precio, tipo de proveedor y lugar de compra. Gastos en transporte por la compra.*

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

5. Ganadería	5 ContabilidadGanadería	Número de animales comprados, vendidos, nacidos, muertos, y regalados durante 2002. Valor del animal al inicio de 2002 y de 2003.
	5 VentasGanadería	Volumen de ventas de animales en pie y/o canal. Precio, tipo de comprador y lugar de venta. Gastos en transporte por la venta.*
	5 ComprasGanadería	Valor total de animales comprados, tipo de proveedor y lugar de compra. Gastos en transporte para la compra.*
	5 AlimentaciónGanadería	Alimento propio o comprado para la cría o engorda de los animales: costos, tipo de alimento y lugar de compra.*
	5 Pastos	Uso de pastos propios y/o costo de pastos rentados. Localización de los pastos.*
	5 InsumosGanadería	Gastos en insumos veterinarios como vacunas, medicinas, servicios veterinarios y otros, así como el lugar donde se realizaron estos gastos.*
	5 ManoObraGanadería	Empleo de mano de obra contratada y familiar para el cuidado de los animales.*
	5 MaquinariaGanadería	Tipo, propiedad y costo de maquinaria utilizada en la actividad. Duración útil de la maquinaria.*

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

	5. ProductosAnimales	Tipo de producto, volumen de producción en 2002 y precio de venta. Tipo de cliente y lugar de ubicación del mismo. Gasto en transporte para el producto.
6. Bienes y Servicios	6 VentasyAutoconsumoByS	Monto de las ventas del negocio, lugar de origen de los clientes, costo de transportar los productos o servicios y valor del autoconsumo de estos.*
	6 MaquinariaByS	Tipo, propiedad y costo de maquinaria utilizada en la actividad. Duración útil de la maquinaria.*
	6 MaterialesByS	Tipo, propiedad y costo del material utilizado en la actividad.*
	6 ImpuestosByS	Gastos por impuestos de la actividad.*
	6 ManoObraByS	Empleo de mano de obra contratada y familiar para la actividad.*
7. Recursos Naturales	7 VentasyAutoconsumoRN	Tipo de recurso natural aprovechado. Monto de las ventas del recurso, el lugar de origen de los clientes, el costo de transportar el recurso y el autoconsumo de estos.*
	7 OrigendelRecursoRN	Fuente de origen del recurso, tipo de propiedad de la fuente y localización del recurso.*

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

		7 MaterialesRN	Tipo, propiedad y costo del material utilizado en la actividad.*
		7 MaquinariaRN	Tipo, propiedad y costo de maquinaria utilizada en la actividad. Duración útil de la maquinaria.*
		7 ManoObraRN	Empleo de mano de obra contratada y familiar para la actividad.*
8. Otros gastos e ingresos		8 BienesDuraderos	Tipo de intercambio (compra o venta), gastos por adquisición del bien, lugar de compra y/o venta, e ingreso por venta.*
		8 ComprasAnuales	Gastos en: ropa, zapatos, juguetes, herramientas para el hogar, consultas médicas y medicinas, hospitales, fiestas y viajes de paseo.*
		8 GastosMensualesySemanales	Pago de servicios: energía eléctrica, agua, teléfono y cablevisión, gasto en combustibles como leña, gas y gasolina.*
		8 ElMandado	Gasto en el mandado del hogar clasificado en compras a vendedores ambulantes, vecinos de la localidad, vecinos de otras localidades, tortillería, carnicería, tiendas de la localidad, tianguis y supermercados.*

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

	8 OtrosIngresosyGastos	Recursos otorgados por el gobierno mediante los programas sociales Procampo, Progresia y otros orientados al sector rural. Ingresos y gastos relacionados con organizaciones privadas, otros hogares y el pago de impuestos.*
	8 Construcción	Tipo de propiedad de la vivienda, gastos por renta y/o préstamo. Forma de adquisición de la vivienda y año. Gastos por construcción.*
	8 ObrasMateriales	Gastos en materiales utilizados en las obras de construcción realizadas a la vivienda del hogar.*
	8 ObrasManoObra	Empleo de mano de obra contratada y familiar para la actividad.*
9. Activos	9 PropiedadActivos	Tipo y porcentaje del activo que poseía el hogar.* Año y forma de adquisición del activo. Valor en el año de compra y duración del activo. Valor de compra y/o pagos en 2002 por los activos y lugar donde se realizó el gasto.
	9 RentayNegociosActivos	Valor de la renta del activo y ganancias con negocios realizados con el mismo.*

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

10. Herencia y crédito	10 HerenciaHistoriaCrédito	El propósito de esta sección es conocer la experiencia de los miembros del hogar en cuanto al crédito, para ello se realizan preguntas sobre préstamos bancarios, utilización de tarjetas de crédito y cuentas bancarias, además se indaga sobre los préstamos informales, tanto los solicitados por los miembros del hogar como los que éste concedió a otras personas.*
	10 Préstamos	
Tiendas y negocios de hogares muestra	T ComprasFueraComunidad	Tipo de mercancías compradas y lugar donde se realizaron las compras.*
	T ComerciantesVisitanComunidad	Tipo de mercancías compradas a comerciantes que visitan la localidad y lugar de donde viene el comerciante.*
	T ComprasDentroComunidad	Tipo de mercancías compradas a comerciantes de la localidad y lugar donde compraron las mercancías.*
	T Ganacias	Porcentaje de ganancia por las ventas.*
	T Varios	Ingresos por ofrecer servicio de teléfono y de molino. Gastos por pago de impuestos, transporte y energía eléctrica.*
	T ManoObra	Empleo de mano de obra contratada y familiar para la actividad.*
Pesca	Pesca_VentasyAutoconsumo	Especie o tipo de pescado y/o marisco. Monto de las ventas del producto, el lugar de origen del cliente, el costo de transportar el producto y el autoconsumo de éste.*

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

	Pesca_EmbarcaciónMaquinaria	<b>Tipo, propiedad y costo de maquinaria y/o equipo utilizado en la actividad. Duración útil de la maquinaria.*</b>
	Pesca_MaterialesyOtros	<b>Tipo, propiedad y costo del material utilizado en la actividad.*</b>
	Pesca_ImpuestosPermisos	<b>Pago de impuestos o multas pagados por la actividad. Tipo de trámite.*</b>
	Pesca_Manodeobra	<b>Empleo de mano de obra contratada y familiar para la actividad.*</b>
Tiendas y negocios independientes de hogares muestra	T ComprasFueraComunidad	<b>Tipo de mercancías compradas y lugar donde se realizaron las compras.*</b>
	T ComerciantesVisitanComunidad	<b>Tipo de mercancías compradas a comerciantes que visitan la localidad y lugar de donde viene el comerciante.*</b>
	T ComprasDentroComunidad	<b>Tipo de mercancías compradas a comerciantes de la localidad y lugar donde compraron las mercancías.*</b>
	T Ganacias	<b>Porcentaje de ganancia por las ventas.*</b>
	T Varios	<b>Ingresos por ofrecer servicio de teléfono y de molino. Gastos por pago de impuestos, transporte y energía eléctrica.*</b>

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

	T ManoObra	Empleo de mano de obra contratada y familiar para la actividad.*	
<b>Número de casos en cada una de las bases</b>	<b>ENCUESTA COMUNITARIA</b>		
	<b>APARTADO</b>	<b>TABLA</b>	<b>CONTENIDO</b>
	1.- Datos Generales de la Comunidad	Tbl I Datos Generales de la Comunidad	80
	2.- Principales actividades productivas de la comunidad	Tbl I2 Principales actividades productivas en la comunidad	344
		Tbl I2 Principales actividades productivas en la comunidad 1	219
		Tbl I2 Principales actividades productivas en la comunidad 2	117
		Tbl I2 Principales actividades productivas en la comunidad 3	94
		Tbl I2 Principales actividades productivas en la comunidad 4	134
		Tbl I2 Principales actividades productivas en la comunidad 5	150
		Tbl I2 Principales actividades productivas en la comunidad 6	139
	3.- Obras Públicas y su financiamiento	Tbl I3 Obras públicas y su financiamiento	450
	4.- Migración	Tbl I4 Migración Internacional	80
		Tb1 I4 Migración Nacional	80
		Tb1 I4 Remesas	80
		Tbl I4 Remesas final	80
		Tbl I4 Envío de dinero	208
Tbl I4 Envío de dinero 1		108	
5.- Mercados	Tbl I4 Cambio de dólares	129	
	Tbl I5 Compra de productos	428	
	Tbl I5 Compra de productos 1	571	
	Tbl I5 Pago de Servicios	387	



**DIAGNÓSTICO INICIAL**

	Tbl I5 Servicios	625
	Tbl I5 Venta de productos	180
6.- Precios	Tbl I6 Precios	1040
7.- Educación	Tb1 I7 Educación	80
	Tb1 I7 Educación 1	270
8.- Salud	Tb1 I8 Salud	80
9.- Transporte	Tb1 I9 Transporte	397
10.- Programas gubernamentales	Tb1 I10 Programas gubernamentales	382
11.- Uso y tenencia de la tierra en el año 2002	Tb1 I11 Uso de la tierra	80
	Tb1 I11 Uso de la tierra 1	80
	Tb1 I11 Uso de la tierra 2	100
	Tb1 I11 Uso de la tierra 3	166
	Tb1 I11 Uso de la tierra 4	98
	Tb1 I11 Uso de la tierra 5	84
	Tb1 I11 Venta y renta de tierras	116
12.- Política y religión	Tb1 I12 Política y religión	80
<b>Ila Generalidades de la agricultura</b>		
1.- Características generales de la producción	Tb1 Ila1 Características generales de la producción	324
	Tb1 Ila1 Características generales de la producción 1	80
	Tb1 Ila1 Características generales de la producción 2	137
2.- Otros productores en la comunidad	Tb1 II a2 Otros productores en la comunidad	81
3.- Organización	Tb1 Ila3 Organización	80
	Tb1 Ila3 Organización 1	93
4.- Financiamiento de la producción de cultivos	Tb1 Ila4 Financiamiento de la producción de cultivos	308
5.- Asesoría	Tb1 Ila5 Asesoría	297
6.- Siniestros	Tb1 Ila6 Siniestros	216
	Tb1 Ila6 Siniestros 1	80
	Tb1 Ila6 Siniestros 2	80
<b>Ilb Cultivo Principal</b>		
1.- Calendario	Tb1 Iib1 Calendario	107
	Tb1 Iib1 Calendario 1	722

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

2.- Financiamiento	Tbl IIb2 Financiamiento	107
3.- Insumos, maquinaria y factores de la producción	Tbl IIb3 Insumos	282
	Tbl IIb3 Mano de obra	696
	Tbl IIb3 Maquinaria y equipo	283
	Tbl IIb3 Renta de la tierra	109
4.- Destino de la producción	Tbl IIb4 Destino de la producción	139
5.- Comercialización	Tbl IIb5 Almacenamiento	107
	Tbl IIb5 Compradores	131
<b>IIc Producción de maíz</b>	Tbl IIc Tipos de maíz	101
0.- Tipos de maíz	Tbl IIc Tipos de maíz 1	80
	Tbl IIc Tipos de maíz 2	163
	Tbl IIc Tipos de maíz 3	80
	1.- Calendario	Tbl IIc1 Calendario
2.- Financiamiento	Tbl IIc2 Financiamiento	80
3.- Insumos, maquinaria y factores de la producción	Tbl IIc3 Insumos	222
	Tbl IIc3 Mano de obra	535
	Tbl IIc3 Maquinaria y equipo	212
	Tbl IIc3 Renta de la tierra	80
4.- Destino de la producción	Tbl IIc4 Destino de la producción	190
5.- Comercialización	Tbl IIc5 Almacenamiento	80
	Tbl IIc5 Compradores	144
	Tbl IIc5 De la milpa a la tortilla	80
	Tbl IIc5 De la milpa a la tortilla 1	86
	Tbl IIc5 De la milpa a la tortilla 2	80
	Tbl IIc5 De la milpa a la tortilla 3	89
<b>IIIa Generalidades de la Ganadería</b>	Tbl IIIa1 Características de la producción	216
1.- Características generales de la producción	Tbl IIIa1 Características de la producción 1	80
	Tbl IIIa1 Características de la producción 2	80
2.- Otros productores de ganado en comunidad	Tbl IIIa2 Otros productores en la comunidad	80
3.- Organización	Tbl IIIa3 Organización	80

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

	Tbl IIIa3 Organización 1	81
4.- Financiamiento de la cría o engorda de animales	Tbl IIIa4 Financiamiento de la cría o engorda de animales	207
5.- Asesoría	Tbl IIIa5 Asesoría	206
6.- Siniestros	Tbl IIIa6 Siniestro	130
	Tbl IIIa6 Siniestros 1	80
	Tbl IIIa6 Siniestros 2	80
<b>III.b Crianza o engorda de ganado principal</b>	Tbl IIIb1 Calendario	91
1.- Calendario	Tbl IIIb1 Calendario 1	377
2.- Financiamiento	Tbl IIIb2 Financiamiento	92
3.- Insumos, maquinaria y factores de la producción	Tbl IIIb3 Insumos	406
	Tbl IIIb3 Mano de obra	369
	Tbl IIIb3 Maquinaria y equipo	242
	Tbl IIIb3 Renta de pastos	91
4.-Destino de la producción	Tbl IIIb4 Destino de la producción	178
5.- Comercialización	Tbl IIIb5 Compradores	165
<b>IV.a Generalidades del sector bienes y servicios</b>	Tbl IVa1 Características generales de la producción	149
1.- Características generales de la producción		
2.- Otros productores en la comunidad	Tbl IVa2 Otros productores en la comunidad	81
3.- Organización	Tbl IV a3 Organización	80
	Tbl IV a3 Organización 1	81
4.- Financiamiento de la actividad	Tbl IVa 4 Financiamiento de la actividad	145
5.- Asesoría	Tbl IVa5 Asesoría	140
<b>IV.b Producción de Bienes y Servicios</b>	Tbl IVb1 Calendario	83
1.- Calendario	Tbl IVb1 Calendario 1	140
2.- Financiamiento	Tbl IVb2 Financiamiento	83
3.- Insumos, maquinaria y factores de la producción	Tbl IVb3 Insumos	140
	Tbl IVb3 Mano de obra	140
	Tbl IVb3 Maquinaria y equipo	135
	Tbl IVb3 Renta de la tierra y locales	83

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

4.- Destino de la producción o servicios	Tbl IVb4 Destino de la producción o servicios	93
5.- Comercialización	Tbl IVb5 Compradores	93
<b>V.a. Generalidades del aprovechamiento de Recursos Naturales</b>	Tbl Va1 Características generales de la producción	111
1.- Características generales de la producción	Tbl Va1 Características generales de la producción 1	80
2.- Otros productores en la comunidad	Tbl Va2 Otros productores en la comunidad	80
3.- Organización	Tbl Va3 Organización	80
	Tbl Va3 Organización 1	82
4.- Financiamiento	Tbl Va4 Financiamiento del aprovechamiento	109
5.- Asesoría	Tbl Va5 Asesoría	109
6.- Siniestros	Tbl Va6 Siniestros	99
	Tbl Va6 Siniestros 1	80
	Tbl Va6 Siniestros 2	80
<b>V.b Aprovechamiento de recursos principal</b>	Tbl Vb1 Calendario	80
1.- Calendario	Tbl Vb1 Calendario 1	114
2.- Financiamiento	Tbl Vb2 Financiamiento	80
3.- Insumos, maquinaria y factores de la producción	Tbl Vb3 Insumos	90
	Tbl Vb3 Mano de obra	116
	Tbl Vb3 Maquinaria y equipo	80
	Tbl Vb3 Renta de la tierra y locales	80
4.- Destino de la producción	Tbl Vb4 Destino de la producción	87
5.- Comercialización	Tbl Vb5 Compradores	87
<b>ENCUESTA HOGARES</b>		
SECCIÓN	NOMBRE DE LA TABLA EN LA BASE DE DATOS	INFORMACIÓN CONTENIDA
1. Vivienda	1 Vivienda	<b>1765</b>
2. Miembros del hogar	2 NiñosEHijosFuera	<b>2667</b>

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

	2 Sociodemografía	<b>8520</b>
	2 GastosEducación	<b>8520</b>
	2 HistoriaDeTrabajo	<b>5131</b>
	2 HistoriaTrabajoLocalidad	<b>5174</b>
	2 HistoriaTrabajoMexico	<b>1241</b>
	2 HistoriaTrabajoEUA	<b>826</b>
	2 TrabajoEUA2002	<b>531</b>
	2 TrabajoMexico2002	<b>546</b>
	2 TrabajoLocalCampo	<b>1063</b>
	2 TrabajoLocalFueraCampo	<b>1211</b>
	2 ParientesA	<b>6619</b>
	2 ParientesB	<b>3357</b>
3. Parcelas	3 CaracterísticasGenerales	<b>1437</b>
	3 OtrasCaracterísticas	<b>1437</b>
	3 RentayPréstamo	<b>276</b>
	3 Producción	<b>1835</b>
	3 ProcampoySemilla	<b>1634</b>
	3 AbonoyFertilizantes	<b>944</b>
	3 Plaguicidas	<b>810</b>
	3 Asalariados	<b>19</b>
	3 MaqHastaSiembra	<b>1065</b>
	3 ManoObraHastaSiembra	<b>1158</b>
	3 MaqDSiembrayACosecha	<b>680</b>
	3 ManoObraDSiembrayACosecha	<b>1179</b>
	3 CosechaMaqManoObra	<b>1092</b>
	3 InversiónMaq	<b>146</b>
	3 InversiónManoObras	<b>142</b>
4. Cultivos	4 ContabilidadCultivos	<b>1211</b>

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

	4 VentasCultivos	<b>539</b>
	4 ComprasCultivos	<b>454</b>
5. Ganadería	5 ContabilidadGanadería	<b>3151</b>
	5 VentasGanadería	<b>477</b>
	5 ComprasGanadería	<b>513</b>
	5 AlimentaciónGanadería	<b>1868</b>
	5 Pastos	<b>553</b>
	5 InsumosGanadería	<b>525</b>
	5 ManoObraGanadería	<b>1698</b>
	5 MaquinariaGanadería	<b>747</b>
	5. ProductosAnimales	<b>616</b>
	6. Bienes y Servicios	6 VentasyAutoconsumoByS
6 MaquinariaByS		<b>425</b>
6 MaterialesByS		<b>592</b>
6 ImpuestosByS		<b>42</b>
6 ManoObraByS		<b>347</b>
7. Recursos Naturales	7 VentasyAutoconsumoRN	<b>1137</b>
	7 OrigendelRecursoRN	<b>1137</b>
	7 MaterialesRN	<b>245</b>
	7 MaquinariaRN	<b>841</b>
	7 ManoObraRN	<b>1081</b>
8. Otros gastos e ingresos	8 BienesDuraderos	<b>1864</b>
	8 ComprasAnuales	<b>1765</b>
	8 GastosMensualesySemanales	<b>1764</b>

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

	8 ElMandado	<b>1765</b>
	8 OtrosIngresosyGastos	<b>1765</b>
	8 Construcción	<b>1765</b>
	8 ObrasMateriales	<b>578</b>
	8 ObrasManoObra	<b>404</b>
9. Activos	9 PropiedadActivos	<b>996</b>
	9 RentayNegociosActivos	<b>60</b>
10. Herencia y crédito	10 HerenciaHistoriaCrédito	<b>1047</b>
	10 Préstamos	<b>1439</b>
Tiendas y negocios de hogares muestra	T ComprasFueraComunidad	<b>33</b>
	T ComerciantesVisitanComunidad	<b>66</b>
	T ComprasDentroComunidad	<b>12</b>
	T Ganacias	<b>37</b>
	T Varios	<b>37</b>
	T ManoObra	<b>37</b>
Pesca	Pesca_VentasyAutoconsumo	<b>65</b>
	Pesca_EmbarcaciónMaquinaria	<b>62</b>
	Pesca_MaterialesyOtros	<b>96</b>
	Pesca_ImpuestosPermisos	<b>26</b>
	Pesca_Manodeobra	<b>26</b>
Tiendas y negocios independientes de hogares muestra	T ComprasFueraComunidad	
	T ComerciantesVisitanComunidad	
	T ComprasDentroComunidad	
	T Ganacias	
	T Varios	

**DIAGNÓSTICO INICIAL**

	T ManoObra
<b>¿La base contiene ponderar/factor de expansión?</b>	No
<b>Estado inicial de la información</b>	<p>Todas las bases contenidas en la ENHRUM se tuvieron que transformar de Access a Spss tanto las bases que corresponden a los cuestionarios como las bases de códigos y catálogos.</p> <p>ENCUESTA COMUNITARIA</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ninguna de las variables de ésta encuesta está etiquetada.</li> <li>- Ninguna de las variables conservó su nombre original debido al cambio de Access a Spss, por lo que todas las variables de todas las bases de la encuesta se etiquetaron sobre la base del número de pregunta correspondiente.</li> <li>- Las bases de datos de la encuesta sólo tenían caracteres especiales en el nombre de las variables debido al cambio de Access a Spss.</li> <li>- Ninguna de las respuestas previstas para cada pregunta tiene etiqueta.</li> <li>- No hay valores perdidos.</li> </ul> <p>ENCUESTA HOGARES</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ninguna de las variables de ésta encuesta está etiquetada.</li> <li>- Las bases de datos de la encuesta no tiene caracteres especiales.</li> <li>- Ninguna de las respuestas previstas para cada pregunta tiene etiqueta.</li> <li>- No hay valores perdidos.</li> </ul>



**TRATAMIENTO**

**Encuesta Nacional a Hogares Rurales de México (ENHRUM)**

<b>¿Si hay caracteres especiales en las respuestas u otras opciones de respuesta no permitidas, ¿en qué preguntas y de qué cuestionarios? ¿Qué tipo de carácter o respuesta era?</b>	<p>La Encuesta Nacional a Hogares Rurales de México (ENHRUM) está integrada por la Encuesta Comunitaria y la Encuesta Hogares.</p> <p>En el caso de la Encuesta Comunitaria el nombre de las todas las variables se tuvo que cambiar ya que después de transformar las bases de Access a Spss dicho nombre incluía caracteres especiales.</p> <p>En el caso de la Encuesta Hogares no había caracteres especiales antes ni después de transformar a Spss las bases que la integran.</p>
<b>¿Se cambiaron de formato tipo cadena a numéricas algunas respuesta de las preguntas? ¿Cuáles y de qué cuestionario?</b>	<p>Las Encuestas Comunitaria y Hogares contenían principalmente variables tipo numérica. La Encuesta Comunitaria contiene al menos 2 variables tipo cadena en cada una de las bases. Sin embargo no se cambiaron a formato numérico ya que tales preguntas tenían un formato abierto de respuesta. En ese sentido había tantas opciones como casos.</p>
<b>¿Se pueden unir pegaron bases de datos de los cuestionarios? ¿De qué cuestionarios? ¿Cuál(es) deben ser las variable(s) llave?</b>	<p>Las bases se pueden pegar, pero no para formar una base de datos para cada tipo de encuesta. Las llaves varían dependiendo del cuestionario al que corresponden las bases.</p>
<b>Análisis de valores perdidos de las variables</b>	<p>La Encuesta Comunitaria no tiene valores perdidos en sus respectivas bases.</p> <p>La Encuesta Hogares tiene valores perdidos pero sólo en los casos que tienen justificación en virtud de las respuestas anteriores.</p>
<b>Comentarios adicionales del estado final de la información</b>	<p>Ninguno.</p>

**COMENTARIOS FINALES PARA SU UTILIZACIÓN**

**Encuesta Nacional a Hogares Rurales de México (ENHRUM)**

<b>Recomendaciones para su uso</b>	El nombre de las todas las variables de la Encuesta Comunitaria se tuvo que cambiar ya que después de transformar las bases de Access a Spss dicho nombre incluía caracteres especiales. El nuevo nombre asignado a las variables incluye: <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Número de cuestionario</li><li>▪ Número de pregunta</li><li>▪ Letra en orden alfabético (en aquellos casos en los que una pregunta del cuestionario se subdivide y no tiene número propio de acuerdo con el cuestionario correspondiente)</li></ul>
<b>Observaciones finales</b>	Ninguno





**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

## **ANX-PT-LOGM-EX-01-01. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS MOLECULARES**

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: CERO



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

### **CONTENIDO**

1. Objetivo y Alcance
2. Definiciones y Notaciones
3. Referencias
4. Interferencias
5. Medidas de seguridad
6. Equipos y materiales
7. Reactivos y Materiales de Referencia
8. Preservación y almacenamiento de las muestras
9. Control de calidad
10. Calibración
11. Desarrollo
12. Cálculos
13. Datos de desempeño del método
14. Prevención de la contaminación
15. Manejo de residuos
16. Tablas y figuras
17. Anexos



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

## **ANX-PT-LOGM-EX-01-01. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS MOLECULARES**

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: CERO



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

### **1. OBJETIVO Y ALCANCE**

#### Objetivo

Describir el procedimiento para la preparación de soluciones y reactivos moleculares.

#### Alcance

Este procedimiento incluye todas aquellas soluciones y reactivos moleculares que se emplean en el procedimiento técnico LOGM-EX-01 para llevar a cabo la extracción de ADN total y su evaluación espectrofotométrica.

### **2. DEFINICIONES**

### **3. REFERENCIAS**

Dellaporta

### **4. INTERFERENCIAS**

Asegurar la homogeneidad de todas las soluciones.

### **5. MEDIDAS DE SEGURIDAD**

En general durante el desarrollo del presente ANEXO es necesario usar bata de algodón y guantes desechables.

Las reparaciones de cualquiera de los equipos sólo se pueden llevar a cabo por personal autorizado.

No emplear los equipos si éstos presentan daños, sobre todo en el cable de corriente.

Manipular el cloroformo-octanol y el buffer de extracción CTAB 2x en la campana de extracción.

### **6. EQUIPO Y MATERIALES**

Se incluyen en el apartado 11. Desarrollo.

### **7. REACTIVOS Y MATERIALES DE REFERENCIA**

Se incluyen en el apartado 11. Desarrollo.

### **8. PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS**

No aplica.

### **9. CONTROL DE CALIDAD**

Todos los reactivos deben ser grado biología molecular o equivalente.



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

## ANX-PT-LOGM-EX-01-01. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS MOLECULARES

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: CERO



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

Revisar la caducidad y características de todos los reactivos.

### 10. CALIBRACIÓN

No aplica.

### 11. DESARROLLO

#### Extracción de ADN

#### 1) Cloroformo-Octanol 24:1 (250 mL)

##### Reactivos:

Cloroformo (99%)

Octanol (99%)

Procedimiento: Agregar 240 mL de cloroformo en un frasco de color ámbar o cubierto con papel aluminio. Adicionar 10 mL de octanol y mezclar brevemente. Almacenar a 4°C.

#### 2) Buffer de extracción a base de CTAB 2X

##### Reactivos:

Tris.HCl (100mM, pH=8.0)

EDTA (50mM, pH=8.0)

NaCl (0.7M)

CTAB (2%)

Beta-mercapto etanol (140mM)

##### Equipo:

Potenciómetro

##### Materiales:

Pipeta 25mL

Probeta 200 mL

Vaso de precipitados

Frasco estéril cubierto de aluminio

Procedimiento: Verificar con el potenciómetro los valores de pH para el Tris.HCl y el EDTA (pH=8.0). Una vez verificado se miden.

#### 3) Etanol al 70% (100mL)



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

## ANX-PT-LOGM-EX-01-01. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS MOLECULARES

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: CERO



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

### Reactivos:

Agua destilada estéril

Etanol grado biología molecular

Procedimiento: Mezclar 70 mL de etanol con 30 mL de agua destilada estéril. Almacenar en frasco de vidrio a -20° C.

#### 4) Isopropanol $\geq$ 99% (100mL)

### Reactivos:

Isopropanol grado biología molecular. Únicamente almacenar 100mL en un frasco de vidrio a -20° C.

### Soluciones para limpieza

#### 1) Etanol (1000 mL)

### Reactivos:

Agua destilada

Etanol desnaturalizado

Procedimiento: Mezclar 700 mL de etanol desnaturalizado con 300 mL de agua y agitar hasta obtener una mezcla homogénea. Almacenar en pisetas a temperatura ambiente.

#### 2) Cloro 20% (500 mL)

### Reactivos:

Hipoclorito de sodio (100 mL)

Agua destilada

Procedimiento: Mezclar 100 mL de hipoclorito de sodio en 400 mL de agua y agitar hasta obtener una mezcla homogénea. Almacenar en pisetas a temperatura ambiente.

## 12.CÁLCULOS

No aplica.

## 13.DATOS DE DESEMPEÑO DEL MÉTODO

No aplica.



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

## **ANX-PT-LOGM-EX-01-01. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS MOLECULARES**

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: CERO



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

### **14. PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN**

Mantener la superficie de la mesa de trabajo limpia antes, durante y después del proceso.

### **15. MANEJO DE RESIDUOS**

No aplica.

### **16. TABLAS Y FIGURAS**

No aplica.

### **17. ANEXOS**

No aplica.







**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

**ANX-PT-LOGM-EX-01-02  
ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS  
PARA EXTRAER EL ADN TOTAL**

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: CERO



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

## **CONTENIDO**

1. Objetivo y Alcance
2. Definiciones y Notaciones
3. Referencias
4. Interferencias
5. Medidas de seguridad
6. Equipos y materiales
7. Reactivos y Materiales de Referencia
8. Preservación y almacenamiento de las muestras
9. Control de calidad
10. Calibración
11. Desarrollo
12. Cálculos
13. Datos de desempeño del método
14. Prevención de la contaminación
15. Manejo de residuos
16. Tablas y figuras
17. Anexos



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

# ANX-PT-LOGM-EX-01-02 ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA EXTRAER EL ADN TOTAL

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: CERO



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE

### Objetivo

Describir el procedimiento para obtener la submuestra analítica a partir de la cual se llevará a cabo la extracción del ADN genómico.

### Alcance

Este procedimiento aplica a todas las muestras de semilla y harina de maíz que ingresen al laboratorio de Análisis de Organismos Genéticamente Modificados del INECC, que requieran un tratamiento para obtener la submuestra analítica.

## 2. DEFINICIONES

### MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO (MRC):

Material simple o compuesto cuyas propiedades y valores son certificados por procedimientos técnicamente válidos, acompañados por un certificado u otra documentación emitida por un organismo de certificación ISO 24276:2006.

## 3. REFERENCIAS

ISO 24276: Foodstuffs- Methods of analysis for de detection of genetically modified organisms and derived products- General requirements and definitions.

ISO 21571: Foodstuffs- Methods of analysis for de detection of genetically modified organisms and derived products- Nucleic acid extraction.

## 4. INTERFERENCIAS

Presencia de hongos o plaga.

Semillas secas que permitan la molienda.

## 5. MEDIDAS DE SEGURIDAD

En general durante el desarrollo del presente procedimiento es necesario usar bata de algodón y guantes desechables.

Las reparaciones de cualquiera de los equipos sólo se pueden llevar a cabo por personal autorizado.

No emplear los equipo si éstos presentan daños, sobre todo en el cable de corriente.

## 6. EQUIPO Y MATERIALES

Acondicionamiento de las semillas.

**Equipos**

Licudadora.



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

## ANX-PT-LOGM-EX-01-02 ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA EXTRAER EL ADN TOTAL

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: CERO



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

### **Materiales**

Cucharas de plástico.

Criocajas de cartón con capacidad para 36 y  
16 tubos de 15 y 50 mL.

Gradilla para tubos de 50, 15, 2 y 1.5 mL.

Bolsas de plástico.

Recipientes de plástico.

Tubos estériles para centrifuga de 50, 15, 2 y  
1.5 mL.

## **7. REACTIVOS Y MATERIALES DE REFERENCIAS**

ANX-PT-LOGM-EX-01-01. Preparación de soluciones y reactivos moleculares.

## **8. PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS**

Las muestras de semilla y harina de maíz deben ser almacenadas en recipientes adecuados completamente cerrados y en ambiente fresco libre de humedad con la finalidad de evitar el crecimiento de hongos y cualquier tipo de plaga (preferentemente emplear sílica en el caso de las semillas).

## **9. CONTROL DE CALIDAD**

Descartar aquellas muestras que presenten evidencia de hongos o cualquier tipo de plaga.  
Verificar la homogeneidad de las muestras una vez concluido el procedimiento.

## **10. CALIBRACIÓN**

No aplica.

## **11. DESARROLLO**

### Acondicionamiento de las semillas.

- 1) Colocar las semillas en el vaso de la licuadora, tapar con las aspas y montar el vaso en el motor.
- 2) Encender el motor para moler. Esperar 20 segundos y apagar la licuadora.

NOTA: Algunas semillas o productos derivados de maíz presentan mayor dureza que otras, de manera que si se observa que transcurridos 30 segundos no se han molido completamente las semillas, se debe proceder de la siguiente manera:

a) Apagar la licuadora y esperar unos segundos. Comenzar nuevamente la molienda. Repetir hasta que el material este molido.

NOTA: Si el motor comienza a sobrecalentarse detener el proceso unos minutos o utilizar otro motor.



**ANX-PT-LOGM-EX-01-02  
ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS  
PARA EXTRAER EL ADN TOTAL**



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: CERO

**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

- 3) Vaciar la harina obtenida en un recipiente de plástico.
- 4) Lavara los vasos entre cada cambio de muestra de la siguiente manera:
  - Enjuagar los vasos con agua corriente para eliminar el exceso de harina.
  - Agregar un chorro de hipoclorito de sodio (20%) y enjuagar vigorosamente. Enjuagar con agua corriente y descartar.
  - Añadir un chorro de etanol (70%), agitar vigorosamente y descartar.
  - Dejar secar los vasos de licuadora.
- 5) Repetir los pasos 1 a 4 hasta terminar de moler todas las muestras.
- 6) Almacenar el contenedor con cada muestra en el cuarto frío como stock.
- 7) Usar la etiqueta para almacenamiento de muestras en el cuarto frío (F/PT-CCAL-00-00-00). Registrar la información que se solicita en el formato Relación de muestras almacenadas en el cuarto frío (F/PT-CCAL-00-00-00).
- 8) Tamiza con la ayuda de un colador de plástico la cantidad de harina suficiente para llenar dos tubos de 2 mL para microcentrífuga hasta la marca que indique 0.5 mL (cantidad aproximada 200 mg).  
NOTA: En los casos que se requiera realizar extracciones del material genético a partir de 2g de muestra, tamiza con la ayuda de un colador de plástico la cantidad de harina suficiente para llenar dos tubos tipo falcón de 15 mL hasta la marca que indique 5mL (cantidad aproximada 2g).
- 9) Continuar con el proceso descrito en el PT-LOGM-EX-01.

NOTA: El tiempo empleado en el procedimiento de extracción de ADN total oscila entre 3 y 4 horas.

## 12. CÁLCULOS

No aplica.

## 13. DATOS DE DESEMPEÑO DEL MÉTODO

Indicador	Criterio del desempeño
NA	NA

## 14. PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN

Cuando se muelan muestras de granos, el recipiente de molienda debe abrirse solamente dentro de la campana de extracción, del mismo modo las muestras molidas deben manejarse dentro de la campana.



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

## **ANX-PT-LOGM-EX-01-02 ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA EXTRAER EL ADN TOTAL**

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: CERO



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

Los recipientes de molienda, las cuchillas y la tapa, deben lavarse con solución de hipoclorito al 10% cada vez que se usan.

### **15. MANEJO DE RESIDUOS**

Las semillas deberán ser molidas antes de desecharlas.

### **16. TABLAS Y FIGURAS**

No aplica.

### **17. ANEXOS**

F/PT-LOGM-01-07-00. Etiqueta para almacenamiento de muestras en el ultracongelador.

F/PT-LOGM-01-08-00. Relación de muestras almacenadas en el ultracongelador.

F/PT-CCAL-00-00-00. Etiqueta para almacenamiento de muestras en el cuarto frío.

F/PT-CCAL-00-00-00. Relación de muestras almacenadas en el cuarto frío.

Bitácora personal de quien realiza la el procedimiento (BITPER/LOGM-numero consecutivo).

Bitácora de equipos empleados durante el procedimiento (BITEQ/LOGM-número consecutivo).





**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

**PT-LOGM-EX-01. EXTRACCIÓN DE ADN  
TOTAL Y SU EVALUACIÓN  
ESPECTROFOTOMÉTRICA**

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: Cero



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

## **CONTENIDO**

1. Objetivo y Alcance
2. Definiciones y Notaciones
3. Referencias
4. Interferencias
5. Medidas de seguridad
6. Equipos y materiales
7. Reactivos y Materiales de Referencia
8. Preservación y almacenamiento de las muestras
9. Control de calidad
10. Calibración
11. Desarrollo
12. Cálculos
13. Datos de desempeño del método
14. Prevención de la contaminación
15. Manejo de residuos
16. Tablas y figuras
17. Anexo





**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

# PT-LOGM-EX-01. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL Y SU EVALUACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: Cero



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE

### Objetivo

Establecer el procedimiento a seguir para la extracción de ADN total mediante el método modificado de Doyle y Doyle, así como para evaluar la integridad y pureza del ADN obtenido.

### Alcance

Este procedimiento aplica a todas las muestras que ingresen al Laboratorio de Análisis de Organismos Genéticamente Modificados del INECC.

## 2. DEFINICIONES

### BLANCO DE EXTRACCIÓN O DE MÉTODO (M-DDMMAA):

Control usado para demostrar la ausencia de contaminación con ácidos nucleicos durante la extracción. Este control se genera adicionando en un tubo vacío, todos y cada uno de los reactivos que marca el protocolo de extracción y se lleva a través de todos los pasos de la extracción excepto que no se adiciona muestra. ISO 24276:2006

### CONTROL POSITIVO DE LA EXTRACCIÓN (PA-DDMMAA):

Control usado para demostrar que el procedimiento de extracción ha sido llevado a cabo de tal forma que permite extraer la secuencia blanco de ADN. Para este control se usa material cuyo contenido de secuencia blanco es conocido. ISO 24276:2006. En el laboratorio se usara MRC, MRP o harina previamente identificada como material GM.

### CONTROL AMBIENTAL (A-DDMMAA):

Control usado para determinar que no hay contaminación de ácidos nucleicos en el ambiente del laboratorio. Ejemplo en el aire. El control es un tubo que contiene una cantidad suficiente de agua libre de ácidos nucleicos, que se deja abierto durante todo el proceso de preparación y análisis de las muestras y que se ubica por todas partes del laboratorio. ISO 24276:2006. En el laboratorio se usara un tubo de 2 mL que contiene 100uL de agua inyectable que se sujetara a la bata del analista y que estará abierto durante todo el proceso de extracción de ADN de las muestras.

### SECUENCIA BLANCO:

Secuencia de ácidos nucleicos contenida en el genoma del hospedero que permite determinar la presencia de material genéticamente modificado (GM).

### MATERIAL DE REFERENCIA PROMOVENTE (MRP):

Harina o semilla que envía el promovente en cumplimiento a las medidas de bioseguridad descritas en los permisos de liberación al ambiente que emite la SAGARPA. Generalmente se recibe material positivo y negativo del evento que se enuncia en el permiso correspondiente. No se envía información respecto a valores de concentración, homogeneidad y composición.

### MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO (MRC):

Material simple o compuesto cuyas propiedades y valores son certificados por procedimientos técnicamente válidos, acompañados por un certificado u otra documentación emitida por un organismo de certificación. ISO 24276:2006. En el laboratorio los MRC que se emplean son harinas o ADN.

## 3. REFERENCIAS



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

## PT-LOGM-EX-01. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL Y SU EVALUACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: Cero



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

Querci, M., Jermini, M., Van den Eede, G. (2007). Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Luxemburgo: Joint Research Centre European Commission. Retrieved from <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual ES/User Manual ES full.pdf>

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15.

#### 4. INTERFERENCIAS

Verificar la homogeneidad de los MRC y las muestras antes de iniciar el proceso de extracción; además, en el caso de los MRC, asegurar la cantidad mínima recomendada citada en los certificados de análisis.

#### 5. MEDIDAS DE SEGURIDAD

En general durante el desarrollo del presente procedimiento es necesario usar bata de algodón y guantes desechables.

Las reparaciones de cualquiera de los equipos sólo se pueden llevar a cabo por personal autorizado.

No emplear los equipos si éstos presentan daños, sobre todo en el cable de corriente.

El uso de los equipos es restringido, ya que su operación implica medidas severas de control.

Manipular el cloroformo-octanol y el buffer de extracción CTAB 2x en la campana de extracción.

Evitar la inhalación de las sustancias tóxicas. Cuando se abran los frascos o tubos que las contienen, diríjirlas hacia el lado opuesto de la cara.

#### 6. EQUIPO Y MATERIALES

##### Equipo

##### Extracción ADN

Balanza analítica

Baño seco con agitación

Centrífuga de mesa sin refrigeración

Microcentrífuga sin refrigeración



# PT-LOGM-EX-01. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL Y SU EVALUACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: Cero

**INECC**

INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA Y CAMBIO CLIMÁTICO

Evaporador por centrifugación con bomba de vacío

Ultracongelador

Refrigerador con congelador

Agitador vortex

## Análisis espectrofotométrico

Nanodrop 2000

## **Materiales**

### Extracción de ADN

Tubos estériles de 50, 15, 2 y 1.5 mL para centrifuga

Espátula

Brocha

Micropipetas de los siguientes volúmenes: 100, 200 y 1000 µl.

Contenedor para vaciar líquidos y puntas usadas

Puntas para micro-pipeta estériles con y sin filtro desechables.

Picetas con cloro al 10% y etanol grado industrial al 70%

Gradilla para tubos de 50, 15, 2 y 1.5 mL.

Sanitas

Guantes de nitrilo libres de talco

Cronómetro

### Análisis espectrofotométrico

Micropipetas de 10 µl.

Guantes de nitrilo libres de talco

Puntas para micro-pipeta estériles con y sin filtro desechables

## **7. REACTIVOS Y MATERIALES DE REFERENCIA**

ANX-PT-LOGM-EX-01-01. Preparación de soluciones y reactivos moleculares.

Materiales de Referencia Certificados.

DESCRIPCION	CONCENTRACIÓN	CADUCIDAD
NK603	4.91%	VIGENTE
MON810	9.90%	VIGENTE
TC1507	9.86%	VIGENTE



## PT-LOGM-EX-01. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL Y SU EVALUACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: Cero

**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

GA21	99.98%	VIGENTE
Bt11	4.89%	VIGENTE
Bt176	5.00%	VIGENTE
DAS59122	9.87%	VIGENTE
MIR604	NA	VIGENTE
MON88017	99.05%	VIGENTE
MON89034	99.42%	VIGENTE
MIR162	99.88%	VIGENTE
Maíz no GM	0% GA21, 0% MIR604, 0% MIR162	VIGENTE

### 8. PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

El analista deberá conocer y aplicar el contenido del Anexo XI, del PTA-19 que lleva como título Manejo de Muestras en el Laboratorio de Organismos Genéticamente Modificados.

Las muestras de semilla y harina de maíz deben ser almacenadas en recipientes adecuados completamente cerrados y en ambiente fresco libre de humedad con la finalidad de evitar el crecimiento de hongos y cualquier tipo de plaga (preferentemente emplear sílica en el caso de las semillas).

Una vez que se ha extraído el ADN, se almacena a una temperatura de 0 a 4 °C si se va a emplear en el transcurso de las dos siguientes semanas. Si se va a emplear después se debe congelar a una temperatura entre -20 a -70°C. Para proteger la integridad del ADN, esté no debe ser congelado y descongelado más de cuatro veces, por lo que se deberán hacer alícuotas.

### 9. CONTROL DE CALIDAD

Todos los reactivos deben ser grado biología molecular o equivalente.

Revisar la caducidad y características de las enzimas y soluciones que se empleen en el procedimiento.

Durante el procedimiento de extracción de ADN se incluirán hasta por cada 10 muestras los siguientes controles: Blanco de método (M), Control positivo de la extracción (PA), y Control ambiental (A). La identificación de cada uno de los controles se realizará de la siguiente manera: abreviatura del control-día mes año-numero consecutivo, ejemplo M-090910-1, esto indica que es el blanco de método de la extracción de ADN que se realizó el día 09 de septiembre de 2010.

### 10. CALIBRACIÓN

No aplica.



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

## PT-LOGM-EX-01. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL Y SU EVALUACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: Cero



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

### 11. DESARROLLO

#### Extracción de ADN

Registrar en el formato F/PT-LOGM-01-01-00 las soluciones, reactivos y equipos empleados durante el desarrollo del siguiente procedimiento.

El método está diseñado para la extracción de material genético de granos de maíz y derivados (masa, tortillas, tostadas y otros productos).

- 1) Añadir 1000 µl de Buffer de extracción CTAB 2X (pre-calentado a 65°C) a cada tubo con harina de muestra o MRC.
- 2) Colocar los tubos en el baño seco con agitación a 65°C y 800 rpm durante 1 hora.
- 3) Añadir a cada tubo 500 µl de Cloroformo-Octanol (24:1). Realizar este paso en la campana de extracción.
- 4) Centrifugar los tubos a 12,000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 5) Sacar los tubos de la centrifuga. Tomar con una micropipeta de 200 µl la fase superior del contenido de cada tubo y colocarlo en un tubo nuevo.
- 6) Añadir 0.8 volúmenes de isopropanol en relación al volumen presente en cada tubo.
- 7) Centrifugar los tubos a 12,000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 8) Decantar el sobrenadante de cada tubo en un recipiente destinado a residuos. Evitar tirar la pastilla del fondo del tubo ya que está contiene el ADN.
- 9) Añadir 1000 µl de etanol (70%) a cada tubo.
- 10) Centrifugar los tubos a 12,000 rpm a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- 11) Decantar el sobrenadante de cada tubo. Colocar los tubos en el baño seco sin agitación a 45°C durante media hora o el tiempo que sea necesario para secar la pastilla.
- 12) Añadir a cada pastilla 100 µl de agua inyectable. Añadir 1 µl de RNAsa (10 mg/mL).

#### Análisis espectrofotométrico

- 1) Encender el Nanodrop2000 y la computadora. Agitar en el vortex y centrifugar cada muestra a ser analizada.
- 2) Poner el programa del equipo para medir ADN. Cargar 2 µl blanco (agua inyectable) en el aparato y realizar la calibración.
- 3) Colocar 2 µl de cada muestra y medir la absorbancia. Poner una gota de agua (1 µl) en el pedestal, bajar el brazo, volverlo a subir y limpiar con papel Kimwipe antes de cargar la siguiente muestra.
- 4) Registrar los valores que del espectrofotómetro en el formato F/PT-LOGM-01-02-00.

#### Preparación de las diluciones de trabajo a 50 ng/uL

- 1) Realizar los cálculos de la cantidad de agua y de muestra necesarias para preparar 100uL a una concentración de 50 ng/uL. Utilizar la formula  $C1V1=C2V2$ , donde: C1 es la concentración inicial



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

## PT-LOGM-EX-01. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL Y SU EVALUACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: Cero



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

de la solución stock (medida con el Nanodrop 2000), V1 es el volumen que se requiere de la solución stock, C2 es la concentración final que se requiere (50 ng/uL) y V2 es el volumen final que se requiere (100uL). Despejando V1, tenemos que  $V1=C2V2/C1$ .

- 2) Preparar las diluciones en un microtubo nuevo teniendo cuidado de agregar la cantidad de agua y de muestra calculadas. Homogeneizar repetidamente con una micropipeta.
- 3) Después de haber realizado la dilución se corrobora con ayuda del espectrofotómetro la concentración de la solución de ADN de cada muestra, la cual debe ser mayor a 50.0 y menor a 50.9 ng/uL. Realizar la evaporación o adición de agua inyectable cuantas veces sea necesario hasta obtener la concentración indicada de ADN en solución.

NOTA: Las diluciones de trabajo se almacenan a 4°C hasta por dos meses, mientras que las soluciones stock se almacenan a -80°C por más de un año. Emplear la etiqueta F/PT-LOGM-01-07-00 y registrar el ingreso de las muestras al ultracongelador en el formato F-PT-LOGM-01-08-00.

### Evaluación de resultados

Se debe comprobar que las concentraciones de las muestras se encuentren a una concentración mayor a 50 ng/uL. En caso de no superar este valor, será necesario repetir la extracción de ADN.

El índice 260/280 debe encontrarse alrededor de 1.8 (Querci M, *etal.*, 2006) y el índice 260/230 alrededor de 2.2 (Querci M, *etal.*, 2006).

Para los controles M-DDMMAA y A-DDMMAA el valor de concentración y absorbancia debe ser negativo o cero. A su vez, el valor de concentración y absorbancia para el control PA-DDMMAA debe ser similar a los valores obtenidos para las muestras.

## 12. CÁLCULOS

No aplica.

## 13. DATOS DE DESEMPEÑO DEL MÉTODO

Indicador	Criterio del desempeño
La concentración del ADN total en solución debe ser de entre 50 y 50.9ng/uL.	En caso de no contar con esta cantidad mínima indispensable de ADN, será necesario repetir la extracción.

## 14. PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN

Durante todo el proceso de extracción se deben usar puntas y microtubos nuevos, solamente en el caso de que un mismo reactivo se adicione a varias muestras se puede usar la misma punta, siempre y cuando la punta no toque el interior del tubo que contiene la muestra.



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

## **PT-LOGM-EX-01. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL Y SU EVALUACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA**

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: Cero



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

Mantener la superficie de la mesa de trabajo limpia antes, durante y después del proceso.

Si durante el protocolo de extracción se llegase a derramar alguna muestra por ruptura del tubo que las contiene, habrá que limpiar inmediatamente el interior de los pocillos del rotor y la camisa de la centrifuga que corresponda.

Si en alguna etapa del procedimiento, se contaminan los guantes habrá que cambiarlos inmediatamente para evitar contaminación entre muestras.

Cuando se requiera abrir los tubos, hay que hacerlo con mucho cuidado, para evitar salpicar el contenido del tubo y provocar una contaminación. Por lo cual, también es necesario que no se rebase el límite de llenado de los tubos, es decir, que el contenido del tubo no toque la cara interna de la tapa del tubo cuando éste se cierra. Siguiendo estas indicaciones se evitará contaminación y además pérdida de muestra.

### **15. MANEJO DE RESIDUOS**

El cloroformo-octanol, buffer de extracción e isopropanol deben almacenarse hasta su tratamiento en un recipiente de vidrio etiquetado como reactivo tóxico, usar el formato F/PTA-06-02-06.

### **16. TABLAS Y FIGURAS**

No aplica.

### **17. ANEXOS**

F/PT-LOGM-01-01-00. Registro de reactivos y equipos empleados en la extracción de ADN total por el método de CTAB.

F/PT-LOGM-01-02-00. Resultados de lectura del espectrofotómetro.

F/PT-LOGM-01-06-00. Fecha de procesamiento y análisis de muestras mediante PCR tiempo real.

F/PT-LOGM-01-07-00. Etiqueta para almacenamiento de muestras en el ultracongelador.

F/PT-LOGM-01-08-00. Relación de muestras almacenadas en el ultracongelador.

F/PT-LOGM-01-09-00. Etiqueta preparación de soluciones.

Bitácora personal de quien realiza el procedimiento (BITPER/AOGM-número consecutivo).



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES

**PT-LOGM-EX-01. EXTRACCIÓN DE ADN  
TOTAL Y SU EVALUACIÓN  
ESPECTROFOTOMÉTRICA**

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: Cero



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

Bitácora de equipos empleados durante el procedimiento (BITEQ/AOGM-número consecutivo).

ANX-PT-LOGM-EX-01-01 Preparación de soluciones.

ANX-PT-LOGM-EX-01-02 Acondicionamiento de las muestras.





PT-LOGM-EX-02.

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE  
ORGANISMOS GENÉTICAMENTE  
MODIFICADOS MEDIANTE LA REACCIÓN  
EN CADENA DE LA POLIMERASA TIEMPO  
REAL**



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: CERO

## **CONTENIDO**

1. Objetivo y Alcance
2. Definiciones y Notaciones
3. Referencias
4. Interferencias
5. Medidas de seguridad
6. Equipos y materiales
7. Reactivos y Materiales de Referencia
8. Preservación y almacenamiento de las muestras
9. Control de calidad
10. Calibración
11. Desarrollo
12. Cálculos
13. Datos de desempeño del método
14. Prevención de la contaminación
15. Manejo de residuos
16. Tablas y figuras
17. Anexo

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE  
ORGANISMOS GENÉTICAMENTE  
MODIFICADOS MEDIANTE LA REACCIÓN  
EN CADENA DE LA POLIMERASA TIEMPO  
REAL**



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: CERO

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE

### Objetivo

Detectar y/o Identificar en el ADN genómico la presencia de diferentes regiones del promotor 35S y/o del terminador NOS, así como secuencias de genes endógenos y evento específicas mediante la PCR tiempo real.

### Alcance

Este procedimiento aplica a todas las muestras de ADN que ingresen al Laboratorio de Análisis de Organismos Genéticamente Modificados del INECC que contengan una concentración mayor o igual 50 ng/ $\mu$ L.

## 2. DEFINICIONES Y NOTACIONES

### MATERIAL DE REFERENCIA PROMOVENTE (MRP):

Harina o semilla que envía el promovente en cumplimiento a las medidas de bioseguridad descritas en los permisos de liberación al ambiente que emite la SAGARPA. Generalmente se recibe material positivo y negativo del evento que se enuncia en el permiso correspondiente. No se envía información respecto a valores de concentración, homogeneidad y composición.

### MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO (MRC):

Material simple o compuesto cuyas propiedades y valores son certificados por procedimientos técnicamente válidos, acompañados por un certificado u otra documentación emitida por un organismo de certificación. ISO 24276:2006. En el laboratorio los MRC que se emplean son harinas o ADN.

### SECUENCIA BLANCO:

Secuencia de ácidos nucleicos contenida en el genoma del hospedero que permite determinar la presencia de material genéticamente modificado (GM).

## 3. REFERENCIAS

ISO 24276: Foodstuffs- Methods of analysis for de detection of genetically modified organisms and derived products- General requirements and definitions.

ISO 21571: Foodstuffs- Methods of analysis for de detection of genetically modified organisms and derived products- Nucleic acid extraction.

ISO 21569: Foodstuffs- Methods of analysis for de detection of genetically modified organisms and derived products- Qualitative nucleic acid based methods.

Querci, M. Jermini, M y G Van den Eede. "The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms". European commission, Joint Research Centre. 2006.

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE  
ORGANISMOS GENÉTICAMENTE  
MODIFICADOS MEDIANTE LA REACCIÓN  
EN CADENA DE LA POLIMERASA TIEMPO  
REAL**



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

FECHA DE CREACIÓN: 24 DE FEBRERO DE 2017

REVISIÓN: CERO

#### **4. INTERFERENCIAS**

Homogenizar adecuadamente las soluciones de ADN antes de utilizarse.

Se debe colocar adecuadamente la película adhesiva para cubrir la placa y evitar la evaporación de los reactivos.

El equipo debe mantenerse limpio, la suciedad dentro del bloque que porta la placa puede interferir en la señal que emite la reacción.

#### **5. MEDIDAS DE SEGURIDAD**

En general durante el desarrollo del presente procedimiento es necesario usar bata de algodón y guantes desechables.

Las reparaciones de cualquiera de los equipos sólo se pueden llevar a cabo por personal autorizado.

No emplear los equipo si éstos presentan daños, sobre todo en el cable de corriente.

El uso de los equipos es restringido, ya que su operación implica medidas severas de control.

#### **6. EQUIPOS Y MATERIALES**

##### **Equipo**

##### Análisis cualitativo

Microcentrífuga con o sin refrigeración

Baño seco con o sin agitación

Computadora con el programa LabWorks 4.0 instalado

Termociclador PCR tiempo real

Estación de trabajo luz UV

Impresora monocromática digital

Refrigerador con congelador

Ultracongelador

Agitador vortex

##### **Materiales**

##### Análisis cualitativo.

Tubos estériles de 0.2, 0.6 y 1.5 mL para centrifuga

Micropipetas de los siguientes volúmenes: 2, 10, 20,100, 200 y 1000 µl.

Puntas para micro-pipeta estériles con y sin filtro desechables.

Gradilla para tubos y placas de 96 pozos

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE  
ORGANISMOS GENÉTICAMENTE  
MODIFICADOS MEDIANTE LA REACCIÓN  
EN CADENA DE LA POLIMERASA TIEMPO  
REAL**



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

FECHA DE CREACIÓN: 04 DE FEBRERO DE 2015

REVISIÓN: CERO

Contenedor para vaciar líquidos y puntas usadas

Guantes de nitrilo libres de talco

Picetas con cloro al 10% y etanol grado industrial al 70%

Solución limpiadora DNAsas

Sanita

## 7. REACTIVOS Y MATERIALES DE REFERENCIA

Sybr Green Master Mix (compuesta de buffer de reacción, Polimerasa, dNTPs y  $MgCl_2$ ).

## 8. PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Una vez que se ha extraído y alicuotado el ADN se almacena a una temperatura de 0 a 4 °C si se va a emplear en el transcurso de las dos siguientes semanas. Si se va a emplear después se debe congelar a una temperatura entre -20 a -70°C. Para proteger la integridad del ADN, éste no debe ser congelado y descongelado más de cuatro veces, por lo que se deberán hacer alícuotas.

## 9. CONTROL DE CALIDAD

Todos los reactivos usados deben ser grado biología molecular o equivalente. Se debe revisar su caducidad.

Revisar la caducidad y características de las enzimas y soluciones que se empleen en el procedimiento.

Todos los equipos de análisis y las micropipetas deben estar calibrados.

## 10. CALIBRACIÓN

Referirse a IN\_LOGM-10.

## 11. DESARROLLO

Las concentraciones de las alícuotas de cada muestra a analizar deben tener valores entre 50 y 50.9ng/ $\mu$ L. De no tenerlo será necesario ajustar la concentración adicionando ADN del stock de la muestra o agua inyectable según sea el caso.

### PCR tiempo real.

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE  
ORGANISMOS GENÉTICAMENTE  
MODIFICADOS MEDIANTE LA REACCIÓN  
EN CADENA DE LA POLIMERASA TIEMPO  
REAL**



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

FECHA DE CREACIÓN: 04 DE FEBRERO DE 2015

REVISIÓN: CERO

Las muestras deben ser analizadas por triplicado. Incluir los controles: positivo, PA, negativo, A, M y NTC en cada placa.

- 1) Homogenizar el ADN molde de cada una de las muestras que se van a analizar. Para ello se mezclan los tubos con las alícuotas de las muestras a analizar y posteriormente son centrifugadas.
- 2) De acuerdo con la tabla del formato F/PT-LOGM-02-01-00 se calculan las cantidades necesarias de Sybr Green Master Mix considerando el "X" número total de muestras a analizar.

NOTA: Se recomienda hacer el cálculo para una reacción adicional por posibles errores de pipeteo.

- 3) Elegir de las tablas 1, 2 o 3 (Anexo) el juego de oligonucleótidos de acuerdo al gen endógeno que se requiera amplificar, región del P35S y Tnos o bien el evento específico a identificar.
- 4) Para preparar la mezcla de reacción se adiciona en un tubo, de 1.5 mL, la cantidad de Sybr Green Master Mix calculada en el formato F/PT-LOGM-02-02-00 (PCR tiempo real) excepto el ADN molde.

NOTA: La master mix debe prepararse en el área limpia previamente irradiada con luz UV, cada reactivo debe ser homogeneizado antes de adicionarlo a la mezcla de reacción, los reactivos deben trabajarse en hielo.

- 5) Adicionar 5 µl de la Sybr Green Master Mix en los pozos de la placa de PCR para cada una de las muestras a analizar.
- 6) A cada pozo con Sybr Green Master Mix adicionar 2 µL de ADN molde de cada una de las muestras. Mezclar cuidadosamente mediante pipeteo.

NOTA: La adición del ADN se realiza fuera del área limpia.

- 7) Sellar la placa de 96 pozos con la cubierta adhesiva, cuidando de cubrirla completamente para evitar la evaporación de los reactivos durante el proceso.
- 8) Centrifugar la placa de PCR en la microcentrífuga durante 5 segundos aproximadamente. Revisar que no haya burbujas de aire en los pozos de la placa.
- 9) Colocar la placa de PCR en el bloque de calentamiento del termociclador de PCR tiempo real. Retirar las alícuotas de muestras y conservarlas en refrigeración (4° C).
- 10) Encender el termociclador. Verificar que las condiciones de la PCR sean las adecuadas y correr el programa de acuerdo al instructivo.

## 12. CÁLCULOS

Los indicados en el formato F/PT-LOGM-02-02-00.

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE  
ORGANISMOS GENÉTICAMENTE  
MODIFICADOS MEDIANTE LA REACCIÓN  
EN CADENA DE LA POLIMERASA TIEMPO  
REAL**



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

FECHA DE CREACIÓN: 04 DE FEBRERO DE 2015

REVISIÓN: CERO

### 13. DATOS DE DESEMPEÑO DEL MÉTODO

Los controles negativos no deberán presentar amplificación, de otro modo se procederá a repetir el ensayo. En el caso de los controles positivos, la respuesta tendrá que ser favorable.

### 14. PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN

Cuando se requiera abrir los tubos, hay que hacerlo con mucho cuidado, para evitar salpicar el contenido del tubo y provocar una contaminación. Por lo cual, también es necesario que no se rebase el límite de llenado de los tubos, es decir, que el contenido del tubo no toque la cara interna de la tapa del tubo cuando éste se cierra. Siguiendo estas indicaciones se evitará contaminación y además pérdida de muestra.

Mantener la superficie de la mesa de trabajo limpia antes, durante y después del proceso.

Emplear las micropipetas destinadas para cada una de las áreas.

### 15. MANEJO DE RESIDUOS

No aplica.

### 16. TABLAS Y FIGURAS

No aplica.

### 17. ANEXO

Bitácora personal. (LOGM-número consecutivo).

Bitácora de equipos empleados durante el procedimiento. (LOGM-número consecutivo).

Secuencias de interés para la detección e identificación de Maíz GM mediante PCR en punto final y PCR en tiempo real.		
Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
Endógeno		
Zein**	Zein 3 AGT GCG ACC CAT ATT CCA G	
	Zein 4 GAC ATT GTG GCA TCA TCA TTT	
Hmg	Mhmg/Maij F2 TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA	

## PT-LOGM-EX-02.

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE  
ORGANISMOS GENÉTICAMENTE  
MODIFICADOS MEDIANTE LA REACCIÓN  
EN CADENA DE LA POLIMERASA TIEMPO  
REAL**



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

FECHA DE CREACIÓN: 04 DE FEBRERO DE 2015

REVISIÓN: CERO

	mhm-g-Rev GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT	
	Mhm-g-probe_TAMRA 6FAM CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA TAMRA	
Adh1	Adh1-F1 CCA GCC TCA TGG CCA AAG	
	Adh1-R1 CCT TCT TGG CCG CTT ATC TG	
	Adh1- FAM- CTT AGG GGC AGA CTC CCG TGT TCC CT TAMRA	
ZSIib	ZSIib-F CTCCCAATCCTTTGACATCTGC	
	ZSIib-R TCGATTTCTCTTTGGTGACAGG	
	zSIib-P FAM AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA TAMRA	
<b>Detección</b>		
pRiceactin*	pRiceac-F TCGAGGTCATTTCATATGCTTGAG	
	pRiceac-R TTTTAACATGATGTTTTCACCTTTTGACC	
	Priceac-P FAM AGAGAGTCGGGATAGTCCAAAATAAAACAAAGGTA TAMRA	
pFMV*	PFMV-F CGAAGACTTAAAGTTAGTGGGCATCT	
	PFMV-R TTTTGTCTGGTCCCAACA	
	PFMV-P FAM TGAAAGTAATCTTGTCAACATCGAGCAGCTGG TAMRA	
p35S*	SF CGTCTCAAAGCAAGTGGATTG	
	SR TCTTGCGAAGGATAGTGGGATT	
	35S-P FAM TCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCA TAMRA	
CDPK**	CDPK cry03 CTC TCG CCG TTC ATG TCC GT	
	CDPK cry04 GGT CAG GCT CAG GCT GAT GT	
cry1A**	cry1A (b)-1 ACC ATC AAC AGC CGC TAC AAC GAC C	
	cry1A (b)-2 TGG GGA ACA GGC TCA CGA TGT CCA G	
p35S	p35s1-3 CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TCC T	
	p35s1-5 ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T	
	P35Staq FAM CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT TAMRA	
Tnos	180 CAT GTA ATG CAT GAC GTT ATT TAT G	
	180 TTG TTT TCT ATC GCG TAT TAA ATG T	
	Tm-180 FAM ATG GGT TTT TAT GAT TAG AGT CCC GCA A TAMRA	
Tnos	T-NOS-84F CAT GTA ATG CAT GAC GTT ATT TAT G	
	T-NOS-84R TTG TTT TCT ATC GCT ATT AAA TGT	
pat	KVM-5 TTGAGGGTGTGTGGCTGGTA	
	KVM-6 TGTCCAATCGTAAGCGTTCTCT	
	Pat1 FAM-CTTCCAGGGCCAGCGTAAGCA	
cry1A(b)	CRY2-F CCC ATC GAC ATC AGC CTG AGC	
	CRY2-R CAGG AAG GCG TCC CAC TGG C	



PT-LOGM-EX-02.

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE  
ORGANISMOS GENÉTICAMENTE  
MODIFICADOS MEDIANTE LA REACCIÓN  
EN CADENA DE LA POLIMERASA TIEMPO  
REAL



SEMARNAT

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES



INECC

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

FECHA DE CREACIÓN: 04 DE FEBRERO DE 2015

REVISIÓN: CERO

	BTSYN FAM ATG TCC ACC AGG CCC AGC ACG MGBNFQ	
cry1A-105	CRY1A-105-F1 TCA GAG GTC CAG GGT TTA CAG G	
	CRY1A-105-R1 GTA GTA GAG GCA TAG CCG ATT CTT G	
	CRY1A-105-P FAM AGA CAT TCT TCG TCG CAC AAG TGG AGG ACC MGBNFQ	
cry2Ab2	CRY2Ab2F AAT TCT AAC TAC TTC CCC GAC TAC TTC	
	CRY2Ab2R ACGG AGA GGC GAT GTT CCT G	
	CRY2Ab-2P FAM TCT CTG GTG TTC CTC TCG TCG TCC GCA MGBNFQ	
cry1Ac	CRY1Ac-4L TAC TTG GTG GAG AAC GCA TTG AA	
	CRY1Ac-4R GAT GTC AAC TAG TCC GAG AAC GAA	
	CRY1Ac-4P FAM CAC CTG GCA CGA ACT CGC TGA GCA MGBNFQ	
Tnos	NOSter2-3 GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG	
	NOSter2-5 CGC TAT ATT TTG TTT TCT ATC GCG T	
	NOS-Taq FAM AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA TAMRA	
T35*	T35S AGG GTT TCT TAT ATG CTC AAC ACA TG	
	T35S TCA CCA GTC TCT CTC TAC AAA TCT ATC AC	
	T35S FAM AAA CCC TAT AAG AAC CCT AAT TCC CTT ATC TGG GA TAMRA	
<b>Identificación</b>		
Bt176	Bt176primer1 TGT TCA CCA GCA ACC AG	
	Bt176primer2 ACT CCA CTT TGT GCA GAA CAG ATCT	
	BT176 PEPC FAM CCG ACG TGA CCG ACT ACC ACA TCG A TAMRA	
NK603	GT73-TmF GGGATGACGTTAATTGGCTCTG	
	GT73-TmR GGCTGCTTGACCGTGAAG	
	GT73-TmP FAM CAC GCC GTG GAA ACA GAA GAC ATG ACC MGBNFQ	
TC1507	MaiY-F1 TAGTCTTCGGCCAGAATGG	
	MaiY-R3 CTTTGCCAAGATCAAGCG	
	MaiY-S1 FAM TAACTCAAGGCCCTCACTCCG TAMRA	
Bt11	Bt11JF GCG GAA CCC CTA TTT GTT TA	
	Bt11JR TCC AAG AAT CCC TCC ATG AG	
	Bt11 FAM AAA TAC ATT CAA ATA TGT ATC CGC TCA TAMRA	
DAS59122	DAS-59122-7 GGG ATA AGC AAG TAA AAG CGC TC	
	DAS-59122-7-rbIR CCT TAA TTC TCC GCT CAT GAT CAG	
	DAS-59122-7-rbIS FAM TTT AAA CTG AAG GCG GGA AAC GAC AA TAMRA	
ES3272	ES3272-F TCATCAGACCAGATTCTCTTTTATGG	
	ES3272-R CGTTTCCCGCCTTCAGTTTA	
	ES3272-P FAM ACTGCTGACGCGGGCAAACAC TG TAMRA	

PT-LOGM-EX-02.

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE  
ORGANISMOS GENÉTICAMENTE  
MODIFICADOS MEDIANTE LA REACCIÓN  
EN CADENA DE LA POLIMERASA TIEMPO  
REAL



SEMARNAT

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES



INECC

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

FECHA DE CREACIÓN: 04 DE FEBRERO DE 2015

REVISIÓN: CERO

GA21	GA21primer1 CTTATCGTTATGCTATTGCAACTTTAGA	
	GA21primer2 TGGCTCGCGATCCTCCT	
	GA21 probe FAM CATATACTA ACTCATATCTCTTTCTCAACAGCAGGTGGG TAMRA	
MON810	Mail-FI MON810 TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CGT	
	Mail-RI MON810 GCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT	
	MON810-P FAM AAC ATC CTT TGC CAT TGC CCA GCTAMRA	
MIR162	MIR162-F GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG	
	MIR162-R TGCCTTATCTGTTGCCTTCAGA	
	MIR162-P FAM TCTAGACAATTCAGTACATTAACGTCGCGCA TAMRA	
MIR604	MIR604 primerF GCGCACGCAATCAACAG	
	MIR604 primerR GGTACATAACGTGACTCCCTTAATCT	
	MIR604 probe FAM AGG CGG GAA ACG ACA ATC TGA TCA TG TAMRA	
MON89034	MIR604-P FAM AGG CGG GAA ACG ACA ATC TGA TCA TG TAMRA	
	MON89034p1 TTC TCC ATA TTG ACC ATC ATA CTC ATT	
	MON89034p2N CGG TAT CTA TAA TAC CGT GGT TTT TAA A	
NK603	MON89034 FAM ATC CCC GGA AAT TAT GTT MGBNFQ	
	NK603 F1 ATG AAT GAC CTC GAG TAA GCT TGT TAA	
	NK603 F2 ATG AAT GAC CTC GAG TAA GCT TGT TAA	
	NK603 R1 AAG AGA TAA CAG GAT CCA CTC AAA CAC T	
	NK603 R2 AAG AGA TAA CAG GAT CCA CTC AAA CAC T	
	NK603-P1 FAM TGG TAC CAC GCG ACA CAC TTC CAC TC TAMRA	
	NK603-P2 FAM TGG TAC CAC GCG ACA CAC TTC CAC TC TAMRA	
MON863	MON863 primerF GTA GGA TCG GAA AGC TTG GTA C	
	MON863 primerR TGTTACGGCCTAAATGCTGAACT	
	MON863probe FAM TGA ACA CCC ATC CGA ACA AGT AGG GTC A TAMRA	
MON88017	MON88017AF GAG CAG GAC CTG CAG AAG CT	
	MON88017AR TCC GGA GTT GAC CAT CCA	
	MON88017AP 6 FAM TCC CGC CTT CAG TTT AAA CAG AGT CGG GT TAMRA	
T25	T25-F ACAAGCGTGTGCTGCCAC	
	T25-R GACATGATACTCCTCCACCG	
	T25-P FAM TCATTGAGTCGTTCCGCCATTGTGCG TAMRA	

\*Secuencias disponibles para PCR punto final y tiempo real.

\*\*Secuencias para PCR punto final.

F/PT-LOGM-02-02-00. PCR tiempo real para amplificación de la secuencia de interés.

PT-LOGM-EX-02.

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE  
ORGANISMOS GENÉTICAMENTE  
MODIFICADOS MEDIANTE LA REACCIÓN  
EN CADENA DE LA POLIMERASA TIEMPO  
REAL**



**SEMARNAT**

SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE  
Y RECURSOS NATURALES



**INECC**

INSTITUTO NACIONAL  
DE ECOLOGÍA  
Y CAMBIO CLIMÁTICO

FECHA DE CREACIÓN: 04 DE FEBRERO DE 2015

REVISIÓN: CERO

MATERIAL	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN ( $\mu\text{L}$ )
Sybr Green Master Mix	-	3
Forward	1 $\mu\text{M}$	1
Reverse	1 $\mu\text{M}$	1
ADN muestra	50 ng/ $\mu\text{L}$	2
TOTAL		7