

PRESENCIA DE SECUENCIAS TRANSGÉNICAS EN MASA PARA TORTILLAS DE POBLADOS URBANOS Y RURALES DE LA MESETA PURÉPECHA, MICHOACÁN, MÉXICO

PRESENCE OF TRANSGENIC SEQUENCES IN TORTILLA DOUGH FROM URBAN AND RURAL COMMUNITIES OF THE MESETA PURÉPECHA, MICHOACÁN, MEXICO

Patricia Delgado-Valerio¹, Angela Ramón-Amado¹, Alma Piñeyro-Nelson^{2, 3*}, Elena R. Álvarez-Buylla^{3, 4}, N. Mariana Ayala-Angulo^{2, 5} y Agustín Molina-Sánchez¹

¹Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Uruapan, Michoacán, México. ²Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X), Departamento de Producción Agrícola y Animal, Ciudad de México, México. ³Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Centro de Ciencias de la Complejidad (C3), Ciudad de México, México. ⁴UNAM, Instituto de Ecología, Ciudad de México, México. ⁵UAM-X, Doctorado en Ciencias Agropecuarias, División CBS, Ciudad de México, México.

*Autor de correspondencia (almapineyro@gmail.com)

RESUMEN

La tortilla de maíz es un alimento básico de la dieta de los mexicanos y fuente importante de calorías y nutrientes, con un consumo diario *per cápita* elevado, por lo que la presencia de secuencias recombinantes derivadas de maíces genéticamente modificados puede ser problemático al representar una amenaza a la diversidad genética de este cultivo, la salud humana y la soberanía alimentaria. El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de las secuencias recombinantes promotor 35S (P35S CaMV) y terminador NOS (t-NOS) en muestras de masa para tortillas producidas durante 2018 en poblados urbanos y rurales de los municipios de Uruapan y Paracho en Michoacán, México. La hipótesis fue que tortillas producidas en poblados urbanos contendrían una mayor frecuencia de secuencias recombinantes que las producidas en poblados rurales, pues se asume un mayor uso de harina industrializada, donde previamente se ha documentado presencia de transgenes. Se obtuvieron muestras de masa de 92 tortillerías y se realizaron encuestas para conocer la procedencia del grano y posible uso de harina industrial en la elaboración de tortillas. Las muestras se agruparon en una zona urbana con siete sub-zonas y cuatro zonas rurales. Se analizaron 63 muestras de ADN a partir de masa para determinar la presencia de secuencias recombinantes mediante RT-PCR. Los resultados de las encuestas indicaron que el grano usado provino mayoritariamente (52 %) de Sinaloa (noroeste de México), mientras que la mayoría de productores (86.6 %) usan harina industrializada. Se detectaron transgenes en 20 de 63 muestras (32 %), con t-NOS como la secuencia más frecuente. El mayor porcentaje de muestras positivas se presentó en la zona urbana de Uruapan (80 %) y sólo hubo 5 % de positivos en zonas rurales. Esta diferencia podría deberse a un mayor uso de grano externo o harina industrializada en las zonas urbanas, mientras que en zonas rurales se utiliza grano de maíces nativos locales.

Palabras clave: *Zea mays* L., Michoacán, P35S CaMV, PCR en tiempo real, t-NOS, tortillas.

SUMMARY

Corn tortillas are a staple food for Mexican people, providing a large proportion of the daily intake of calories and nutrients, with a high *per capita* daily consumption; thus, the presence of recombinant sequences from genetically modified corn can be problematic as it represents a threat to the genetic diversity of this crop, human health and food sovereignty. The objective of this study was to evaluate the presence of the recombinant 35S promoter (P35S CaMV) and NOS terminator (t-NOS) sequences in dough samples for tortillas produced in 2018 in urban and rural communities of the

municipalities of Uruapan and Paracho in Michoacán, Mexico. The hypothesis was that tortillas from urban localities would contain a higher frequency of recombinant sequences than those produced in rural localities, as greater use of industrialized flour is assumed, where the presence of transgenes has previously been documented. Dough samples were obtained from 92 tortilla makers, and surveys were conducted to determine the origin of the grain and the possible use of industrial flour in the preparation of tortillas. The samples were grouped into an urban area with seven sub-areas and four rural areas. Sixty-three samples of DNA from the dough were analyzed for the presence of recombinant sequences using RT-PCR. Survey results indicated that the grain originated mainly (52 %) from Sinaloa (Northwestern Mexico), while the majority of producers (86.6 %) use industrialized flour. Transgenes were detected in 32 % of the samples, with t-NOS as the most frequent sequence. The highest percentage of positive samples (80 %) came from the Uruapan urban area, while only 5 % of positives were detected in rural areas. These differences could be due to the greater use of external grain or industrialized flour in urban areas, while local native corn is used in rural areas.

Index words: *Zea mays* L., CaMV P35S, Michoacán, real-time PCR, t-NOS, tortillas.

INTRODUCCIÓN

En México, las tortillas son la preparación más común en la que se consume la mayoría del maíz (*Zea mays* subsp. *mays* L.). En las zonas urbanas, este alimento generalmente se elabora industrialmente con maíz blanco híbrido, que es nixtamalizado para obtener la masa, que a su vez se combina con harinas industrializadas o usando las harinas solas (CEDRSSA, 2014); en contraste, en las zonas rurales un porcentaje importante de la tortilla es elaborada de manera artesanal, a partir de la nixtamalización de maíces nativos producidos por las comunidades campesinas para el autoconsumo. Estas comunidades comercializan sus excedentes en mercados regionales, tianguis o en el comercio ambulante local (CEDRSSA, 2014; Colín-Chávez et al., 2020). Otra modalidad son las tortillerías rurales, que comúnmente usan grano local y lo nixtamalizan para producir tortillas con el uso de maquinaria (Arnés y Astier,

2019; CEDRSSA, 2014). La diversificación de maíces para la elaboración de tortilla en las localidades rurales ha existido históricamente, y se ha derivado de conocimientos transmitidos de generación en generación (Vizcarra, 2018).

La tortilla tiene gran importancia en la alimentación en México, puesto que provee del 38.8 % de proteínas, 45.2 % de calorías y 49.1 % del calcio en la dieta diaria de la población mexicana (Bourges, 2013; CEDRSSA, 2014). En las zonas rurales aporta aproximadamente 70 % del total de calorías y 50 % de las proteínas ingeridas diariamente por la población (CEDRSSA, 2014; Trejo-Pastor *et al.*, 2021). Dados los cambios demográficos ocurridos a lo largo de los últimos 25 años, donde ha habido una migración sostenida de campesinos hacia las urbes nacionales y extranjeras, así como una mayor incorporación de las mujeres en trabajos remunerados, la mayoría de las tortillas consumidas en las ciudades de México es elaborada en tortillerías (CEDRSSA, 2014). Así mismo, en el medio rural se ha incrementado la compra de tortilla preparada en tortillerías locales, donde se usa grano de maíces nativos locales o en combinación con grano importado o harina industrializada (CEDRSSA, 2014; Vizcarra, 2018). Estudios recientes han mostrado que la calidad nutrimental de tortillas preparadas con maíz nativo de manera artesanal y de tortillas elaboradas con harina industrial en tortillerías es muy distinta. En un estudio reciente realizado por Colín-Chávez *et al.* (2020) con tortillas de la región de Pátzcuaro, Michoacán, México, se comparó el contenido nutricional y compuestos bioactivos de tortillas elaboradas de manera industrial vs. artesanal y se encontró que las tortillas artesanales tienen mayor cantidad de proteína, calcio y fibra que las tortillas industrializadas, por lo que representan un excelente recurso de nutrientes y fitoquímicos para una alimentación saludable.

Aunado a una menor calidad nutricional de las tortillas industrializadas en relación con las artesanales, las primeras pueden contener secuencias recombinantes derivadas del uso de grano genéticamente modificado, el cual a su vez puede presentar residuos de herbicidas como glifosato, herbicida que ha sido recientemente reclassificado como un potencial carcinógeno en humanos (Guyton *et al.*, 2015; IARC, 2017). La presencia de estas secuencias o moléculas puede tener consecuencias negativas para la salud, ya que el consumo de alimentos transgénicos ha sido relacionado con alteraciones endocrinas, cáncer, neurotoxicidad, toxicidad reproductiva y del desarrollo (Guyton, 2015; López-Revilla y Martínez, 2013; Zhang *et al.*, 2019). En México, estos fenómenos podrían incrementarse por el consumo cotidiano durante el ciclo de vida de los individuos, debido a que se consumen alrededor de 12.3 millones de toneladas de maíz en forma de tortilla; de éstas, 64 % se elaboran

a través del método tradicional de maíz-masa-tortilla y 36 % a través de la industria harinera (Sierra-Macías *et al.* 2010). El consumo *per cápita* de tortilla se estima en 79.5 kg al año en áreas rurales y en 56.7 kg en áreas urbanas (Astier *et al.*, 2019). Los eventos transgénicos de maíz que ocupan el primer lugar a nivel mundial son el NK603 y GA21 (ambos con tolerancia al herbicida glifosato), así como los eventos BT11 y TC1507 (resistentes a insectos lepidópteros y tolerantes a glufosinato de amonio) (BCH, 2022). Éstos forman parte de los más de 238 eventos específicos de maíz transgénico aprobados a nivel mundial (ISAAA, 2021). Muchos de estos eventos contienen el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (P35S CaMV) y/o el terminador de la nopalina sintetasa (t-NOS) de *Agrobacterium tumefaciens* (González-Ortega *et al.*, 2017). Estas dos secuencias reguladoras, por tanto, han sido utilizadas como marcadores de transgénesis en esfuerzos de biomonitorio (González-Ortega *et al.*, 2017). Para el terminador t-NOS se han determinado 54 eventos específicos que lo poseen (BCH, 2022), incluidos GA21 y Bt11, mientras que en el evento TC1507 está presente el P35S CaMV y en el NK603 están ambos marcadores (Álvarez-Buylla, 2017).

Los maíces con estas modificaciones genéticas son utilizados principalmente como forraje y para suplementos alimenticios para el ganado, así como en una amplia gama de productos industrializados (González y Ávila, 2014), aunque se han detectado en alimentos para consumo humano derivados de maíz (González-Ortega *et al.*, 2017). Su trazabilidad se dificulta, ya que el etiquetado de alimentos o grano transgénico no ha sido implementado en México, como sí lo está en Japón y Nueva Zelanda, donde es obligatorio el etiquetado de alimentos que contienen más de 1 % de material modificado (Magaña-Gómez *et al.*, 2003). A nivel mundial, EUA, Brasil y Argentina son países donde más del 90 % del cultivo de maíz es genéticamente modificado, y este grano eventualmente puede destinarse para siembra en México, debido a la falta de etiquetado como transgénico y a la nula trazabilidad una vez que entra el país (CEDRSSA, 2014; Trejo-Pastor *et al.*, 2021). Este escenario puede ser favorecido en situaciones de escasez de semilla para siembra, puesto que este grano es biológicamente viable y su siembra podría dispersar transgenes a través del polen, al coincidir con maíces nativos en su ciclo reproductivo (Carreón-Herrera *et al.*, 2011), pues recientemente algunos de los eventos transgénicos mencionados, y algunos otros, se detectaron en el grano importado que aún conservaba viabilidad (Trejo-Pastor *et al.*, 2021).

En el estudio de González-Ortega *et al.* (2017) se reportó la presencia de los marcadores para eventos transgénicos P35S CaMV y t-NOS en alimentos procesados derivados

de maíz, donde el 82 % de los alimentos analizados amplificaron al menos un inserto transgénico y de 209 muestras de tortillas analizadas, 175 (83.7 %) y 189 (90.4 %) fueron positivas para P35SCaMVyt-NOS, respectivamente; además, estos autores encontraron trazas de glifosato o su metabolito (ácido aminometilfosfónico, AMPA, por sus siglas en inglés) en un subconjunto de las muestras analizadas.

Dada la falta de información sobre la posible presencia de secuencias recombinantes en tortillas vendidas en localidades alejadas del centro del país, el presente estudio se enfocó en evaluar la presencia de secuencias recombinantes en masa de tortilla obtenida de tortillerías de poblados urbanos y rurales de los municipios de Uruapan y Paracho, estado de Michoacán, México. Estos poblados forman parte de la región conocida como Meseta Purépecha, zona biocultural con tradiciones agroalimentarias milenarias, generadora de razas y variedades de maíz nativo. En este sentido, Michoacán forma parte del centro de origen y domesticación del maíz debido a que en el río Balsas se ha encontrado teocintle (Carrera-Valtierra, 2013), además de una gran diversidad de variedades y razas nativas de maíz, por lo que cuenta con un número similar al de estados como Chiapas, Oaxaca y Jalisco (Orozco-Ramírez y Astier, 2018). En el estado de Michoacán se reportan 25 de las 59 razas registradas en México (Turrent *et al.*, 2012), de las cuales se han formado 11 variantes por cruzamientos interraciales entre maíces locales e introducidos y una por posible mutación (maíz Rosa). De estas variantes interraciales, cuatro son originarias de la Meseta Purépecha (Tsiri Uaruti, Tsiri Charápití, Tarasco y Chalqueño Colorado (Carrera-Valtierra, 2013); a su vez, el maíz es el principal cultivo del estado, tanto por superficie sembrada como por su importancia social, ya que involucra actividades que forman parte de un sistema alimentario local que integra a casi todas las comunidades de la región (Astier *et al.*, 2019).

La hipótesis que se planteó para este estudio fue que las tortillas producidas en tortillerías de poblados urbanos presentarían mayor porcentaje de muestras positivas para secuencias recombinantes que las producidas en poblados rurales, debido al uso de maíces procedentes de otras regiones del país, así como a la utilización de harina industrializada. Los objetivos específicos fueron i) conocer la procedencia del maíz y harinas industrializadas a través de encuestas a los productores de tortilla de los municipios de Uruapan y Paracho, Michoacán, y ii) detectar la presencia de las secuencias recombinantes P35SCaMV y t-NOS en ADN purificado en muestras de masa colectadas en poblados urbanos y rurales en estos dos

municipios. La información generada ayudará a vislumbrar un panorama más amplio del grado de presencia de secuencias recombinantes en masa de maíz utilizada para la elaboración de tortillas, así como brindar información que pueda coadyuvar en la toma de decisiones por parte de las autoridades competentes en la implementación de medidas de bioseguridad para salvaguardar la calidad genética y nutricional del grano de maíz, que es la base de la alimentación en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

El área de estudio se localizó en los municipios de Uruapan y Paracho, estado de Michoacán, México, entre las coordenadas geográficas 19° 11' - 19° 43' de latitud Norte y 101° 55' - 102° 25' de longitud Oeste. En 2018 se colectó masa en 92 tortillerías, las cuales fueron georreferenciadas con el uso de un GPS mediante coordenadas UTM NAD 27. Las tortillerías se ubicaron en cinco zonas; la zona de Uruapan, clasificada como urbana, debido a su extensión, fue dividida en siete sub-zonas. Las cuatro zonas restantes fueron clasificadas como zonas rurales e incluyeron a los poblados de San Lorenzo, Angahuan, Capacuaro y Paracho (Figuras 1 y 2), en cada zona y sub-zona se colectó masa de una a 16 tortillerías, de acuerdo con el número de establecimientos existentes. El tamaño de muestra fue de uno en la localidad de Capacuaro debido a que sólo en una de las tortillerías se logró obtener muestra. De cada sitio (tortillería) se colectaron 100 g. de masa (obtenida de la tolva de la tortilladora mecánica), que fueron guardados en bolsas plásticas y etiquetadas; paralelamente, en cada una de las tortillerías se hicieron encuestas sobre la procedencia del maíz y el uso de harina industrializada (masa de maíz mezclada con harinas) para la elaboración de la masa.

Extracción de ADN

Las muestras colectadas por día se colocaron en hieleras con congelantes y se transportaron al laboratorio de Genética de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", UMSNH, donde se almacenaron en ultracongelador (-80 °C) hasta su procesamiento y extracción de ADN.

La extracción de ADN de las muestras de masa colectada se realizó de acuerdo con el protocolo de Doyle y Doyle (1990); sin embargo, sólo 63 muestras presentaron la calidad y concentración suficiente de ADN para los análisis moleculares (Gallagher y Desjardins, 2011; Pöpping, 2001).

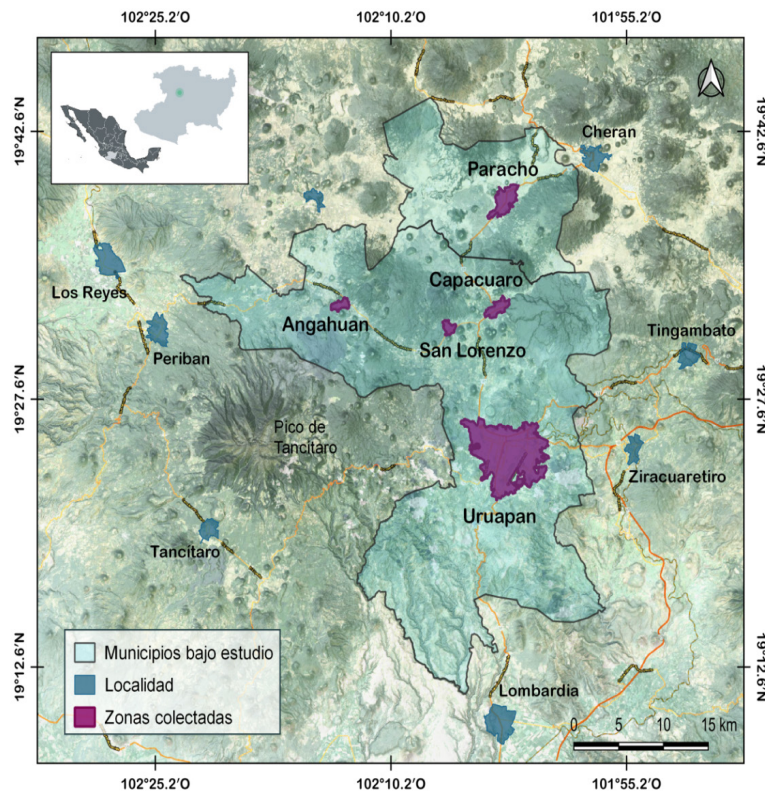


Figura 1. Ubicación geográfica de las cinco zonas de colecta en los municipios de Uruapan y Paracho, Michoacán, México.

Análisis por RT-PCR

Las muestras de ADN se almacenaron en microtubos de 2 mL y fueron transportadas con congelantes a los laboratorios de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología, Departamento de Ecología Funcional del Instituto de Ecología, UNAM y al laboratorio de Bioquímica de la Reproducción, Departamento de Producción Agrícola y Animal de la UAM-Xochimilco, donde se realizó la identificación de secuencias recombinantes P35S CaMV (F-GCCTCTGCCGACAGTGGT, R- AAGGCGTGGTTGGAACGTCTT) y t-NOS (F- CATGTAATGCATGACGTTATTTAT, R-TTGTTTTCTATCGCGTATTAATGT), mediante la técnica de RT-PCR, utilizando como fluorocromo SYBR Green®, de acuerdo con lo reportado por González-Ortega *et al.* (2017). Las reacciones de RT-PCR se efectuaron con un volumen total de 7 μ L [2 μ L de ADN molde (50 ng μ L⁻¹), 3 μ L de SYBR® Green, PCR Master mix con ROX (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA) y 5 μ M de cada cebador]. Los ensayos se llevaron a cabo con termocicladores comerciales (StepOne Real-Time PCR System® y StepOne Plus Real-Time PCR System®, Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA). Cada muestra de ADN purificado se analizó por triplicado (63 \times 3 = 198 reacciones), como controles se usaron materiales de referencia certificados (MRC) del Institute for Reference

Materials and Measurements (IRMM, Bélgica) y por el European Reference Materials (ERM), con tres controles positivos, negativos y de Mock (control de reactivos), respectivamente. El programa de ciclado se realizó de 40 ciclos, un único ciclo de activación de la enzima polimerasa por 2 min a 50 °C y 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de amplificación de 15 s a 95 °C (desnaturalización), 1 min a 60 °C (alineamiento y extensión), finalmente, 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C y 15 s a 95 °C.

La lectura de los datos se hizo a través de la cuantificación directa de la presencia de una o ambas secuencias transgénicas usadas (P35S CaMV y t-NOS) en cada una de las réplicas experimentales de las 63 muestras, categorizadas como presencia (1) o ausencia (0) del amplificado transgénico.

Análisis estadístico y cartográfico

Para los datos de la procedencia de maíz con que se elaboró la masa colectada, del posible uso de harinas industrializadas y de la detección de secuencias de origen recombinante (CaMV P35S y/o t-NOS) se obtuvieron los porcentajes y frecuencias para cada una de las zonas de estudio y se elaboraron gráficos con el uso del programa PAST ver. 3.04 (Hammer *et al.*, 2016). Los mapas de distribución de las zonas de estudio y de la presencia

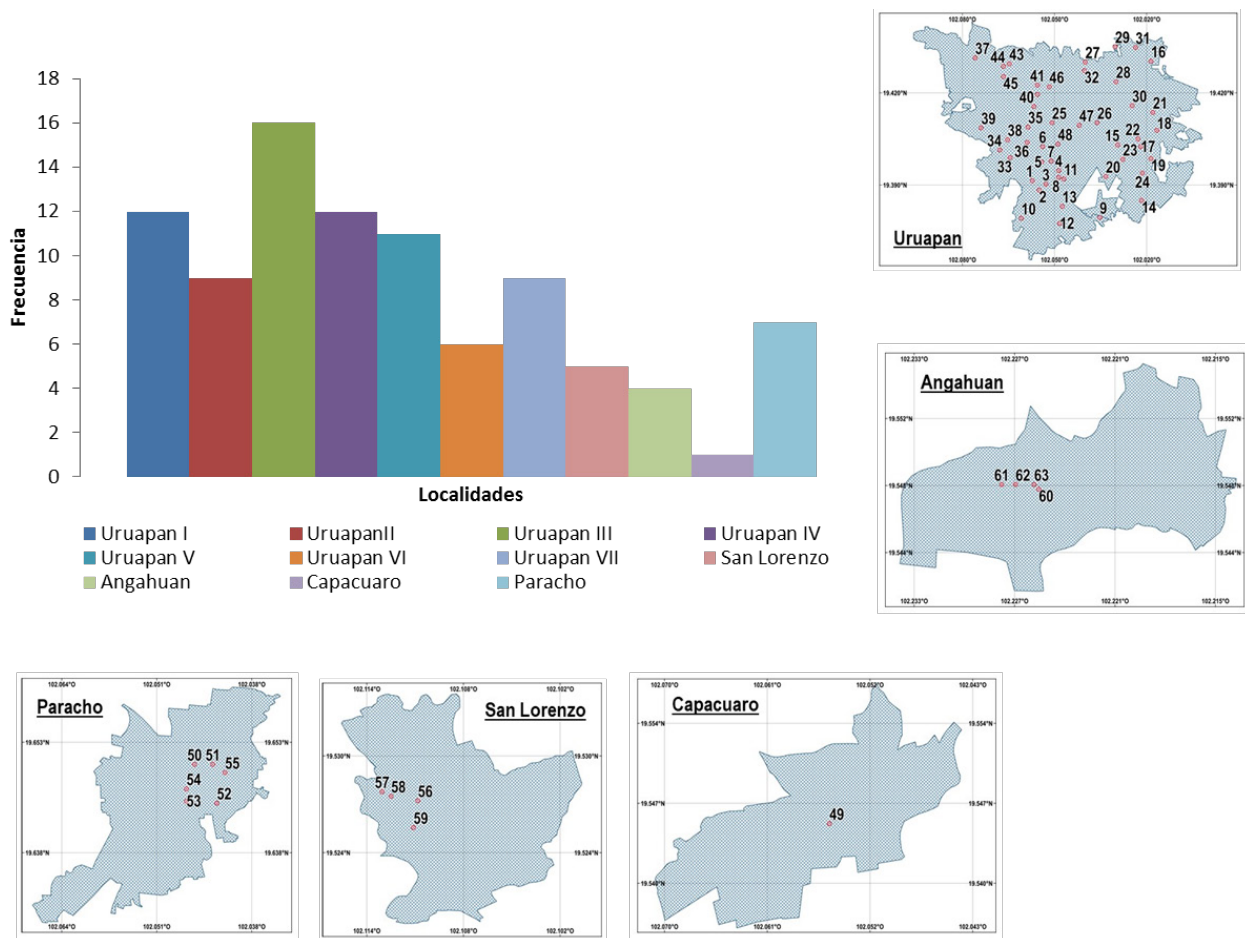


Figura 2. Distribución de frecuencias de las tortillerías participantes en el estudio y su georreferenciación en cada una de las localidades de los municipios de Uruapan y Paracho, Michoacán, México.

de muestras positivas para las sub-zonas de Uruapan fueron elaborados con el programa QGIS ver. 3.16.5 (QGIS Development Team, 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestras por zona, procedencia de maíz y mezcla de harinas

En la zona urbana de Uruapan se recolectó el mayor número de muestras de masa para tortilla (75), debido a la extensión de la ciudad y número de tortillerías; en segundo lugar estuvo la localidad de Paracho (7), seguida de San Lorenzo (5), Angahuan (4) y Capacuaro (1). Las tres últimas pertenecen al municipio de Uruapan (Figura 2 y Material suplementario I). El maíz para la elaboración de tortillas fue reportado como proveniente de seis sitios, agrupados como: Sinaloa, F. Barragán, Jalisco, Bajío, Uruapan y Paracho. Sinaloa fue la procedencia más mencionada para el grano utilizado, tanto en la zona urbana como en la rural

(52 %), seguida de F. Barragán y Bajío, con porcentajes iguales (20 %) (Material suplementario II).

Dentro de las siete sub-zonas en que se dividió la ciudad de Uruapan se reportó mayor frecuencia de maíz procedente de Sinaloa, seguido de F. Barragán y Bajío (Material suplementario III). Maíz proveniente de Jalisco únicamente se reportó en dos tortillerías en las sub-zonas de Uruapan I y IV, las cuales se ubican cerca de la parte centro-sur de la ciudad (Figura 3). Para los poblados rurales los resultados fueron más heterogéneos; en Paracho y Angahuan se encontraron valores más altos de maíz procedente de Sinaloa; sin embargo, para San Lorenzo, de las cinco tortillerías que se estudiaron, en tres de ellas el maíz fue reportado como procedente de Uruapan, una de Paracho y una de Sinaloa (Material suplementario II). Este caso podría ser un abastecimiento secundario, pues varias de las tortillerías de Uruapan compran el grano a una forrajera (Barragán), que a su vez lo adquiere de Sinaloa.

El uso de harinas industrializadas en la elaboración de la masa para tortilla fue muy alto, con 86.6 %. De este total, la zona de Uruapan presentó el mayor porcentaje (82.05 %), seguida de Paracho y San Lorenzo (6.41 %), Angahuan (3.85 %) y Capacuaro (1.28 %) (Material suplementario II).

Detección de secuencias transgénicas

De las 63 muestras analizadas por RT-PCR, 20 fueron positivas a la presencia de una o ambas secuencias transgénicas estudiadas. Como se indica en el Cuadro 1, la mayor cantidad de positivos se presentó en Uruapan, que es la zona más urbanizada.

A nivel de sub-zonas de la ciudad de Uruapan, el mayor número de muestras positivas correspondieron a la sub-zona IV, con un registro para P35S CaMV, dos para t-NOS y dos con ambos marcadores, seguido de la sub-zona I, con dos registros para t-NOS, uno para P35S CaMV y una muestra con ambos marcadores. La sub-zona III sólo tuvo un registro de t-NOS y dos con ambos marcadores. La sub-zona IV corresponde a la parte norte y centro de la ciudad y colinda hacia el sur con la sub-zona I hasta la colonia de la Zapata. La sub-zona III se encuentra en la parte este de la ciudad y abarca la región de Constituyentes hasta la Presa de Santa Catarina (Figura 3).

Los datos obtenidos no permiten visualizar un patrón de distribución claro, debido probablemente a que varias tortillerías pertenecen a una misma asociación productora o sucursal, como son los casos de las tortillerías Andrea I y Andrea II, La Popular (2 tortilladoras) de la sub-zona I, San Juditas Tadeo en la sub-zona IV y La esperanza, con tres tortillerías dispersas en dos sub-zonas de Uruapan (II, V) y en Paracho (Figura 3). Como se puede observar, varias de las tortillerías que presentaron mayor frecuencia de transgenes son sucursales, algunas de las cuales también

están presentes en zonas rurales.

Para varias tortillerías no se contó con información suficiente para saber si pertenecen a una misma casa matriz o sucursal; no obstante, la presencia de sucursales de una misma tortillería podría ser una fuente de introducción de transgenes a través del uso del mismo tipo de grano o harina en diversos locales, un fenómeno importante a considerar en estudios futuros.

Si se compara el porcentaje de muestras positivas obtenidas en el presente estudio en relación con el reporte de González-Ortega *et al.* (2017), éste fue relativamente menor (32 vs. 90.4 %), con más muestras positivas para presencia de transgenes en las muestras procedentes de zonas urbanas que de zonas rurales, tendencia que es similar en ambos estudios. La diferencia en el porcentaje de muestras positivas encontradas en el estudio mencionado y el presente estudio puede deberse a que en este último no se pudo analizar el 31 % de las muestras colectadas por baja calidad del ADN extraído; de haberse logrado, cabe la posibilidad de haber obtenido un mayor número de muestras positivas procedentes de la ciudad de Uruapan, dada la tendencia encontrada en este reporte. De manera adicional, es posible que en las localidades estudiadas haya mayor diversidad de fuentes de grano (de producción local, nacional y posiblemente importado), mientras que en el estudio de González-Ortega *et al.* (2017) se colectaron muestras en zonas urbanas, la mayoría asociadas con la zona metropolitana del Valle de México.

Otro aspecto en línea con el estudio previo es que de las 20 muestras que resultaron positivas para presencia de transgenes (Cuadro 1), un mayor número fue para el marcador de t-NOS, el cual amplificó solo, o en combinación con P35S CaMV en 85 % (n = 17) de las muestras, mientras que el P35S CaMV amplificó solo o en combinación con t-NOS en 45 % (n = 9) de las muestras

Cuadro 1. Relación de secuencias transgénicas detectadas en masa de tortilla en los municipios de Uruapan y Paracho, en la Meseta Purépecha, Michoacán, México.

Zona	Total muestreo	P35S CaMV	t-NOS	P35S CaMV/T-NOS	Total de muestras positivas	Porcentaje del total de muestras	Porcentaje del total de muestras positivas
Uruapan	48	3	7	6	16	25.6	80
San Lorenzo	4	0	1	0	1	1.6	5
Angahuan	4	0	1	0	1	1.6	5
Capacuaro	1	0	1	0	1	1.6	5
Paracho	6	0	1	0	1	1.6	5
Total	63	3	11	6	20	32.0	100

(González-Ortega *et al.*, 2017). Aunque en este estudio no se determinaron eventos específicos relacionados con los marcadores usados, es deseable que en estudios futuros las muestras positivas sean analizadas para los eventos más comunes a nivel mundial, como son NK603, GA21, BT11, TC1507 (BCH, 2022), entre otros que contienen uno o los dos marcadores moleculares aquí utilizados. En este sentido, se esperaría encontrar una frecuencia mayor de eventos con el marcador t-NOS, dado que es la secuencia recombinante más utilizada para la generación de maíces genéticamente modificados disponibles en el mercado internacional y sembrados en EUA. En el estudio de González-Ortega *et al.* (2017) se analizaron ocho eventos diferentes, encontrando que los más frecuentes eran NK603, TC1507 y MON810.

Origen de las secuencias recombinantes y sus implicaciones para la bioseguridad

Los resultados sugieren que la presencia de secuencias recombinantes en masa para tortilla pueden provenir del grano utilizado para su elaboración o para la harina industrializada comúnmente empleada, o de ambos. En el primer caso, la mayoría de los productores de tortilla encuestados utilizan grano proveniente del estado de Sinaloa, lo cual es consistente con el hecho de que ese estado es el principal productor de maíz blanco del país, el cual es destinado de manera primordial para consumo humano (CEDRSSA, 2014; Cruz y Leos, 2018). Una hipótesis es que el grano proveniente de Sinaloa contiene transgenes; esto es plausible, dado que en ese estado se otorgaron permisos para la siembra experimental de maíces genéticamente modificados a campo abierto en el periodo 2009-2013 (Sandoval, 2017), lo que pudo haber provocado flujo génico de estos maíces hacia variedades convencionales. Esta hipótesis fue evaluada en un estudio

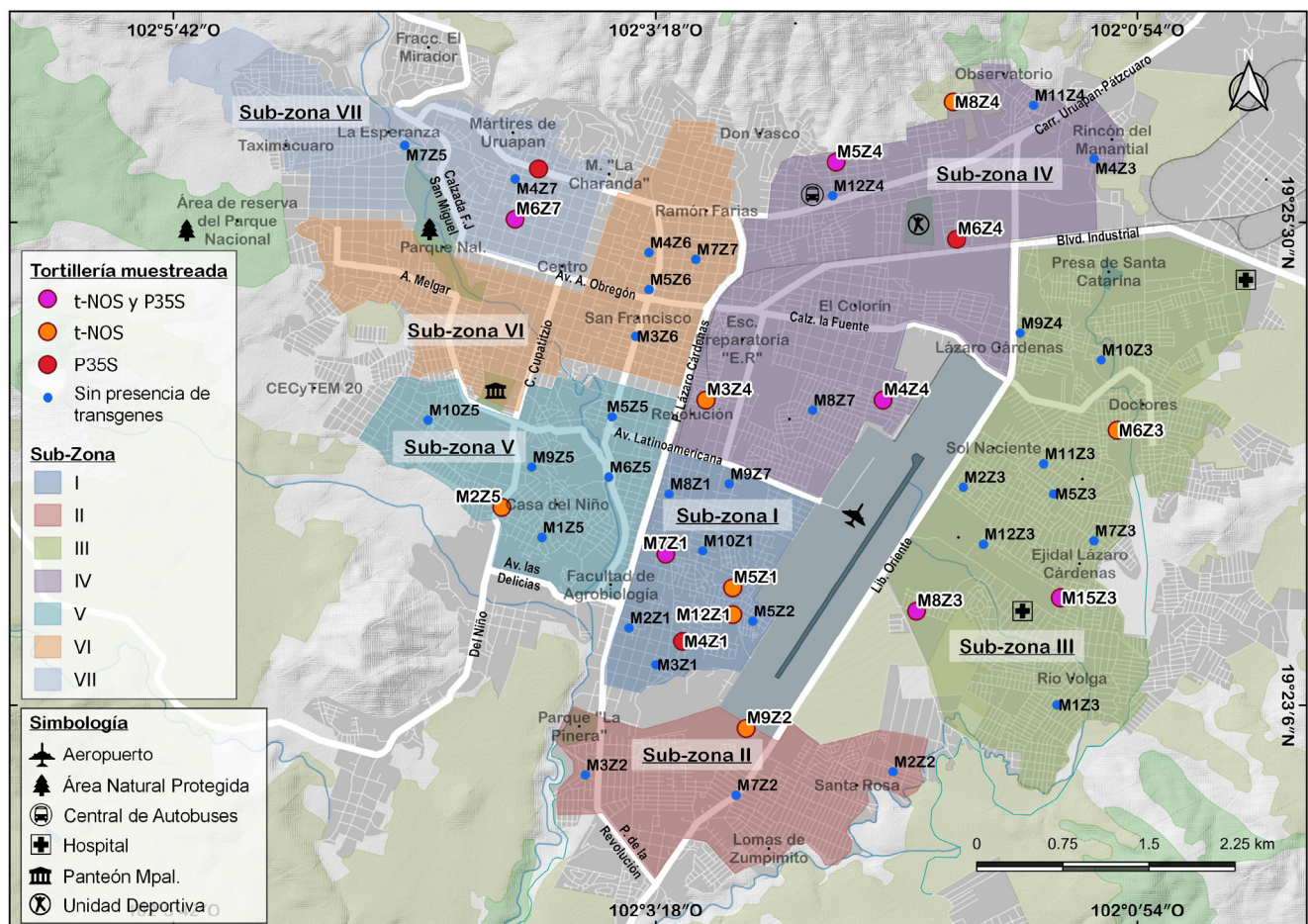


Figura 3. Distribución de tortillerías muestreadas y de registros positivos para la presencia de secuencias transgénicas detectadas con los marcadores P35S CaMV y t-NOS en siete sub-zonas de la ciudad de Uruapan, Michoacán.

reciente donde se analizó la presencia de transgenes en semilla híbrida para siembra y grano recolectado en varios estados del país (Trejo-Pastor *et al.*, 2021). En este trabajo no se encontró semilla positiva para transgenes en la semilla híbrida colectada en Sinaloa; sin embargo, se detectó presencia de transgenes en maíz importado como grano y en grano de un híbrido sembrado en Jalisco (Trejo-Pastor *et al.*, 2021). Con base en este reporte, así como en análisis de híbridos realizados por los autores del presente estudio en material de 2017 (datos no publicados), la hipótesis de que la fuente de transgenes es grano proveniente de Sinaloa es poco probable. En este sentido, si bien el estudio de Trejo-Pastor *et al.* (2021) es un aporte importante, analiza pocos híbridos en pocos estados del país y el material analizado es del periodo 2012-2013, por lo que es importante que las autoridades competentes SADER, SEMARNAT, en coordinación con CIBIOGEM lleven a cabo monitoreos actuales y rutinarios en semilla híbrida de diferentes partes del país, en especial la semilla utilizada en los estados que abastecen de grano para consumo humano, con el fin de detectar la presencia adventicia de transgenes, en particular en semilla convencional producida por empresas transnacionales, muchas de las cuales son a su vez productoras de semilla de maíz genéticamente modificada (Syngenta Agro 2013; Shi *et al.*, 2010; USDA/NASS, 2020).

Si bien hay pocos elementos para afirmar que el grano producido en el estado de Sinaloa proviene de maíces transgénicos, es sugerente que 28 de las 63 muestras de masa analizadas fueron reportadas como derivadas de grano proveniente de Sinaloa (44.44 %) y que 17 de las 20 muestras positivas fueron reportadas como derivadas de grano procedente de Sinaloa (Material Suplementario I); así mismo, las encuestas realizadas en 90 de las 92 tortillerías sobre el uso de harina industrializada para la elaboración de tortillas muestran que 12 tortillerías usaron masa artesanal (sin harinas industrializadas), de las cuales cuatro fueron positivas a alguno de los marcadores, lo que equivale a 21 % del total de muestras positivas (20), mientras que 78 tortillerías usaron masa industrializada, de las cuales 15 fueron positivas y equivalen a un 79 % del total de muestras positivas; es decir, se presenta una tendencia de mayor presencia de transgenes en masa industrializada. Estos resultados son sustentados con el estudio de González-Ortega *et al.* (2017), donde encontraron para la Ciudad de México porcentajes más altos de transgenes en la masa de tortilla industrializada en comparación con las tortillas artesanales (91.8 % y 73.3 %, respectivamente). De manera complementaria, se podrían haber detectado secuencias recombinantes derivadas del uso de grano de maíz importado, primordialmente de EUA, donde 95 % del maíz sembrado es transgénico (ISAAA, 2021). Si bien se asumía que este grano era destinado para

uso pecuario e industrial, es muy probable que una fracción termine en la cadena alimenticia humana, a juzgar por los resultados de González-Ortega *et al.*, (2017), quienes detectaron que 90.4 % de tortillas de maíz producidas en México contenían transgenes. Un fenómeno importante es que una vez que el grano importado entra al país, no se tiene un registro preciso sobre su lugar de destino y venta, pudiéndose mezclar en las concentradoras de grano que existen a lo largo del país, que concentran tanto grano importado como de producción nacional, y que abastecen a harineras y cadenas de tortillerías, entre otros usos. Esta deficiencia ha sido señalada desde los propios centros de investigación gubernamentales (CEDRSSA, 2014) y podría ser fuente de transgenes en el grano de maíz proveniente de Sinaloa por parte de los productores de tortilla.

Otra fuente probable de transgenes es la harina industrializada, cuya utilización fue reportada por la mayoría de las tortillerías encuestadas (86.6 %). En estudios previos, las harinas de maíz industrializadas presentaron secuencias recombinantes en 83.3 % de las 30 muestras analizadas (González-Ortega *et al.*, 2017). Esta harina puede ser de producción nacional o proveniente directamente de EUA (Mercer *et al.*, 2012).

Con el fin de discernir la fuente de transgenes en las muestras de masa analizadas, es necesario que en estudios posteriores se tomen muestras de grano de maíz y de harina por separado, además de masa preparada, con el fin de determinar los componentes de la masa que contienen transgenes, los eventos específicos involucrados, así como el límite de detección de la RT-PCR dependiendo de la relación grano/harina utilizada (cuando alguno de estos componentes sea positivo para presencia de secuencias recombinantes). Adicionalmente, es necesario obtener información detallada de la cadena de importación, distribución y venta de grano de maíz, así como de la trazabilidad del grano producido en México, pues esta falta de información puede impactar regiones como el sitio de estudio, ya que de la región de Uruapan se abastece la mayor cantidad de maíz para la elaboración de tortillas a poblados de la Meseta Purépecha, como Pichataro y pueblos de la región lacustre de Pátzcuaro, así como de la región de Zamora y el Bajío (Sabán *et al.*, 2016), lo que puede favorecer la dispersión de grano transgénico en la región. Este grano, además de ser consumido, puede ser sembrado, abriendo la posibilidad de flujo de transgenes hacia variedades nativas de maíz, fenómeno que representa un problema de bioseguridad adicional, al ser México centro de origen del maíz (Álvarez-Buylla y Piñeyro Nelson, 2013; Carreón-Herrera *et al.*, 2011; Trejo-Pastor *et al.*, 2021), lo que a su vez puede dar paso a problemas ambientales adicionales (Pasquet *et al.*, 2008; Villanueva-Gutiérrez 2014).

Fue notable la diferencia en la frecuencia de muestras positivas a transgenes provenientes de una zona urbana frente a aquellas provenientes de zonas rurales (Cuadro 1). En las zonas rurales de donde se obtuvieron muestras, la mayoría fue negativa para la presencia de transgenes y los productores de tortilla reportaron el uso de grano de maíz local y poco uso de harina industrializada. Las tortillas artesanales elaboradas con maíz nativo o de tortillerías donde se nixtamaliza el maíz pueden ser una alternativa que fortalezca la adecuada nutrición de la población local, puesto que los maíces nativos presentan propiedades nutraceuticas superiores (Colín-Chávez *et al.*, 2020; Serna y Amaya, 2008).

El consumo de grano producido localmente, con estrategias agrícolas de bajo impacto ambiental como el sistema de milpa y la optimización en la producción a pequeña escala de tortilla, puede contribuir a fortalecer la economía y soberanía alimentaria local, cuestión que ha sido sugerida previamente (Astier *et al.*, 2019). En el caso del estado de Michoacán, existe una diversidad de formas de producción de la tortilla, que van desde las artesanales hasta las mecanizadas; la incorporación de grano nativo bajo diferentes sistemas de producción y nixtamalización podría proveer de tortilla de mejor calidad a diferentes regiones del estado, tanto rurales como urbanas (Arnés y Astier, 2019; Astier *et al.*, 2019). Existen esfuerzos exitosos de comercialización de tortilla elaborada con maíces nativos en Michoacán, como es la Red Tsiri (<https://www.conecto.mx/en/red-tsiri-2/>); estos esfuerzos podrían adoptarse y adaptarse en otras regiones del país; además, en Michoacán existen programas orientados a la sostenibilidad y eficiencia de la producción de tortillas, como las ecoestufas, que son ahorradoras de leña (Astier *et al.*, 2019). En el estado hay un gran potencial para aumentar la producción de maíz nativo, contribuyendo a la conservación de variedades nativas, involucrando y beneficiando a distintos actores de la región.

Los resultados obtenidos aportan nueva información sobre la presencia de transgenes en tortillas de regiones del país que no habían sido previamente estudiadas, lo que permitirá tomar medidas de bioseguridad y biomonitorio adecuadas que coadyuven a restringir la entrada de maíz transgénico a la cadena alimenticia humana, fortaleciendo los objetivos del reciente Decreto Presidencial (CDHCU, 2020), donde se establece un compromiso del gobierno federal para la prohibición de la siembra de maíz genéticamente modificado en México y la sustitución progresiva de importaciones de grano que contengan transgenes.

CONCLUSIONES

Se encontraron muestras positivas para los marcadores P35S CaMV y t-NOS en masa para la elaboración de tortilla en tortillerías de la Meseta Purépecha, Michoacán, México preparadas con harina industrializada o bien elaboradas de manera artesanal (masa fresca). La mayor frecuencia de secuencias transgénicas se encontró en la zona urbana de Uruapan, mientras que en las zonas rurales la presencia de transgenes fue baja. El marcador t-NOS fue el evento mayormente detectado. En un alto porcentaje de tortillerías se usa harina industrializada y el grano más frecuentemente utilizado proviene de Sinaloa; por tanto, el consumo de tortilla elaborada con grano de maíz local disminuye la probabilidad de consumir grano transgénico, además de fortalecer la economía y soberanía alimentaria local.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Aridahí González Jiménez de la Facultad de Agrobiología, UMSNH por su asistencia durante el trabajo de campo y laboratorio. A Diana Romo del Instituto de Ecología, UNAM, por su ayuda en la logística para el desarrollo de este proyecto. A los laboratorios de Fisiología de los Cultivos y Bioquímica de la Reproducción del Departamento de Producción Agrícola y Animal, UAM-X por las facilidades brindadas durante el análisis y obtención de los datos moleculares. El estudio fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto Problemas Nacionales-CONACYT 2015-01-687 a EAB. Agradecemos las sugerencias de dos revisores anónimos.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez-Buylla E. R. (2017) Diseño de un plan de monitoreo de secuencias transgénicas en sitios prioritarios y consolidación del laboratorio de referencia en análisis de OGM. Contaminación y Salud Ambiental. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático-SEMARNAT. Ciudad de México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/311144/Informe_final_Dise_o_Plan_de_Monitoreo_Laboratorio_referencia_OGM.pdf (Julio 2022).
- Álvarez-Buylla E.R. y A. Piñeyro-Nelson (2013) El Maíz en Peligro ante los Transgénicos: Un Análisis Integral sobre el Caso de México. Centro de Investigaciones Interdisciplinarias en Ciencias y Humanidades UNAM, Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad. México, D. F. 568 p.
- Arnés E. and M. Astier (2019) Handmade comal tortillas in Michoacán: traditional practices along the rural-urban gradient. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16:3211, <https://doi.org/10.3390/ijerph16173211>
- Astier M., G. Odenthal, C. Patricio y Q. Orozco-Ramírez (2019) Handmade tortilla production in the basins of lakes Pátzcuaro and Zirahuén, Mexico. *Journal of Maps* 15:52-57, <https://doi.org/10.1080/17445647.2019.1576553>
- BCH, Biosafety Clearing-House (2022) Living modified organism (LMO) registry. Secretariat of the Convention on Biological Diversity. Montreal, Canada. <https://bch.cbd.int/en/registries/living-modified-organisms> (August, 2022).

- Bourges H. C. (2013) El maíz: su importancia en la alimentación de la población mexicana. In: El Maíz en Peligro ante los Transgénicos. E. R. Álvarez-Buylla y A. Piñeyro N. (coords.). UNAM-Centro de Investigaciones Interdisciplinarias en Ciencias y Humanidades-Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad. México, D. F. pp:231-247.
- CDHCU, Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión (2020) Ley Federal para el Fomento y Protección del Maíz Nativo. Diario Oficial de la Federación. Edición matutina 13 de abril de 2020. Ciudad de México. 5 p.
- Carreón-Herrera N. I., H. López-Sánchez, A. Gil-Muñoz, P. A. López, M. A. Gutiérrez-Espinosa y E. Valadez-Moctezuma (2011) Flujo génico entre maíces comercializados por Diconsa y poblaciones nativas en la Mixteca Poblana. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2:939-953.
- Carrera-Valtierra J. A. (2013) Estudio de la diversidad genética y su distribución en los maíces criollos y sus parientes silvestres en Michoacán. Informe del Proyecto CONABIO FZ001. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F. 64 p. <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfFZ001.pdf> (Julio 2022).
- CEDRSSA, Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (2014) Consumo, distribución y producción de alimentos: el caso del complejo maíz-tortilla. Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. Ciudad de México. 15 p.
- Colín-Chávez C., J. J. Virgen-Ortiz, L. E. Serrano-Rubio, L. A. Martínez-Tellez and M. Astier (2020) Comparison of nutritional properties and bioactive compounds between industrial and artisan fresh tortilla from maize landraces. *Current Research in Food Science* 3:189-194, <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.05.004>
- Cruz D. D. y J. A. Leos R. (2018) La producción de maíz en Sinaloa, México, y sus implicaciones para el medio ambiente. *Letras Verdes* 25:100-118, <https://doi.org/10.17141/letrasverdes.25.2019.3705>
- Doyle J. J. and J. L. Doyle (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Gallagher S. R. and P. Desjardins (2011) Quantitation of nucleic acids and proteins. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 5:2.2.1-2.2.36, <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0202s5>
- González M. A. y J. F. Ávila C. (2014) El maíz en Estados Unidos y en México. Hegemonía en la producción de un cultivo. *Argumentos* 75:215-242.
- González-Ortega E., A. Piñeyro-Nelson, E. Gómez-Hernández, E. Monterrubio-Vázquez, M. Arleo, J. Dávila-Velderrain, ... and E. R. Álvarez-Buylla (2017) Pervasive presence of transgenes and glyphosate in maize derived food in Mexico. *Agroecology and Sustainable Food Systems* 41:1146-1161, <https://doi.org/10.1080/21683565.2017.1372841>
- Guyton K. Z., D. Loomis, Y. Grosse, F. El Ghissassi, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, ... and K. Straif (2015) Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology* 16:490-491, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8)
- Hammer Ø., D. A. T. Harper and P. D. Ryan (2016) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Electronica* 4:1-9.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (2017) Some organophosphate insecticides and herbicides. Vol. 112. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Report of the IARC Meeting in Lyon, France 3-10 March 2015. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Geneva, Switzerland. 452 p.
- ISAAA, International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (2021) GM approval database in Mexico for food and feed, direct use or additive. International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications. Ithaca, New York, USA. <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp/> (May 2022).
- López-Revilla R. y C. Martínez D. (2013) Riesgos potenciales no previstos de los alimentos transgénicos. In: El Maíz en Peligro ante los Transgénicos. E. R. Álvarez-Buylla y A. Piñeyro N. (coords.). UNAM-Centro de Investigaciones Interdisciplinarias en Ciencias y Humanidades-Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad. México, D. F. pp:165-185.
- Magaña-Gómez J., M. A. Islas-Osuna, G. Yepiz-Plascencia y A. M. Calderón de la Barca (2003) Detección por PCR de un transgen en productos de soja utilizados para formular alimentos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 26:263-269.
- Mercer K. L., H. R. Perales and J. D. Wainwright (2012) Climate change and the transgenic adaptation strategy: smallholder livelihoods, climate justice and maize landraces in Mexico. *Global Environmental Change* 22:495-504, <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2012.01.003>
- Orozco-Ramírez Q. y M. Astier (2018) Socio-economic and environmental changes related to maize richness in Mexico's central highlands. *Agriculture and Human Values* 34:377-391, <https://doi.org/10.1007/s10460-016-9720-5>
- Pasquet R. S., A. Peltier, M. B. Hufford, E. Oudin, J. Saulnier, L. Paul, ... and P. Gepts (2008) Long distance pollen flow assessment through evaluation of pollinator foraging range suggests transgene escape distances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:13456-13461, <https://doi.org/10.1073/pnas.0806040105>
- Pöpping B. (2001) Methods for the detection of genetically modified organisms: precision, pitfalls and proficiency. *American Laboratory* 33:70-80.
- QGIS Development Team (2020) QGIS. Sistema de Información Geográfica libre y de código abierto. Versión 3.16.5. QGIS Association. Hannover. Alemania. <http://www.qgis.org> (Junio 2021).
- Sabán P. C., Q. Orozco R. y M. Astier C. (2016) Análisis ambiental, social y económico del abasto de maíz y transformación en tortillas artesanales en la cuenca del lago Pátzcuaro, estado de Michoacán, México. *Agroecología* 11:77-93.
- Sandoval V. D. (2017) Treinta Años de Transgénicos en México (Compendio Cartográfico). Centro de Estudios para el Cambio en el Campo Mexicano. Ciudad de México. 40 p.
- Serna S. S. O. y C. A. Amaya G. (2008) El papel de la tortilla nixtamalizada en la nutrición y alimentación. In: Nixtamalización del Maíz a la Tortilla: Aspectos Nutrimientales y Toxicológicos. M. E. Rodríguez G., S. O. Serna S. y F. Sánchez S. (eds.). Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. pp:105-151.
- Shi G., J. P. Chavas and K. Steigert (2010) An analysis of the pricing of traits in the U.S. corn seed market. *American Journal of Agricultural Economics* 92:1324-1338, <https://doi.org/10.1093/ajae/aaq063>
- Sierra-Macias M., A. Palafox-Caballero, G. Vázquez-Carrillo, F. Rodríguez-Montalvo y A. Espinosa-Calderón (2010) Caracterización agronómica, calidad industrial y nutricional de maíz para el trópico mexicano. *Agronomía Mesoamericana* 21:21-29, <https://doi.org/10.15517/am.v21i1.4908>
- Syngenta Agro (2013) Reporte final de la liberación de la tecnología Agrisure Viptera 3111 en el estado de Sinaloa durante el Ciclo 01 2012. Syngenta Agro S.A. de C.V. y Syngenta Seeds, Inc. México, D. F. 72 p.
- Trejo-Pastor V., A. Espinosa-Calderón, M. C. Mendoza-Castillo, T. A. Kato-Yamakake, M. L. Morales-Floriano, M. Tadeo-Robledo y A. Wegier (2021) Grano de maíz comercializado en México como potencial dispersor de eventos transgénicos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 44:251-259, <https://doi.org/10.35196/rfm.2021.2.251>
- Turrent A., T. Wise y E. Garvey (2012) Factibilidad de alcanzar el potencial productivo de maíz en México. Reporte 24. Mexican Rural Development Research Reports. Woodrow Wilson International Center for Scholars. Washington, D. C., USA. 36 p.
- USDA/NASS, United States Department of Agriculture/National Agricultural Statistics Service (2020) Corn and soybean production up in 2020. USDA Reports. Washington, D. C. <https://www.nass.usda.gov/Newsroom/archive/2021/01-12-2021a.php> (July 2021).
- Villanueva-Gutiérrez R., C. Echazarreta-González, D. W. Roubik and Y. B. Moguel-Ordoñez (2014) Transgenic soybean pollen in honey from the Yucatán peninsula, Mexico. *Scientific Reports* 4:4022, <https://doi.org/10.1038/srep04022>
- Vizcarra B. I. (2018) Volteando la Tortilla. Género y Maíz en la Alimentación Actual de México. Juan Pablos Editor y Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Estado de México. 450 p.
- Zhang L., I. Rana, R. M. Shaffer, E. Taioli and L. Sheppard (2019) Exposure to glyphosate-based herbicides and risk for non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis and supporting evidence. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 781:186-206, <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.02.001>