



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

**DIFERENCIACIÓN DE EVENTOS TRANSGÉNICOS MEDIANTE
TÉCNICAS MOLECULARES EN DISTINTOS FONDOS
GENÉTICOS DE CRISANTEMO Y ALGODÓN**

TESIS

**Que como requisito parcial
para obtener el grado de:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

ROBERTO CARLOS CID CONTRERAS



Bajo la supervisión de: Ernestina Valadez Moctezuma, Dra.

DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



Chapingo, Estado de México, Mayo de 2017

DIFERENCIACIÓN DE EVENTOS TRANSGÉNICOS MEDIANTE
TÉCNICAS MOLECULARES EN DISTINTOS FONDOS
GENÉTICOS DE CRISANTEMO Y ALGODÓN

Tesis realizada por **ROBERTO CARLOS CID CONTRERAS** bajo la supervisión
del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como
requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR: _____

DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR: _____

DR. JOSÉ OSCAR MASCORRO GALLARDO

ASESOR: _____

DR. AGUSTÍN DE JESÚS LÓPEZ HERRERA

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE APÉNDICES	ix
DEDICATORIA	x
AGRADECIMIENTOS	xi
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xii
RESUMEN GENERAL.....	xiii
GENERAL ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Objetivo General	3
Objetivos Específicos.....	3
Hipótesis	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Organismos Genéticamente Modificados	5
Tipos de eventos transgénicos	5
Estrategias de análisis para muestras de OGMs	8
Análisis cualitativos	8
Análisis Semi-cuantitativos.....	8
Análisis Cuantitativos	8
Métodos de detección de OGMs.....	9
Bioensayos.....	9
Determinación de proteínas	9
Identificación de secuencias transgénicas	10
Nuevas metodologías.....	12
Ventajas y Desventajas	12
Marcadores moleculares.....	14
ISSR (Inter-Secuencias Simples Repetitivas)	14
Southern blot	15

TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced PCR).....	16
Iniciadores combinados para amplificación de secuencias adyacentes	16
LITERATURA CITADA	18
ANÁLISIS MOLECULAR DE EVENTOS TRANSGÉNICOS EN CRISANTEMO	21
RESUMEN	21
ABSTRACT	22
INTRODUCCIÓN	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Material vegetal	24
Extracción de DNA	25
Dilución del DNA	25
Detección de elementos genéticos.....	26
Digestión enzimática del DNA y técnica Southern blot.....	27
Técnica ISSR	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
Extracción de DNA	29
Detección de elementos genéticos.....	30
Digestión enzimática del DNA y técnica Southern blot.....	33
Técnica ISSR	34
CONCLUSIONES	38
LITERATURA CITADA	39
HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA DIFERENCIACIÓN DE ALGODÓN GENÉTICAMENTE MODIFICADO	42
RESUMEN	42
ABSTRACT	43
INTRODUCCIÓN	44
MATERIALES Y MÉTODOS	45
Material vegetal	45
Extracción de DNA	46

Dilución del DNA	46
Detección de elementos genéticos.....	46
Digestión enzimática del DNA y técnica Southern blot.....	47
Técnica ISSR	48
Combinación de iniciadores tipo ISSR y del gen <i>npII</i>	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
Extracción de DNA	50
Detección de elementos genéticos.....	51
Digestión enzimática del DNA y técnica Southern blot.....	55
Técnica ISSR	56
Combinación de iniciadores tipo ISSR y del gen <i>npII</i>	61
CONCLUSIONES	63
LITERATURA CITADA	64
APÉNDICES	67

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales características de los métodos más usados para detectar OGMs.	13
Cuadro 2. Descripción de los genotipos empleados.	25
Cuadro 3. Características de los iniciadores utilizados.	26
Cuadro 4. Cantidad y calidad de DNA obtenida en los materiales evaluados. .	29
Cuadro 5. Determinación empírica de la efectividad de la detección.....	31
Cuadro 6. Características de los iniciadores tipo ISSR utilizados.....	34
Cuadro 7. Análisis molecular de varianza usando marcadores ISSR.	37
Cuadro 8. Descripción de los genotipos empleados en la investigación.....	45
Cuadro 9. Características de los iniciadores utilizados en la investigación.	47
Cuadro 10. Cuadrados medios para las variables cantidad y calidad y comparación de medias de los métodos de extracción de DNA.	51
Cuadro 11. Determinación empírica de la efectividad de la detección.....	53
Cuadro 12. Características de los iniciadores utilizados.....	56
Cuadro 13. Análisis molecular de varianza usando marcadores ISSR.	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de eventos simples donde el T-DNA se encuentra: a) en diferente locus dentro de fondos genéticos iguales; b) en diferente locus dentro de distinto fondo genético. La banda color amarillo hace referencia al transgen.	5
Figura 2. Ejemplos de eventos apilados: a) Dos casetes diferentes (T-DNA) en diferente locus dentro de un fondo genético; b) Distintos T-DNA en diferente locus dentro de cromosomas homólogos. Las bandas color amarillo y rojo hacen referencia a distintos transgenes.	6
Figura 3. Ejemplo de híbrido GM con un solo casete de información (T-DNA). La banda color rojo hace referencia al transgen.	6
Figura 4. Especificidad en la identificación de transgénicos. Fuente: SENASICA 2015.	10
Figura 5. Modelo de la obtención de marcadores tipo ISSR. Los productos amplificados en cada genoma son diferentes en longitud pero ambos están flanqueados por sus extremos con la secuencia (GACA) ₄ .	14
Figura 6. Diagrama de flujo de la técnica Southern blot. Fuente: Hartl & Jones, 1998.	15
Figura 7. Modelo de transgen insertado entre dos secuencias microsatélite del mismo tipo.	17
Figura 8. Modelo de transgen insertado dentro de una secuencia microsatélite	17
Figura 9. Gel de calidad de extracción de DNA. 1 a 7: materiales de crisantemo; 8 a 10: materiales de maíz.	30
Figura 10. Detección de: (A) secuencia promotora 35S con 160 pb aproximadamente, (B) gen nptII con 780 pb, (C) secuencia Tnos con 190 pb. Carriles: C1 a C7 muestras de crisantemo; carriles Z1 a ZNT muestras de maíz; pBI: plásmido y B: blanco.	30

Figura 11. Dendrograma generado por el análisis de los elementos genéticos 35S, nptII y Tnos en siete genotipos de crisantemo y tres de maíz. *: Controles negativos	32
Figura 12. a) Gel de agarosa 0.8 % con DNA de cinco plantas transgénicas de crisantemos digeridos con EcoRI, b) transferencia y c) detección en membrana de nylon.	33
Figura 13. Dendrograma generado con datos de 10 iniciadores tipo ISSR.	36
Figura 14. Análisis de componentes principales generado con datos de 10 iniciadores tipo ISSR.....	37
Figura 15. Gel de calidad de extracción de DNA y comparación de los productos obtenidos con dos métodos SDS y CTAB en seis accesiones de algodón.....	50
Figura 16. Detección de: (A) secuencia promotora 35S con 160 pb aproximadamente, (B) gen nptII con 780 pb, (C) secuencia Tnos con 190 pb. Carriles: 1 a 21 muestras de algodón, pBI: plásmido pBI121 y B: blanco.....	52
Figura 17. Dendrograma de las accesiones en estudio generado por el análisis de tres elementos genéticos en 21 genotipos de algodón transgénico y no transgénico. El grupo A está integrado por los genotipos con secuencias transgénicas y el grupo B está integrado por los genotipos sin secuencias transgénicas.....	54
Figura 18. a) Electroforesis en gel de agarosa 0.8 % con DNA de tres muestras de algodón a diferente concentración digeridas con EcoRI, b) transferencia y c) detección en membrana de nylon.	55
Figura 19. Dendrograma obtenido de datos de 16 iniciadores tipo ISSR en 21 materiales de algodón modificado y no modificado genéticamente	57
Figura 20. Análisis de coordenadas principales en 21 genotipos de algodón evaluados con 16 iniciadores tipo ISSR.....	59
Figura 21. A) Gráfica de valores para ΔK ; B) Diagrama de barras de la estructura de 21 accesiones de algodón ($K=2$).	60

Figura 22. Productos de PCR obtenidos por la reacción independiente del iniciador UBC889, reacción conjunta del iniciador UBC889+Forward del gen nptII, UBC889+Reverse del gen nptII y los iniciadores F y R para amplificar el gen nptII en 11 materiales de algodón..... 62

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Metodología de extracción de DNA.....	67
Método CTAB.....	67
Método SDS.....	69
Apéndice 2. Construcción del transgen en crisantemo y alineamiento de los iniciadores.....	71

DEDICATORIA

A mis padres, con cariño, admiración y respeto

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento proporcionado durante esta investigación, a la Universidad Autónoma Chapingo y al Instituto de Horticultura por las facilidades otorgadas.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por su apoyo, dedicación, paciencia y su valioso consejo en la dirección de esta investigación. Al Dr. José Oscar Mascorro Gallardo por supervisar y aclarar todas las dudas durante la investigación. Al Dr. Agustín de Jesús López Herrera por su apoyo y sus valiosas contribuciones para la mejora y culminación del presente.

Al Dr. Samir Samah por todos sus consejos y por brindar una valiosa amistad.

A la futura M.C. Silvia Romero por todo su apoyo incondicional, por sus valiosos consejos y por sus contribuciones académicas y personales.

Con gran admiración y respeto, agradezco a mi familia, por su apoyo incondicional, su confianza, sus constantes palabras de motivación y por ser parte de la fuerza que me ayuda a cumplir todas mis metas.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre	Roberto Carlos Cid Contreras
Fecha de nacimiento	Diciembre 26 1991
Lugar de nacimiento	Tehuacán, Puebla.
CURP	CICR911226HPLDNB05
Cédula profesional	9876049

Desarrollo académico

Licenciatura	Ingeniero en Biotecnología, Universidad Tecnológica de Tehuacán.
--------------	--

RESUMEN GENERAL

Diferenciación de eventos transgénicos mediante técnicas moleculares en distintos fondos genéticos de crisantemo y algodón

Las plantas genéticamente modificadas (GM), también llamadas eventos transgénicos, son analizadas y caracterizadas molecularmente para determinar diferencias con base a las secuencias insertadas (T-DNA). El objetivo de esta investigación fue evaluar diferentes sistemas de marcadores basados en PCR e hibridación de DNA para diferenciar eventos transgénicos en crisantemo y algodón. En crisantemo se utilizaron los cultivares: Harman e Indianapolis, con tres y dos eventos, respectivamente. En algodón se utilizaron 20 genotipos analizados como muestras a ciegas. Sólo las técnicas de PCR proporcionaron resultados reproducibles. La detección de elementos genéticos en crisantemo determinó la presencia únicamente de *np11* y *Tnos*; y en algodón permitió identificar 15 muestras GM. La técnica Inter-Secuencias Simples Repetidas (ISSR) proporcionó en crisantemo 131 bandas de DNA y en algodón 283, de estas 59.5 y 61.4 % fueron polimórficas, respectivamente. Basándose en el poder de resolución, contenido de información polimórfica y el índice de marcador, los iniciadores UBC872 y UBC811 fueron los más informativos para diferenciar los eventos de crisantemo; mientras que los iniciadores (AGAC)₄GC, AC(GACA)₄ y UBC872 [(GATA)₄] fueron los más eficientes para algodón. El análisis estadístico se realizó con diferentes métodos de agrupamiento. Utilizando el Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) se diferenciaron los dos cultivares de crisantemo ($p=0.02$) y en algodón se obtuvieron dos grupos ($p=0.001$). El iniciador UBC872 discriminó las plantas a nivel de cultivar y evento, esto sugiere la posibilidad de diferenciar eventos GM utilizando la técnica ISSR.

Palabras clave: evento transgénico, elementos genéticos, marcadores moleculares, ISSR, UBC872

GENERAL ABSTRACT

Differentiation of transgenic events using molecular techniques in different chrysanthemum and cotton gene pools

Genetically modified (GM) plants, also known as transgenic events, are evaluated and characterized molecularly to determine differences based on the T-DNA. The objective of this research was to use different marker systems based on PCR and DNA hybridization to differentiate transgenic events in chrysanthemum and cotton. The Harman and Indianapolis chrysanthemum cultivars were used, with three and two events, respectively. For cotton, 20 genotypes analyzed as blind samples were used. Only PCR techniques provided reproducible results. Genetic element detection in chrysanthemum only determined *nptII* and *Tnos* presence, whereas in cotton 15 transgenic samples were identified. The Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) technique provided 131 DNA bands in chrysanthemum and 283 in cotton, of which 59.5 and 61.4 % were polymorphic, respectively. Based on the resolving power, polymorphic information content and marker index, the primers UBC872 and UBC811 were the most informative to discriminate the chrysanthemum events, while the primers (AGAC)₄GC, AC(GACA)₄ and UBC872 [(GATA)₄] were the most efficient for cotton. Statistical analyzes were performed with different clustering methods. Using the Analysis of Molecular Variance (AMOVA) the two chrysanthemum varieties were differentiated ($p=0.02$), whereas in cotton two groups were obtained ($p=0.001$). The primer UBC872 was able to discriminate plants at the cultivar and event level; this suggests the possibility of differentiating GM events using the ISSR technique.

Keywords: transgenic event, genetic elements, molecular markers, ISSR, UBC872.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las plantas transgénicas son aquellas que han sido modificadas usando técnicas de ingeniería genética, la primer planta genéticamente modificada (GM) fue reportada en 1983 y desde entonces se han desarrollado en diferentes cultivos (Rani & Usha, 2013). Las plantas actualmente cultivadas corresponden a eventos transgénicos de distintas casas comerciales.

Un evento de transgénesis se refiere al único evento de recombinación de DNA que tuvo lugar en el núcleo de una célula vegetal a partir de la cual se generaron plantas completas (<http://www.gmo-compass.org/eng/glossary/163.event.html>). Cada célula que incorpora con éxito el gen de interés representa un "evento" único. Los eventos que resultan en una expresión óptima de transgenes y rasgos se consideran eventos de "élite" y a partir de estos se pueden generar plantas con eventos simples (solo un transgen) y con eventos apilados (múltiples transgenes) (Giraldo, 2011).

Algunos cultivos genéticamente modificados (GM) que presentan rasgos "apilados" o "piramidales" son obtenidos por mejoramiento genético convencional cruzando líneas puras GM cada una con diferentes eventos. También existen los híbridos GM y estos difieren de los anteriores en que el rasgo transgénico se origina a partir de la línea parental endogámica GM cruzada con una (o más) línea (s) endogámica (s) de élite no transgénica (De Schrijver *et al.*, 2007).

En ambos casos los genomas de las plantas GM portan elementos genéticos adjuntos a los genes de interés. Estos elementos son secuencias reguladoras y genes de selección que intervienen en la correcta expresión del gen de interés y en la detección de las células transformadas, respectivamente. Los elementos más comunes en los cultivos GM de primera generación son el promotor 35S, el terminador *nos* y el gen *nptII*, entre otros. Dichos elementos pueden ser utilizados para la detección y caracterización de inserciones en el genoma de una planta GM (Liu *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2013).

La detección del 35S, Tnos y/o *npfl* permite conocer las muestras que son transgénicas debido a la presencia de estos elementos sin embargo, analizar los distintos tipos de eventos GM con fines de diferenciación basándose únicamente en la detección, puede no ser una buena alternativa cuando se trata de un evento simple o apilado en el mismo o distinto fondo genético.

Una alternativa viable para este caso es el análisis de variabilidad existente en el fondo genético mediante marcadores moleculares. Por ejemplo, los denominados inter-secuencias simples repetitivas (ISSR por sus siglas en inglés) han sido muy utilizados en la identificación de cultivares, clasificación de accesiones y en la estimación de diversidad o variabilidad genética (Dávila *et al.*, 2007). Actualmente algunas investigaciones han demostrado la funcionalidad de éste y otros sistemas de marcadores para determinar la similitud y variabilidad genética en algodones GM (Ullah *et al.*, 2012; Chandrashekar *et al.*, 2015; Ashraf *et al.*, 2016).

Otra técnica ampliamente utilizada en la diferenciación de plantas GM con los mismos elementos genéticos dentro del mismo fondo genético es la TAIL-PCR que proporciona fragmentos adyacentes al sitio de inserción del transgen (Liu & Whittier, 1995).

Basándose en el fundamento de ambas técnicas, al combinar iniciadores tipo ISSR con iniciadores para la detección de elementos genéticos, se podrían obtener fragmentos que contengan la información genética de la planta adyacente al sitio de inserción del transgen y utilizarlos para generar marcadores y/o sondas que identifiquen a un evento (inserción) específico.

Con base en lo anterior, la presente investigación, tuvo los siguientes objetivos:

Objetivo General

Desarrollar una metodología con técnicas de biología molecular para identificar, caracterizar y diferenciar eventos transgénicos en algodón y en crisantemo

Objetivos Específicos

Determinar el mejor método de extracción de DNA desde el punto de vista de cantidad y calidad.

Detectar elementos transgénicos comunes mediante la tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Aplicar la técnica de Southern blot para ubicar la posición del transgen en el DNA de las muestras GM.

Caracterizar los genotipos utilizando la técnica de ISSR con fines de diferenciación.

Generar marcadores moleculares mediante la combinación de iniciadores específicos del gen *npII* e ISSR relacionados al transgen en los genotipos GM.

Hipótesis

Las huellas de DNA o los marcadores moleculares reproducibles podrían utilizarse para diferenciar e identificar un evento transgénico en un mismo locus en una misma variedad, pero también en el contexto de diferentes fondos genéticos; su uso para el análisis de eventos transgénicos generados en distintos fondos genéticos podría ser eficiente para diferenciar genomas modificados por ingeniería genética o para referenciar la inserción del transgen.

REVISIÓN DE LITERATURA

Organismos Genéticamente Modificados

De acuerdo con la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, cualquier organismo vivo con excepción de los seres humanos, que haya adquirido una combinación genética novedosa generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna, define a un organismo genéticamente modificado.

Tipos de eventos transgénicos

1.- Evento simple: Es cada una de las variantes de la integración del transgen o inserción particular de DNA, ocurrida en el genoma de una célula vegetal a partir de la cual se originó la planta transgénica. En otras palabras, se puede definir como el producto de la incorporación de un paquete particular de material genético en un lugar definido o arbitrario en el genoma del organismo. Debido a la inserción aleatoria, el resultado del evento de modificación se vuelve variable y debe realizarse un procedimiento de selección después de la modificación para identificar cualquier evento de transformación exitoso o útil (Husby, 2007). Algunos casos de evento simples se ejemplifican a continuación:

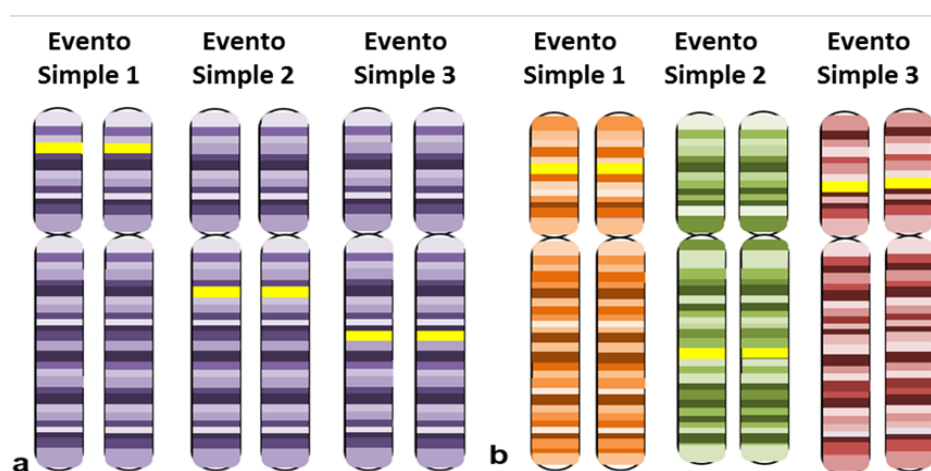


Figura 1. Ejemplos de eventos simples donde el T-DNA se encuentra: a) en diferente locus dentro de fondos genéticos iguales; b) en diferente locus dentro de distinto fondo genético. La banda color amarillo hace referencia al transgen.

2.- Evento apilado: Se denomina evento apilado a los productos que se desarrollaron por mejoramiento convencional mediante el cruce entre plantas transgénicas que contienen eventos simples o dobles por lo que se obtienen diferentes plantas GM con nuevos rasgos (Giraldo, 2011). Algunos casos de eventos apilados se ejemplifican a continuación:

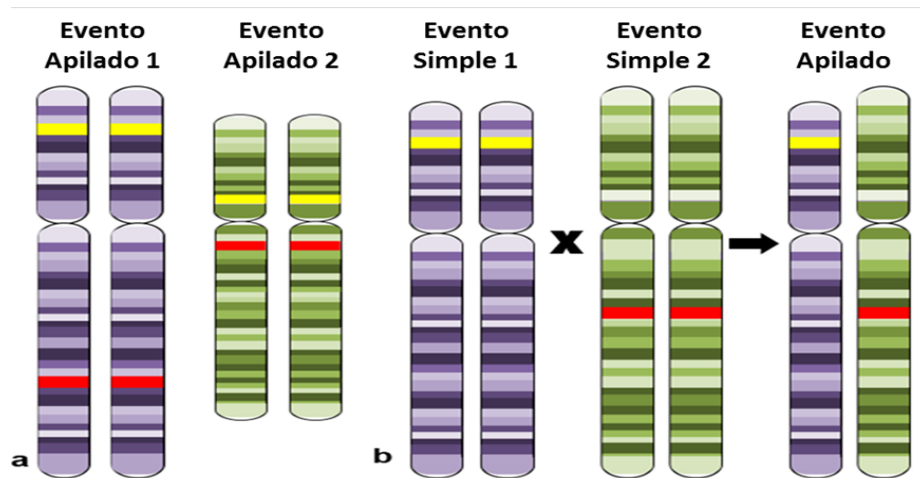


Figura 2. Ejemplos de eventos apilados: a) Dos casetes diferentes (T-DNA) en diferente locus dentro de un fondo genético; b) Distintos T-DNA en diferente locus dentro de cromosomas homólogos. Las bandas color amarillo y rojo hacen referencia a distintos transgenes.

3.- Evento híbrido: el rasgo transgénico se origina a partir de la línea parental endogámica GM cruzada con una (o más) línea (s) endogámica (s) de élite no transgénica (De Schrijver *et al.*, 2007). Un ejemplo se muestra a continuación:

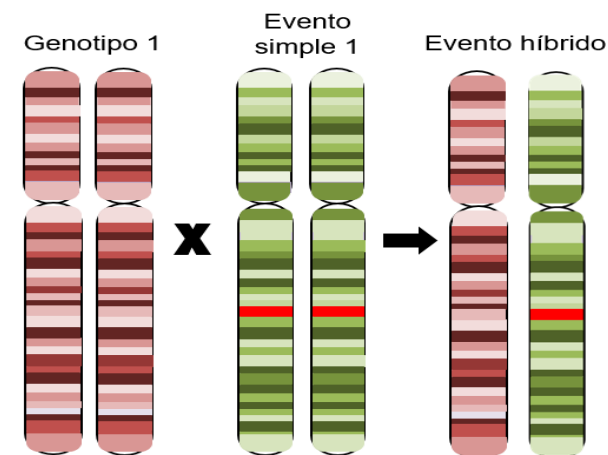


Figura 3. Ejemplo de híbrido GM con un solo casete de información (T-DNA). La banda color rojo hace referencia al transgen.

Los eventos de transformación son únicos y difieren en:

- Tipo de transgen (elementos y genes) insertado
- Posición del transgen en el genoma del organismo receptor
- Número de copias del transgen integradas al genoma
- Nivel de integridad del transgen
- Niveles de expresión de las proteínas de interés

Los ejemplos anteriores demuestran los diferentes casos de eventos GM que deben ser analizados minuciosamente para lograr diferenciarlos. A continuación se detallan las estrategias de análisis comúnmente utilizadas en la detección de organismos genéticamente modificados finalizando con la explicación de técnicas que podrían funcionar para lograr la diferenciación de los casos expuestos anteriormente.

Estrategias de análisis para muestras de OGMs

Análisis cualitativos

Se refiere a aquellos que dan una respuesta positiva o negativa respecto de la presencia de un elemento. Es decir, en el caso de los transgénicos, aquellos que determinan presencia o ausencia de una secuencia de DNA, de proteína o fenotipo debido al transgen. Algunos métodos utilizados son: el bioensayo, el análisis de proteínas utilizando tiras reactivas o un ensayo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) cualitativo, Southern blot y la PCR (Polymerase Chain Reaction) (Kholi *et al.*, 2010).

Análisis Semi-cuantitativos

Estos ensayos implican el análisis de una determinada cantidad de sub-muestras para las cuales, la presencia o ausencia de un determinado elemento, se determina de manera cualitativa. La estrategia radica en analizar una determinada cantidad de grupos (N) de tamaño conocido de semillas o granos (m) y la estimación estadística (siguiendo una distribución binomial o de Poisson) del porcentaje de elemento presente en la muestra (Longo & Vicario, 2010).

Análisis Cuantitativos

Se refieren a la determinación del porcentaje de OGM en una muestra o lote. Esta cuantificación es posible debido a la metodología empleada y no debido a una estimación estadística, como en el caso anterior. La técnica cuantitativa por excelencia, ampliamente utilizada en las transacciones comerciales, es la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (Longo & Vicario, 2010).

Las técnicas empleadas en ésta investigación pertenecen a la categoría de análisis cualitativos.

Métodos de detección de OGMs

Bioensayos

Este método cualitativo consiste en la evaluación de la respuesta fisiológica a manera de determinar la presencia del transgen buscado, por ejemplo la tolerancia a un herbicida o a un antibiótico como la Kanamicina. En el caso de plantas tolerantes a un herbicida, el ensayo consiste en poner a germinar las semillas y evaluar la emergencia de plántulas normales bajo el efecto del herbicida. El porcentaje de plántulas tolerantes se determina contando a aquellas normales sobre las semillas totales. Paralelamente a este ensayo debe realizarse el ensayo control, que consiste en la prueba de germinación sin el herbicida, a manera de determinar el poder germinativo de la muestra. La evaluación de la resistencia a insectos se realiza mediante ensayos biológicos complejos y de larga duración, es por eso que los bioensayos no son una alternativa práctica para dicha característica (Longo & Vicario, 2010).

Determinación de proteínas

Las proteínas producto de la expresión de un transgen pueden determinarse utilizando una reacción inmunológica de tipo proteína GM-anticuerpo que es posible realizar tanto en placa (ELISA), como sobre un soporte de nitrocelulosa (tiras reactivas). Con éste método se detecta la sustancia de interés (proteína) mediante la formación de un complejo antígeno-anticuerpo que luego es detectado mediante un complejo enzimático que se une específicamente al complejo anterior permitiendo su visualización. Es aconsejable que se realicen sobre semillas/grano u otro material vegetal “joven”, ya que las proteínas se degradan con facilidad (Longo & Vicario, 2010). La cantidad habitual de tejido transgénico es de al menos 10 µg por muestra y los límites de detección pueden predecir la presencia de proteínas modificadas en el orden de un 1 % de OGM, (López *et al.*, 2003). En ciertos casos donde distintos eventos transgénicos tienen incorporadas las mismas proteínas, no es posible determinar específicamente de qué evento se trata si el resultado es positivo.

Identificación de secuencias transgénicas

Este análisis se lleva a cabo mediante la tecnología de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). La PCR es un proceso altamente específico que permite determinar el evento transgénico que contiene una muestra, algo que no se puede lograr de manera fehaciente con los métodos anteriores. Esta especificidad está dada por los “primers” o cebadores que son pequeños fragmentos de DNA que reconocen la secuencia a amplificar y se adhieren a ella permitiendo iniciar la reacción de amplificación. Distintos primers son capaces de pegarse en diferentes zonas del fragmento de DNA introducido, estas zonas son cuatro: secuencias promotoras o terminadores que suelen ser comunes a varios eventos; el gen que confiere el carácter específico; una región denominada “construcción específica” que es aquella que vincula distintos elementos del fragmento de DNA introducido, por ejemplo la región promotora y el gen; y lo que se denomina “evento específico” que es una región que vincula el fragmento introducido con el genoma original de la planta (Fig. 4) (Díaz *et al.*, 2010).

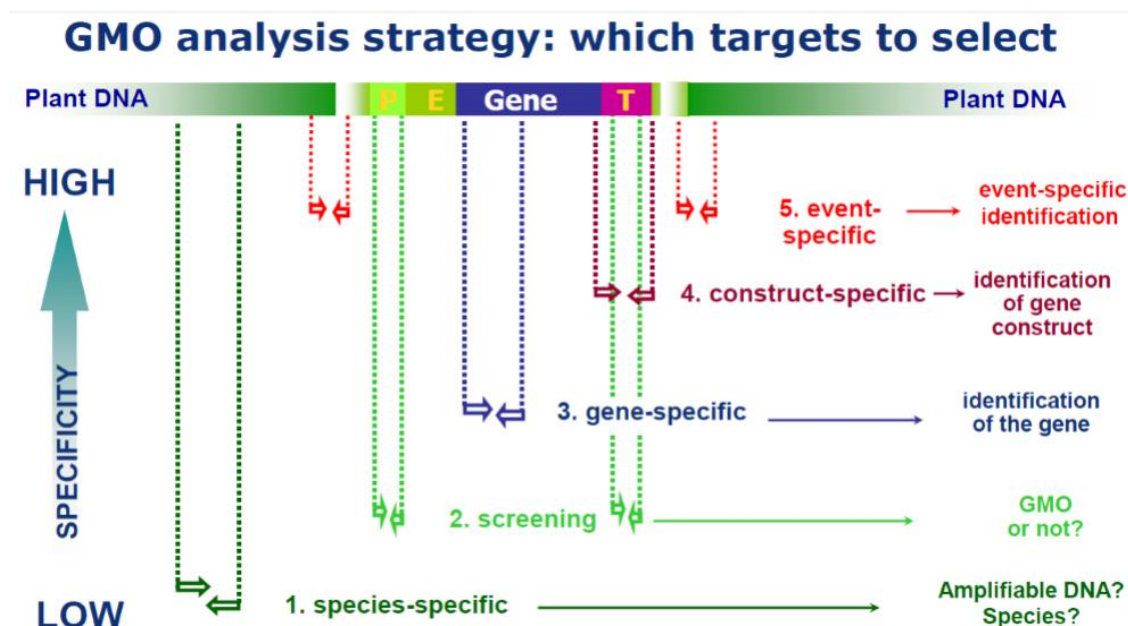


Figura 4. Especificidad en la identificación de transgénicos. Fuente: SENASICA 2015.

El ensayo de PCR puede ser de tipo cualitativo, lo que se conoce como PCR convencional o en tiempo final, o cuantitativo, refiriéndose a la PCR en tiempo real. En el primer caso, se puede estimar el porcentaje de un OGM en una muestra o lote siguiendo una estrategia de sub-muestreo, siempre contando con los controles adecuados para el ensayo (Longo & Vicario, 2010).

La PCR en tiempo real se denomina así porque el DNA amplificado puede ser detectado en línea durante la fase exponencial de la reacción, garantizando así una cuantificación más adecuada y precisa del producto amplificado. Esta técnica combina el uso de un termociclador, un fluorómetro y un ordenador. El termociclador efectúa la reacción en condiciones donde un fluorocromo excitado por un láser va emitiendo una señal de manera proporcional a la cantidad de DNA que se va generando durante los sucesivos pasos de la reacción. La emisión de la señal fluorescente es enviada al fluorómetro que cuantifica la señal emitida. El ordenador procesa la información y despliega, durante cada ciclo de amplificación, la fluorescencia leída en cada muestra. La señal aparecerá a partir de un número determinado de ciclos, dependiendo de la concentración inicial de la secuencia de interés, es decir, la señal es apreciable por el equipo una vez que sobrepasa el límite inferior de detección. A partir de ese momento, la cinética de la reacción debe permitir la acumulación de la señal de manera exponencial en el tiempo. La señal de fluorescencia generada es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR amplificado. Con la técnica de PCR en tiempo Real se obtienen resultados cuantitativos muy precisos del número de copias o la actividad transcripcional de un gen particular en un menor tiempo. Esta técnica permite obtener una mayor sensibilidad y especificidad y reduce la posibilidad de contaminación ya que no es necesario, una vez terminada la reacción, manipular los productos de amplificación (Longo & Vicario, 2010).

Nuevas metodologías

Existe una tecnología denominada microchips o microarrays o micromatrices, que permite detectar y cuantificar en un sólo ensayo la presencia de cientos o miles de secuencias. A grandes rasgos, una micromatriz es un pequeño soporte sólido del tamaño de un cubre objetos de los utilizados en microscopía óptica, en el cual se han fijado puntos ordenados y microscópicos de secuencias de DNA de simple cadena conocidas. Estas secuencias tienen la capacidad de pegarse (hibridar) con un DNA que le sea complementario, y que estará marcado con una molécula fluorescente. Si existen secuencias complementarias, ocurrirá la hibridación y el punto de la micromatriz quedará marcado. Para poder realizar la observación de este pequeño punto, un aparato de barrido especial realizará la lectura, identificando los puntos marcados y por lo tanto las secuencias que estén presentes en la muestra bajo análisis (Longo & Vicario, 2010).

Ventajas y Desventajas

Existen diferencias muy notables en cada uno de los métodos de detección de OGM, la decisión de aplicar cualquiera de ellos depende de múltiples factores que deben considerarse antes de comenzar la evaluación, por lo que a continuación se presentan algunas de las características más importantes de los métodos anteriormente descritos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales características de los métodos más usados para detectar OGMs.

	BIOENSAYO	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS	PCR TIEMPO FINAL	PCR TIEMPO REAL
Objetivo del ensayo	Detectar características biológicas o respuestas fisiológicas	Detectar proteínas. Determinar la reacción proteína GM-anticuerpo	Detectar secuencias de DNA transgénicas	Detectar secuencias de DNA transgénicas
Tipo de resultado	Cualitativo	Cualitativo, cuantitativo y Semi-cuantitativo con submuestreo	Cualitativo, Semi-cuantitativo	Cuantitativo
Matriz donde se realiza	Semillas, granos y plántula	Semillas, granos, material vegetal, raíces y alimentos sin procesamiento	Semillas, granos, tejidos, alimentos con y sin procesamiento	Semillas, granos, tejidos, alimentos con y sin procesamiento
Ventajas	Método sencillo, rápido preciso y económico	Método sencillo, permite detección " <i>in situ</i> ". No necesita material ni instalaciones sofisticadas. Preciso, exacto y rápido	Método sensible, exacto, específico, permite identificar eventos específicos.	Método sensible, exacto, específico, permite identificar eventos específicos.
Desventaja	Muy tardado, ligeramente costoso y de difícil realización	Requiere alta expresión de proteína, no permite identificar entre eventos GM distintos que expresen la misma proteína. No diferencia entre proteína GM y la convencional	Detección compleja si no se define el muestreo, la estrategia de detección y los materiales de referencia. Mayor posibilidad de contaminación.	Cuantificación compleja si no se define el muestreo apropiado, la estrategia de detección y los materiales de referencia. Mayor costo en equipos y reactivos
Preparación de muestra	Sencilla	Sencilla pero requiere pasos previos para la extracción de proteínas	Compleja, requiere pasos previos para extraer DNA	Compleja, requiere pasos previos para extraer DNA
Tiempo p/resultados	Dependiendo del cultivo, entre 7 y 10 días	Horas	De 2 a 3 días	De 1 a 2 días
Nivel de sensibilidad	NA	Alta De 1 a 2 %	Muy Alta Fluctúa entre 20 pg a 10 ng = 0.0001 a 1 %	Muy Alta Fluctúa entre 20 pg a 10 ng = 0.0001 a 1 %
Nivel de conocimientos	Requiere manejo mínimo de la técnica	Requiere manejo mínimo de la técnica. Requiere mayor capacitación para ELISA en placa	Capacitación en técnicas de biología molecular	Capacitación en técnicas de biología molecular
Aplicación del método	Determinar pureza del carácter por organismos de control o la industria	Determinar pureza del carácter por organismos de control o la industria	Determinación y ratificación por parte de organismos de control. Transacciones comerciales	Por su carácter cuantitativo, es el método de elección para transacciones comerciales
Material de referencia	Semillas o granos GM y no GM	Material GM y no GM (Granos, semillas y/o tejidos)	Harinas GM, DNA y plásmidos. Disponibles para algunos eventos	Harinas GM, DNA y plásmidos. Disponibles para algunos eventos

Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son una herramienta que permite conocer los polimorfismos a nivel de DNA de un organismo, se han usado extensivamente en estudio de evolución, filogenia, taxonomía molecular, estructura genética de poblaciones, mejoramiento genético y recientemente en la identificación de cultivares estrechamente relacionados (Pérez de la Vega, 1993; Staub *et al.*, 1996; Dávila *et al.*, 2007). Para dicho efecto, se pueden utilizar:

ISSR (Inter-Seuencias Simples Repetitivas)

Estos marcadores permiten obtener amplicones que corresponden a secuencias ubicadas entre dos microsatélites del mismo tipo; por ejemplo, la región de DNA interna entre dos microsatélites compuestos de (GACA)_n (Zietkiewicz *et al.*, 1994). La diferencia entre individuos analizados con éste tipo de iniciadores se observará en el número de productos amplificados así como el tamaño de cada producto. Tienen la ventaja de no requerir información previa sobre secuencias de DNA para el diseño de los iniciadores, pero como desventaja son marcadores dominantes lo cual no permite distinguir entre homocigotas y heterocigotas (Pradeep Reddy *et al.*, 2002).

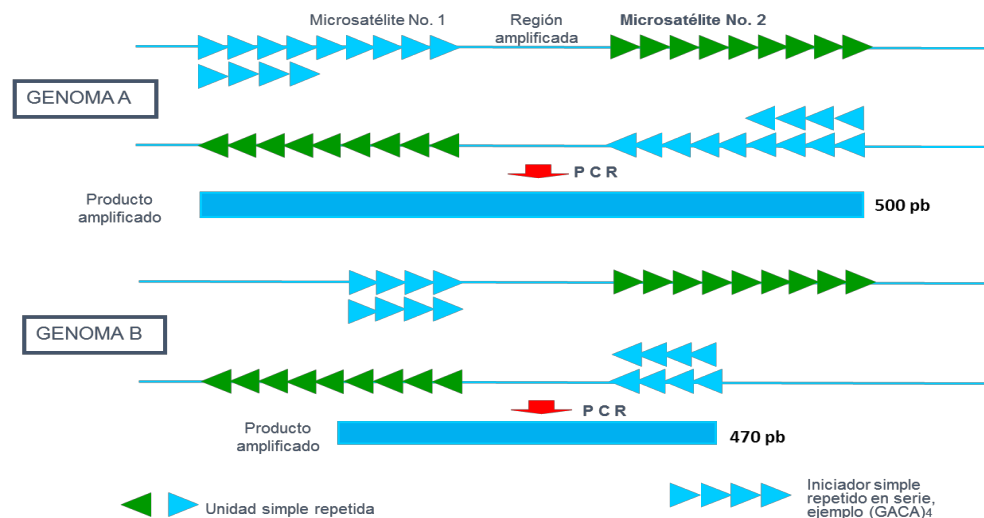


Figura 5. Modelo de la obtención de marcadores tipo ISSR. Los productos amplificados en cada genoma son diferentes en longitud pero ambos están flanqueados por sus extremos con la secuencia (GACA)₄.

Southern blot

Es una de las herramientas moleculares más poderosas para caracterizar las plantas transgénicas. Indica la presencia o no de la secuencia de interés y da información acerca de la integración de la misma en el genoma de la célula huésped (número de copias integradas y número de loci en los cuales se produjo la integración). La técnica consiste en la digestión del genoma de un organismo con una enzima de restricción y la transferencia del patrón de fragmentos separados por electroforesis a una membrana de nylon para exponerla a una sonda marcada con digoxigenina, que posee una secuencia homóloga a uno o más fragmentos y por último realizar la detección de las bandas de hibridación por luminiscencia (Azofeifa, 2006). Si se utiliza como sonda el T-DNA completo y la digestión del DNA genómico se realiza con enzimas de restricción que no cortan dentro del T-DNA, el número de bandas del patrón representa el número de sitios de inserción (Díaz *et al.*, 2010).

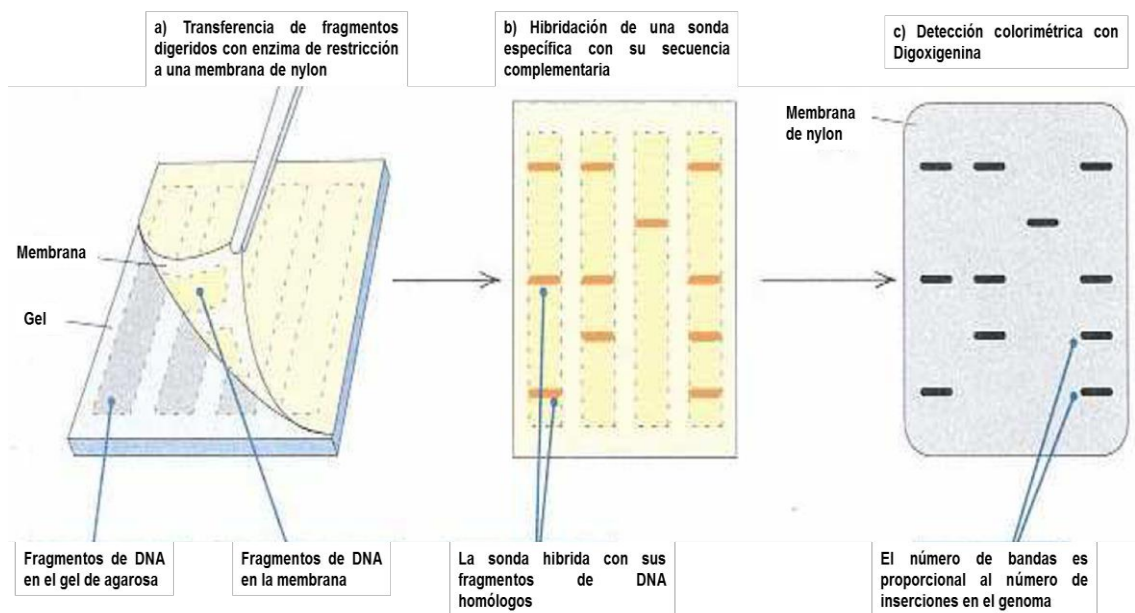


Figura 6. Diagrama de flujo de la técnica Southern blot. Fuente: Hartl & Jones, 1998.

TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced PCR)

La TAIL-PCR es una herramienta poderosa que sirve para obtener fragmentos de DNA adyacentes a una secuencia conocida. Esta técnica utiliza tres iniciadores específicos anidados (SP) que en reacciones consecutivas junto con un iniciador arbitrario y degenerado (AD), de baja temperatura de alineamiento, permiten que la frecuencia relativa de amplificación de productos específicos y no específicos pueda ser controlada térmicamente (Clarke, 2003). Sus principales ventajas son la simplicidad, alta especificidad, eficiencia y sensibilidad, rapidez y la secuenciación directa al no requerir purificación del producto (Liu & Whittier, 1995). En materiales transgénicos esta técnica ha sido ampliamente utilizada para conocer las secuencias adyacentes al sitio de inserción del T-DNA, la estructura de la información, frecuencia de integración y la distribución de loci transgénicos (Zhang *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2013). Una vez conocidas las secuencias adyacentes se pueden diseñar iniciadores específicos que amplifiquen el sitio de inserción del transgen. Además, si uno de los iniciadores está diseñado para alinear con la secuencia adyacente al T-DNA, se podrían utilizar para identificar y diferenciar el evento específico aunque se encuentre en distintos fondos genéticos.

Iniciadores combinados para amplificación de secuencias adyacentes

De acuerdo con distintos autores, todos los organismos eucariontes presentan secuencias tipo microsatélite (SSR) en su genoma (Weising & Kahl, 1990; Akkaya *et al.*, 1992; Beckmann & Weber, 1992). Distintas investigaciones señalan que están presentes en una alta frecuencia y que en plantas como *Arabidopsis*, maíz, soya, arroz o trigo se puede encontrar un microsatélite cada 6.3 kb (Cardle *et al.*, 2000; Morgante *et al.*, 2002) por lo tanto, dado que la inserción del transgen dentro del genoma de una planta usualmente ocurre al azar (Krysan *et al.*, 2002) y a que hay reportes de integración de transgenes entre secuencias tipo microsatélite (Yang *et al.*, 2013), dos casos pueden ocurrir:

1) Insertarse entre dos secuencias microsatélite del mismo tipo



Figura 7. Modelo de transgen insertado entre dos secuencias microsatélite del mismo tipo

2) Insertarse dentro de una secuencia microsatélite



Figura 8. Modelo de transgen insertado dentro de una secuencia microsatélite

En ambos casos se pueden utilizar iniciadores tipo ISSR en combinación con iniciadores específicos de uno o más de los elementos genéticos para la obtención de secuencias adyacentes al transgen.

LITERATURA CITADA

- Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A., & Cregan, P. B. (1992). Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*, 132(4), 1131–1139.
- Ashraf, J., Malik, W., Iqbal, M., Khan, A., Qayyum, A., Noor, E., ... & Ahmad, M. Q. (2016). Comparative analysis of genetic diversity among Bt cotton genotypes using EST-SSR ISSR and morphological markers. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18(2), 517–531.
- Azofeifa, D. A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221–242.
- Beckmann, J., & Weber, J. (1992). Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, 12, 627–631.
- Cardle, L., Ramsay, L., Milbourne, D., Macaulay, M., Marshall, D., & Waugh, R. (2000). Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics*, 156, 847–854.
- Chandrashekar, R., Prasad, B., Vankudothu, N., Chaitanya, J., Bhavani, L., Reddy, R., & Rao K. (2015). A comparative genetic diversity study among elite Bt and Non-Bt cotton varieties of Andhra Pradesh by RAPD markers. *Discovery Biotechnology*, 6(16), 30–37.
- Clarke, A. (2003). TAIL (THERMAL ASYMMETRIC INTERLACED) PCR for obtaining DNA sequence from flanking regions. Allan Wilson Centre for Molecular Ecology and Evolution, 1–4.
- Dávila, M., Castillo, M. A., & Laurentin, H. (2007). Uso de marcadores moleculares ISSR para inferir las relaciones genéticas y la variabilidad intraespecífica en Agave. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)*, 33, 93–111.
- 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.
- Díaz, M., Zappacosta, D., Franzone, P., & Ríos, R. (2010). Aplicación de la transformación genética al mejoramiento vegetal. In G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, & L. Mroginski (Eds.), *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. (pp. 243-257). Buenos Aires: INTA.
- Giraldo, A., (2011). Cultivos transgénicos: entre los riesgos biológicos y los beneficios ambientales y económicos. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), 231–252.
- Hartl, D., & Jones, E. (1998). The Isolation and Characterization of Particular DNA Fragments. In D. Hartl, & E. Jones, (Eds.), *Genetics: Principles and Analysis* (4ed., pp. 199-206). Sudbury: Jones and Bartlett Publishers.

- Husby, J. (2007). Definitions of GMO/LMO and Modern Biotechnology. In T. Traavik, & L. C. Lim. (Eds.), *Biosafety First* (pp. 365-372). Trondheim: Tapir Academic Press.
- Kholi, A., Miro, B. & Twyman, R. (2010). Transgene Integration, Expression and Stability in Plants: Strategies for Improvements. In C. Kole, C. Michler, A. Abbott, & T. Hall. (Eds.), *Transgenic Crop Plants*. (pp. 201–229). Heidelberg, Alemania: Springer-Verlag.
- Krysan, P. J., Young, J. C., Jester, P. J., Monson, S., Copenhaver, G., Preuss, D., & Sussman, M. R. (2002). Characterization of T-DNA insertion sites in *Arabidopsis thaliana* and the implications for saturation mutagenesis. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 6(2), 163–74.
- Liu, Y.-G., & Whittier, R. F. (1995). Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, 25(3), 674–681.
- Liu, Y. G., Mitsukawa, N., Oosumi, T., & Whittier, R. F. (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal*, 8(3), 457–463.
- Longo, F. & Vicario, A. (2010). Detección de OGM en la Cadena Agroalimentaria. In G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp & L. Mroginski (Eds.), *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal II* (pp. 601-610). Buenos Aires: INTA.
- López, M., Mallorquín, P., & Vega, M. (2003). Tecnologías y Aplicaciones. In S. Enríquez (Ed.), *Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria, Informe de Vigilancia Tecnológica. GENOMA ESPAÑA/ CIBT-FGUAM* (pp. 12-28). España: Spainfo, S.A.
- Morgante, M., Hanafey, M., & Powell, W. (2002). Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, 30(2), 194–200.
- Pérez de la Vega, M. (1993). Biochemical characterization of populations. In M. D. Hayward, N. O. Bosemark, & I. Romagosa (Eds.), *Plant Breeding: Principles and Prospects* (pp. 184-200). London: Chapman & Hall.
- Pradeep Reddy M., Sarla N., Siddiq E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1), 9–17.
- Rani, S. J., & Usha, R. (2013). Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future. *Journal of Pharmacy Research*, 6(8), 879–883.
- Staub, J. E., Serquen, F. C., & Gupta, M. (1996). Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience*, 31(5), 729–741.
- Ullah, I., Iram, A., Iqbal, M. Z., Nawaz, M., Hasni, S. M., & Jamil, S. (2012). Genetic Diversity Analysis of *Bt* Cotton Genotypes in Pakistan Using Simple Sequence Repeat Markers. *Genetics and Molecular Research*, 11, 597–605.

- Weising, K., & Kahl, G. (1990). DNA fingerprinting in plants-the potential of a new method. *Biotech forum*, 7, 230–235.
- Yang, X., Li, F., Zhang, X., Liu, K., Wang, Q., Zhang, C., ... & Fang, W. (2013). Integration and characterization of T-DNA insertion in upland cotton. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 49(2), 51–57.
- Zhang, J., Cai, L., Cheng, J., Mao, H., Fan, X., Meng, Z., ... & Hong, Y. (2008). Transgene integration and organization in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genome. *Transgenic Research*, 17(2), 293–306.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome finger-printing by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176–183.

ANÁLISIS MOLECULAR DE EVENTOS TRANSGÉNICOS EN CRISANTEMO

MOLECULAR ANALYSIS OF TRANSGENIC EVENTS IN CHRYSANTHEMUM

R.C. Cid-Contreras¹, E. Valadéz-Moctezuma¹, J.O. Mascorro-Gallardo¹, A.J.

López-Herrera¹

¹Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco Km 38.5 Chapingo Edo. de México. CP 56230.

RESUMEN

Los eventos transgénicos son caracterizados molecularmente para proporcionar elementos que permitan conocer sus diferencias, específicamente aquellas debidas a la inserción del transgen. En este estudio se analizó mediante técnicas de biología molecular un set de muestras de crisantemo genéticamente modificado con la finalidad de diferenciarlas. Los materiales utilizados fueron los cultivares Harman e Indianapolis, con 3 y 2 eventos, respectivamente. Para comprobar la funcionalidad de las técnicas y como grupos de control se incluyeron muestras transgénicas de maíz con información conocida. Se ratificó la presencia de elementos genéticos mediante PCR convencional y con la determinación empírica de la efectividad de la detección se comprobó la presencia del *npII* y *Tnos* en las cinco muestras de crisantemo transformadas. Los genotipos se diferenciaron mediante perfiles de DNA obtenidos con 10 iniciadores tipo ISSR. El análisis estadístico se realizó con los métodos de agrupamiento UPGMA y PCoA. Los iniciadores generaron un total de 131 bandas de las cuales 78 fueron polimórficas (59.5 %). El porcentaje de polimorfismo de los iniciadores osciló entre 20 y 82 %. El iniciador más informativo fue UBC872 ya que proporcionó los valores más altos de porcentaje de bandas polimórficas, índice de marcador y poder de resolución. Los análisis UPGMA y PCoA mostraron la misma tendencia de agrupación. La técnica de ISSR fue útil para discriminar entre especies, cultivares y eventos transgénicos

Palabras clave: elementos genéticos, diferenciación, ISSR, UBC872.

Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Roberto Carlos Cid Contreras

Director de tesis: Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

ABSTRACT

Transgenic events are characterized molecularly to provide elements that allow to know their differences, specifically those due to the insertion of T-DNA. In this research a samples set of genetically modified chrysanthemum was analyzed using molecular biology techniques in order to differentiate them. The Harman and Indianapolis chrysanthemum cultivars were used, with 3 and 2 events, respectively. To verify the functionality of the techniques and as control groups, transgenic maize samples with known information were included. The presence of genetic elements was confirmed by conventional PCR and with the empirical determination of the detection's effectiveness the presence of *nptII* and *Tnos* was verified in the five transformed chrysanthemum samples. The genotypes were differentiated by DNA profiles obtained with 10 ISSR primers. Statistical analyzes were performed with different clustering methods (UPGMA y PcoA). The primers generated 131 DNA bands of which 78 were polymorphic (59.5 %). The percentage of polymorphism ranged from 20 to 82 %. The most informative primer was UBC872 as it provided the highest percentage values of polymorphic bands, marker index and resolving power. The UPGMA and PcoA analyzes showed the same trend of grouping. The ISSR technique was useful to discriminate between species, cultivars and transgenic events.

Keywords: genetic elements, differentiation, ISSR, UBC872.

INTRODUCCIÓN

El crisantemo (*Dendranthema X grandiflorum* Kitam) es una planta ornamental importante que ocupa el tercer lugar a nivel nacional en lo que respecta a especies ornamentales más demandadas (SAGARPA, 2010). La aparición de mutantes espontáneos “sports” y la generación de plantas transgénicas son la fuente de nuevos cultivares (Da Silva, 2003; Palai & Rout, 2011). Con estos avances surge la problemática de encontrar métodos para identificarlos y diferenciarlos (Lema-Ruminska *et al.*, 2004).

Los métodos basados en caracteres morfológicos tienen el inconveniente de ser laboriosos, tardados e influenciados por el ambiente (Shao *et al.*, 2010); por lo que una alternativa es el análisis mediante marcadores moleculares. Este método ya ha sido utilizado para detectar variaciones entre genotipos ornamentales (Rout & Mohapatra, 2006). En estudios anteriores, se ha logrado la diferenciación de variedades de crisantemo mediante isoenzimas (Fiebich & Henning, 1992; Roxas *et al.*, 1993), RFLPs (Wolff *et al.*, 1995), RAPDs (Miñano *et al.*, 2009) e ISSR (Palai & Rout, 2011).

Ante la presencia de varios sistemas de marcadores moleculares, la comparación entre ellos resulta indispensable para decidir qué sistema es el más adecuado para el tema que se está investigando (Gautam-Murty *et al.*, 2013). Estudios comparativos entre sistemas de marcadores tipo ISSR y RAPD han demostrado que los primeros son más eficientes para determinar diferencias entre cultivares de crisantemo (Mukherjee *et al.*, 2013).

Los marcadores tipo ISSR detectan variaciones en los loci entre microsatélites (Zietkiewicz *et al.*, 1994), además proporcionan una excelente fuente de polimorfismo (Staub *et al.*, 1996) y tienen la ventaja de ser un sistema altamente reproducible y de bajo costo (Fang *et al.*, 1997). Este sistema es ideal para los laboratorios que tienen equipos de análisis molecular básicos (Kayis *et al.*, 2010).

En plantas genéticamente modificadas, distintas investigaciones reportan que utilizando este tipo de marcadores se ha logrado establecer relaciones genéticas, estructura de poblaciones, diferenciación de cultivares e identificación de individuos (Ullah *et al.*, 2012; Tyagi *et al.*, 2014; Chandrashekar *et al.*, 2015). Además, es adecuado para estudiar la diversidad genética entre materiales genéticamente modificados debido a su capacidad de producir un alto número de bandas por reacción (Ashraf *et al.*, 2016).

Por lo anterior, en éste trabajo se analizó un set de muestras de crisantemo con la finalidad de ratificar mediante PCR los elementos genéticos que porta cada genotipo, agruparlos con base en sus similitudes, determinar la posición del transgen por hibridación no radioactiva, diferenciar los genotipos mediante perfiles de DNA y finalmente obtener marcadores moleculares específicos relacionados con el transgen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron cinco eventos de crisantemo genéticamente modificado más dos genotipos correspondientes a las variedades no transgénicas utilizadas como control negativo. Los eventos comerciales de maíz YieldGard Plus y YieldGard CB/RR fungieron como referencias por portar los elementos genéticos 35S y *Tnos*; la construcción del T-DNA de cada evento se muestra en el apéndice II. En el análisis molecular se incluyó al plásmido pBI121 como control positivo por contener el gen *npII*.

Cuadro 2. Descripción de los genotipos empleados.

No.	CÓDIGO	VARIEDAD	PROCEDENCIA
1	Har-NT*	Harman	UACH
2	Har-Rd8	Harman	UACH
3	Har-Rd10	Harman	UACH
4	Har-Rd18	Harman	UACH
5	Ind-NT*	Indianapolis	UACH
6	Ind-35S8	Indianapolis	UACH
7	Ind-35S19	Indianapolis	UACH
8	YG-CB/RR	NK603 x MON810	UACH
9	YG-Plus	MON863 x MON810	UACH
10	Maíz-NT*	---	UACH
11	pBI-121**	---	UACH

*, **: Control negativo y positivo conocidos, respectivamente.

Extracción de DNA

A partir de distintas cantidades de tejido vegetal de cada material (Cuadro 4) se realizó la extracción de DNA siguiendo el método SDS con ligeras modificaciones (Apéndice I). Los productos de extracción se analizaron cuantitativamente mediante espectrofotometría en un Nanodrop (ND-1000) y cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8 % teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL).

Dilución del DNA

Se ajustó la concentración de las muestras a 20 ng/µL en un volumen final de 100 µL, para lo cual se utilizó la siguiente formula:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

Donde:

C_i = concentración inicial

V_i = volumen inicial

C_f = concentración final

V_f = volumen final

Detección de elementos genéticos

Se evaluaron los iniciadores para el promotor 35S, gen *nptII* y el *Tnos* (Cuadro 3) con tres repeticiones independientes. La mezcla para PCR contenía 200 μ M dNTPs, 1X Taq buffer, 3 mM MgCl₂, 20 pmol primers, 1 U Taq DNA polimerasa (Promega) y 100 ng de DNA genómico. Las reacciones se llevaron a un volumen final de 25 μ L con agua HPLC. Se utilizó un termociclador GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems (USA) con la siguiente programación para todas las reacciones: 1 ciclo de pre-desnaturalización a 94 °C durante 5 min, 35 ciclos (94 °C, 60 s; 62 °C, 45 s; 72 °C, 60 s) y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR fueron visualizados en electroforesis vertical en geles de acrilamida 8 % y tinción con nitrato de plata. Una mezcla con todos los componentes exceptuando el DNA genómico fue utilizada como blanco.

Cuadro 3. Características de los iniciadores utilizados.

Nombre	Secuencia del iniciador	T _m ¹ (°C)	Amplicón (pb)	Fuente
35S	F: 5'-GCT CCT ACA AAT GCC ATC AGA TAG T-3' R: 5'-GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA-3'	61	195	Díaz y Galindo (2014)
<i>nptII</i>	F: 5'-TGA TTG AAC AAG ATG GAT TGC-3' R: 5'-GAA CTC GTC AAG AAG GCG ATA-3'	60	780	Ghanem, (2011)
<i>Tnos</i>	F: 5'-GAA TCC TGT TGC CGG TCT TGC G-3' R: 5'-GCG GGA CTC TAA TCA TAA AAA CCC-3'	60	130	Díaz y Galindo (2014)

¹ Temperatura de alineamiento utilizada.

Con los resultados de las tres amplificaciones independientes para cada elemento transgénico se realizó la determinación empírica (visual) de la efectividad de su detección y se calculó el porcentaje de falsos positivos y negativos. Esta información se codificó en una matriz binaria (banda presente 1 y ausente 0) considerando la presencia del elemento transgénico en la muestra, al observar al menos dos resultados positivos de los tres ensayos de detección de cada elemento. Se aplicó un análisis de conglomerados UPGMA usando el coeficiente Simple Matching para agrupar a las muestras conforme a su similitud.

Digestión enzimática del DNA y técnica Southern blot

Los siguientes componentes fueron incluidos en una reacción de digestión enzimática para cortar el DNA genómico: 20 µg de DNA, 10 µL de 10× H buffer, 1 µL de BSA (10 mg/mL), 8 µL de la enzima *EcoRI* (8-20 U/µL) y agua HPLC hasta alcanzar un volumen final de 100 µL. Se homogenizó cada una de las mezclas con un pulso en vortex y centrifuga. Las reacciones fueron incubadas a 37 °C durante toda la noche y al día siguiente se procedió a visualizar la digestión mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa 0.8 %. El producto de PCR obtenido con los iniciadores del gen *nptII* fue utilizado como sonda para la detección del transgen en la técnica Southern blot. El marcaje de la sonda, hibridación y detección fue realizado de acuerdo a las instrucciones del DNA-LAB/DET-KIT, NONRADIOACTIVE (Roche, Mannheim, Germany). Los procedimientos se repitieron hasta siete veces modificando las concentraciones de DNA, cantidad de enzima de restricción y tiempos de incubación con los respectivos anticuerpos.

Técnica ISSR

Otra estrategia empleada para diferenciar los genotipos fue el desarrollo de marcadores ISSR. Se evaluaron 25 iniciadores tipo ISSR (set #9 University of British Columbia) de los cuales 10 amplificaron en los materiales de crisantemo y maíz. La mezcla para PCR contenía 200 µM dNTPs, 1X Taq buffer, 3 mM MgCl₂, 20 pmol primer, 1 U Taq DNA polimerasa (Promega) y 100 ng de DNA genómico. Las reacciones se llevaron a un volumen final de 25 µL con agua HPLC. Se utilizó un termociclador GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems (USA) con la siguiente programación: 1 ciclo de Pre-desnaturalización a 94 °C por 5 min, 35 ciclos (94 °C, 60 s; T_m del primer, 45 s; 72 °C, 3 min) y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de acrilamida 8 % y tinción con nitrato de plata. Los perfiles de bandeo se codificaron en una matriz binaria: banda presente (1), ausente (0). Se realizó un análisis de conglomerados UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) usando el

Coeficiente de Jaccard y análisis de coordenadas principales en el programa NTSYSpc 2.2. Para conocer la eficiencia de los iniciadores utilizados se calculó el contenido de información polimórfica (PIC), Resolving power (Rp) y marker Index (MI) de acuerdo con Valadez-Moctezuma *et al.* (2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de DNA

En el Cuadro 4 se muestran las cantidades de tejido vegetal de cada accesión así como la cantidad y calidad de DNA obtenidos con el método SDS con ligeras modificaciones (Apéndice I). La cuantificación en los materiales de crisantemo fluctuó entre 128 y 1032 ng/ μ L, mientras que con maíz fluctuó entre 1947 y 2355 ng/ μ L, en promedio se obtuvieron 511.5 y 2165.9 ng/ μ L, respectivamente.

Cuadro 4. Cantidad y calidad de DNA obtenida en los materiales evaluados.

Código	Muestra	Peso (gr)	Cantidad (ng/ μ L)	Calidad (260/280)
C1	Harman-NT*	3.18	356.5	1.8
C2	Harman-Rd8	0.88	150.7	1.8
C3	Harman-Rd10	0.95	161.5	1.7
C4	Harman-Rd18	0.73	128.1	1.7
C5	Indianapolis-NT*	2.94	1031.9	1.9
C6	Indianapolis-35S8	2.52	879.6	1.8
C7	Indianapolis-35S19	2.30	872.2	1.8
8	YG-CB/RR**	1.75	1947.1	1.8
9	YG-Plus**	3.41	2355.2	1.9
10	Maíz-NT*	3.23	2195.4	1.8

* y ** control negativo y positivo conocidos, respectivamente.

La Figura 9 muestra el resultado del análisis cualitativo, en todos los carriles se puede apreciar una banda gruesa que demuestra la funcionalidad del método SDS. Sin embargo, el barrido presente sobre el carril de las muestras 5 y 6, indica que hay DNA degradado producto de la propia técnica utilizada y la cantidad cargada en el gel; por ejemplo el carril tres presenta una banda de menor grosor respecto a la banda del carril 5 y 6, que son los carriles en donde se aprecia la degradación del DNA en mayor cantidad, por lo que se procedió a realizar lavados a dichas muestras. Para este trabajo, la cantidad de DNA obtenido era importante ya que en la técnica Southern blot se requirió una cantidad considerable de DNA por genotipo.

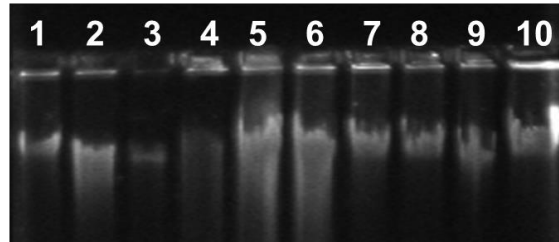


Figura 9. Gel de calidad de extracción de DNA. 1 a 7: materiales de crisantemo; 8 a 10: materiales de maíz.

Detección de elementos genéticos

Se obtuvieron amplicones de 160, 780 y 190 pb que identificaron a los elementos genéticos 35S, *nptII*, y *Tnos*, respectivamente (Fig. 10). Las muestras C6 y C7, ambas de crisantemo, no mostraron amplificación del promotor 35S a pesar de que fueron transformadas con el plásmido pBIN35S::ScTPS1TPS2::NOS (Apéndice II). En las muestras C2, C3 y C4 no se observó producto porque estas muestras contienen el promotor Rd en lugar del 35S (Cuellar, 2015). Los productos de amplificación obtenidos con los iniciadores del gen *nptII* se observaron únicamente en las muestras C2, C3, C4, C6 y C7, mientras que los obtenidos con los iniciadores del *Tnos* se observaron en todas las muestras a excepción de las utilizadas como control negativo (C1, C5, ZNT y B). Lo anterior indica congruencia con las características conferidas a estos materiales.

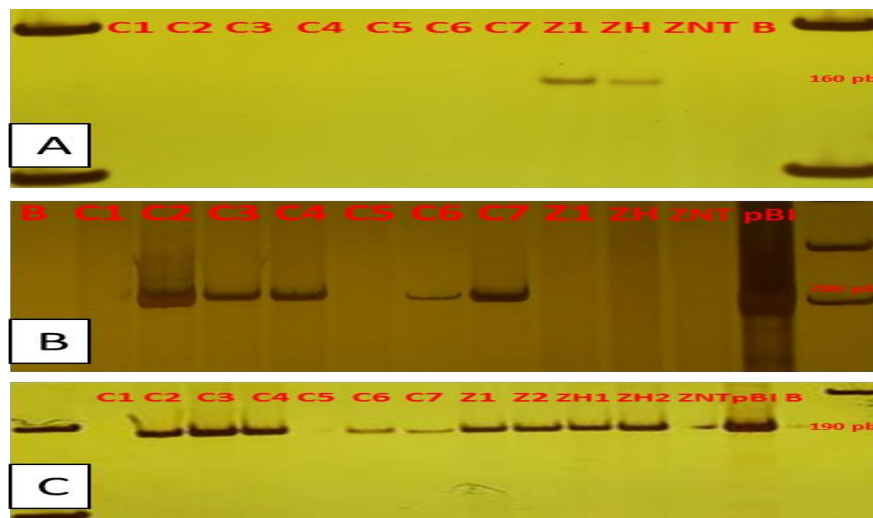


Figura 10. Detección de: (A) secuencia promotora 35S con 160 pb aproximadamente, (B) gen *nptII* con 780 pb, (C) secuencia *Tnos* con 190 pb. Carriles: C1 a C7 muestras de crisantemo; carriles Z1 a ZNT muestras de maíz; pBI: plásmido y B: blanco.

Con la determinación empírica se detectó un falso positivo (maíz NT) posiblemente debido a contaminación de la reacción durante la manipulación y/o a alineamientos inespecíficos de los iniciadores (Sánchez *et al.*, 2014). Los falsos negativos (27.27 %) únicamente se encontraron en la detección del promotor 35S y corresponden a las muestras Ind-35S8, Ind-35S19, YG-CB/RR, YG-Plus y el plásmido pBI121. Ningún falso negativo ni positivo fueron observados en la detección del gen *npII* por lo que en éste caso la especificidad fue del 100 % (Cuadro 5).

Cuadro 5. Determinación empírica de la efectividad de la detección

Muestra	35S			<i>npII</i>			Tnos			Frecuencia detectada
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Har-NT*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 de 9
Har-Rd8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	6 de 9
Har-Rd10	-	-	-	+	+	+	+	+	+	6 de 9
Har-Rd18	-	-	-	+	+	+	+	+	+	6 de 9
Ind-NT*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 de 9
Ind-35S8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	6 de 9
Ind-35S19	-	-	-	+	+	+	+	+	+	5 de 9
YG-CB/RR	+	+	-	-	-	-	+	+	+	5 de 9
YG-Plus	+	+	-	-	-	-	+	+	+	5 de 9
Maíz-NT*	-	-	-	-	-	-	-	+	-	0 de 9
pBI121	-	+	+	+	+	+	+	+	+	8 de 9
Blanco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 de 9
Frecuencia detectada	2 de 12	3 de 12	1 de 12	6 de 12	6 de 12	6 de 12	8 de 12	9 de 12	8 de 12	
(%) Falsos positivos	—			—			3.03			
(%) Falsos negativos	27.27			—			—			

El análisis de conglomerados con los resultados de la evaluación de los elementos genéticos generó 3 grupos importantes (Figura 11), el primero integrado por los genotipos no transgénicos, el segundo por los genotipos de crisantemo genéticamente modificados y el tercero contiene los dos eventos comerciales de maíz. El plásmido pBI121 quedó separado de los genotipos transgénicos porque fue el único que presentó los tres elementos genéticos evaluados.

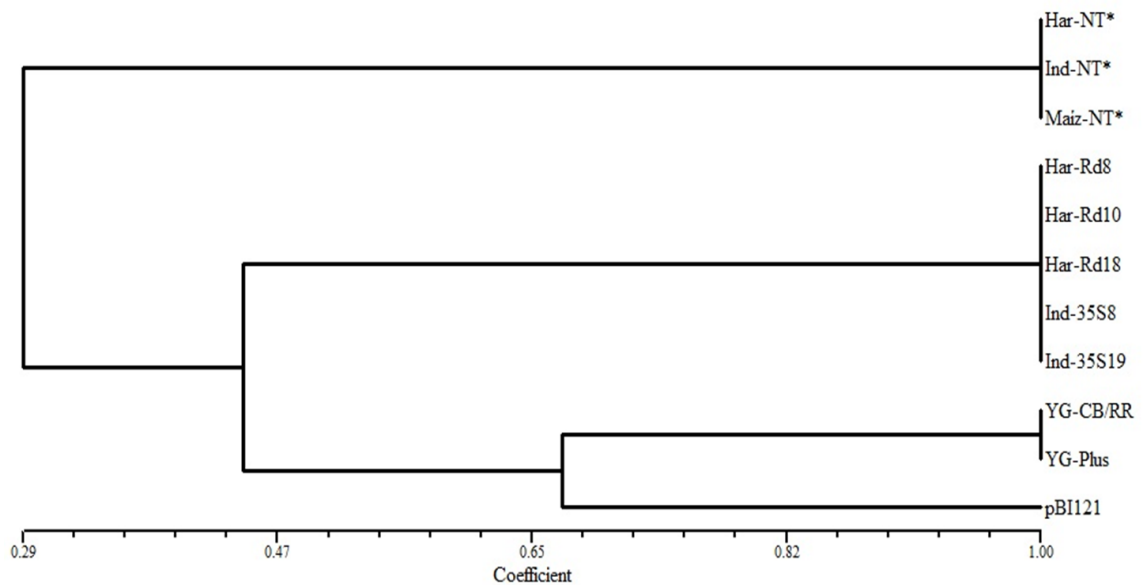


Figura 11. Dendrograma generado por el análisis de los elementos genéticos 35S, *nptII* y *Tnos* en siete genotipos de crisantemo y tres de maíz. * Controles negativos.

La separación de los grupos no transgénicos de los transgénicos reiteró que no todas las muestras del set eran transgénicas. La división de dos grupos transgénicos indicó que no todas las muestras portan los mismos elementos genéticos. A pesar de que los genotipos de crisantemo de la variedad Harman tienen diferente promotor que los genotipos de la variedad Indianapolis y todos representan diferentes eventos no fue posible su separación con ésta técnica.

Digestión enzimática del DNA y técnica Southern blot

Los productos de digestión separados en agarosa 0.8 % mostraron un barrido intenso indicando que la enzima de digestión *EcoRI* reconoció distintos sitios de corte a lo largo del genoma de los crisantemos, por lo que de acuerdo con Wolff *et al.* (1994), más evaluaciones con técnicas RFLP pueden ser aplicados a estos materiales con fines de diferenciación. Después de la transferencia a la membrana de nylon se comprobó que prácticamente el total del barrido había sido transferido (Fig. 12 B). La hibridación y detección realizada con la sonda *npII* marcada con digoxigenina durante los seis experimentos realizados resultó negativa y sólo en tres ocasiones se logró observar respuesta en el carril correspondiente al control (gen *npII* obtenido vía PCR) (Fig. 12 C).

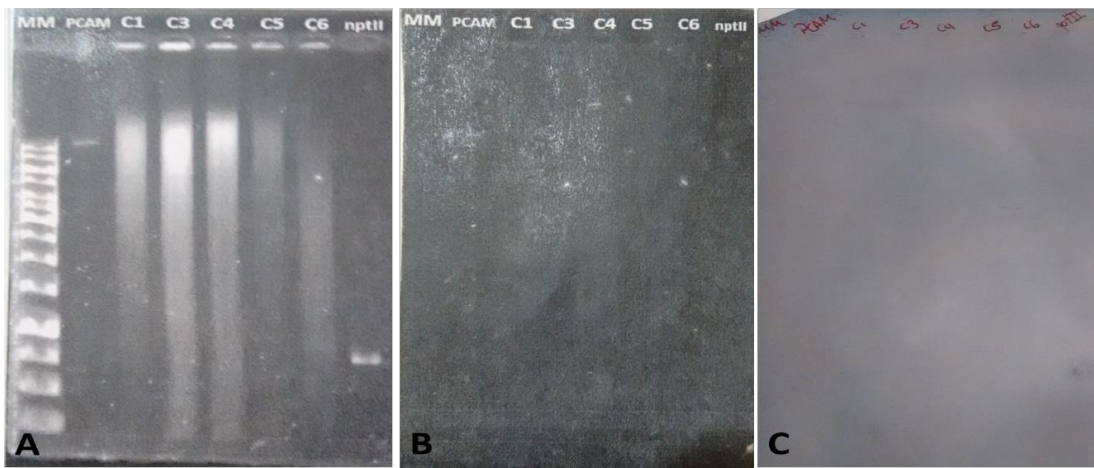


Figura 12. a) Gel de agarosa 0.8 % con DNA de cinco plantas transgénicas de crisantemos digeridos con *EcoRI*, b) transferencia y c) detección en membrana de nylon.

La detección resultó negativa, aun con las variantes implementadas (concentración de DNA y cantidad de enzima), probablemente debido a que en las muestras experimentales, la secuencia blanco es millones de veces inferior respecto al resto del genoma y ésta representa un porcentaje extremadamente bajo que no fue posible detectar con este método. El control positivo fue detectado a una concentración de 200 ng. Esta secuencia tenía mayor posibilidad de ser detectada ya que proviene del producto de PCR del gen *npII* y representa el 100 % de información blanco para la sonda.

Técnica ISSR

En los materiales de crisantemo los 10 iniciadores evaluados generaron un total de 131 bandas de las cuales el 78 fueron polimórficas (59.5 %). El número de bandas polimórficas fluctuó entre 1 (UBC 815) y 28 (UBC 872). El porcentaje de polimorfismo de los iniciadores osciló entre 20 % (UBC 815) y 82 % (UBC 872). El valor mayor de PIC (0.35) calculado de acuerdo a la fórmula descrita por Roldán-Ruiz *et al.* (2000), fue obtenido con el iniciador UBC 872, éste iniciador demostró ser el mejor para evaluar la variabilidad existente en los materiales de crisantemo ya que presentó el mayor valor de Resolving power (Rp). En los materiales de maíz los 10 iniciadores evaluados generaron un total de 147 bandas de las cuales 57 fueron polimórficas (38.8 %). El número de bandas polimórficas fluctuó entre 3 (UBC 808) y 12 (UBC 811). El porcentaje de polimorfismo de los iniciadores osciló entre 20 % (UBC 815) y 82 % (UBC 872). El mayor valor de PIC (0.44) calculado de acuerdo a la fórmula descrita por Roldán-Ruiz *et al.* (2000), fue obtenido con el iniciador UBC 15 (Cuadro 6). El iniciador UBC 872 mostró ser el mejor para evaluar la variabilidad de los materiales de maíz ya que presentó el mayor valor de Resolving power (Rp).

Cuadro 6. Características de los iniciadores tipo ISSR utilizados.

Primer	Secuencia	Bandas Total		Bandas Pol		PBP (%)		Rp		PIC		MI	
		C*	M*	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M
807	(AG) ₈ T	12	19	5	6	41.7	31.6	4.3	7.3	0.20	0.26	1.0	1.5
808	(AG) ₈ C	18	15	7	3	38.9	20.0	5.7	4.7	0.21	0.21	1.5	0.6
810	(GA) ₈ T	11	14	7	6	63.6	42.9	6.0	7.3	0.31	0.35	2.2	2.1
811	(GA) ₈ C	19	21	14	12	73.7	57.1	10.3	11.3	0.34	0.36	4.8	4.3
812	(GA) ₈ A	11	11	6	6	54.5	54.5	5.1	6.0	0.27	0.36	1.6	2.2
815	(CT) ₈ G	5	11	1	4	20.0	36.4	1.1	7.3	0.15	0.44	0.1	1.8
819	(GT) ₈ A	6	2	2	0	33.3	0.0	1.1	0.0	0.14	0.00	0.3	0.0
823	(TC) ₈ C	10	9	5	4	50.0	44.4	3.7	4.7	0.23	0.35	1.1	1.4
872	(GATA) ₄	34	33	28	11	82.4	33.3	17.1	20.0	0.35	0.40	9.9	4.4
889	DBD(AC) ₇	5	12	3	5	60.0	41.7	2.0	4.0	0.26	0.22	0.8	1.1
Total		131	147	78	57								

*C: crisantemo; M: maíz

Tanto en crisantemo como en maíz, el iniciador UBC872 de secuencia (GATA)₄ proporcionó la mayor cantidad de bandas totales 34 y 33, respectivamente. Estos resultados concuerdan con lo sugerido por Weising *et al.* (1989) quienes demostraron una alta presencia de la secuencia (GATA)_n en plantas mono y dicotiledóneas. Wolff *et al.* (1995) utilizaron la secuencia (GATA)₄ como sonda en 41 materiales de crisantemo y observaron patrones polimórficos entre 18 cultivares; sin embargo, observaron pocas diferencias entre accesiones dentro de cultivar. Resultados similares se observaron en nuestra investigación ya que se registró la mayor cantidad de bandas polimórficas al comparar los perfiles de DNA de los dos cultivares de crisantemo. Algunos estudios sugieren que los polimorfismos en las repeticiones GATA podrían ser el resultado de la introgresión (Vosman *et al.*, 1992).

El análisis de conglomerados generó dos grupos cada uno de ellos estructurado de acuerdo a las especies analizadas (Fig. 13). Dichos grupos se separan a un coeficiente de similitud de 0.15 lo que de acuerdo con Weising *et al.* (2005), confirma la existencia de secuencias tipo microsatélite en común a pesar de tratarse de especies de distinta familia. El primer grupo integrado por los materiales de crisantemo se divide en dos subgrupos correspondientes a las variedades Harman e Indianapolis compuestos por cuatro y tres genotipos, respectivamente. Dentro de cada subgrupo los genotipos (eventos) se separan a distinto coeficiente de similitud. Los genotipos HarRd8 y HarRd10 se encuentran más relacionados entre sí y con respecto al genotipo no transgénico. El genotipo HarRd18 fue el más distanciado con respecto al genotipo no transformado lo que sugiere que estos materiales presentan menor similitud de secuencias tipo ISSR probablemente debido a la inserción del transgen.

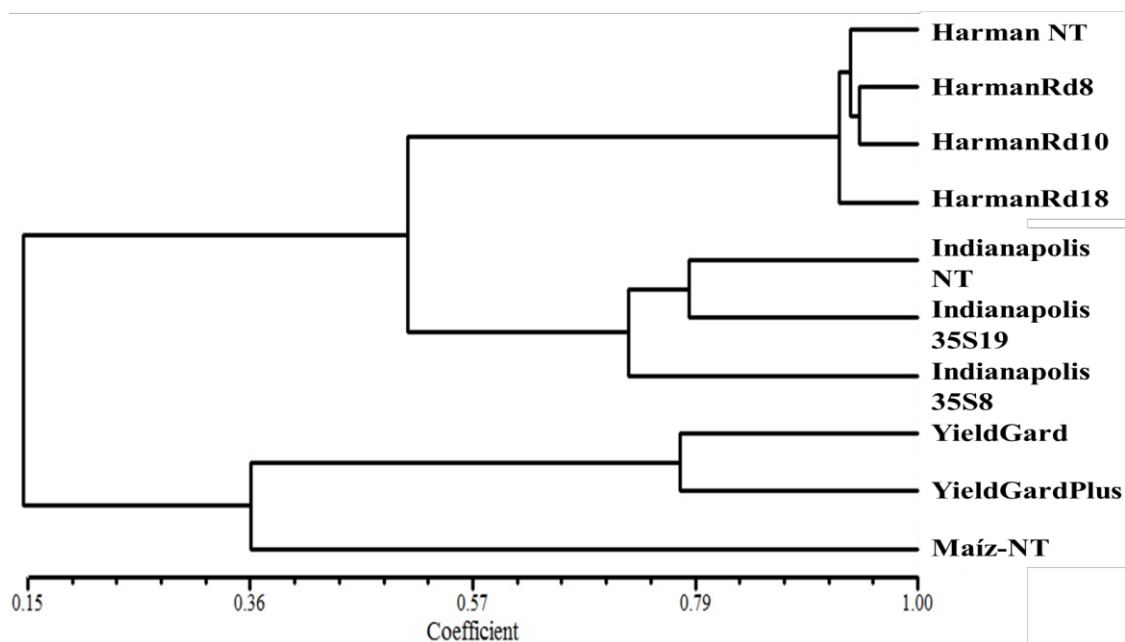


Figura 13. Dendrograma generado con datos de 10 iniciadores tipo ISSR.

Los eventos de maíz YielGard y YieldGardPlus se separaron del genotipo no transformado y permanecieron agrupados hasta un coeficiente de similitud de 0.8, esto sugiere mayor similitud de secuencias tipo ISSR debido a que ambos eventos comparten información genética de un progenitor MON810 (<http://en.biosafetyscanner.org>).

Los iniciadores UBC872 y UBC811 presentaron perfiles informativos y claros, por lo que su utilidad para estimar la variabilidad inter e intraespecífica en los materiales de crisantemo fue exitosa, resultados similares utilizando ISSR, RAPD y RFLP han sido obtenidos por Wolff & Peters-Van, (1993); Wolff *et al.* (1995); Huang *et al.* (2000); Palai y Rout, (2011) y Mukherjee *et al.* (2013).

Para conocer la partición de la variación genética dentro y entre los grupos obtenidos, el análisis molecular de varianza (AMOVA) fue realizado con el software GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). El AMOVA determinó que un 75 % de la variación total se encuentra entre los grupos y el 25 % restante dentro de los grupos (Cuadro 7). Estos resultados apuntan a una constitución genómica diferente entre los dos grupos ($p=0.027$).

Cuadro 7. Análisis molecular de varianza usando marcadores ISSR.

Fuente	df	SS	MS	Est. Var.	Var. (%)	F_{st} value	P value
Entre grupos	1	88.2	88.2	23.4	75	0.75	0.027*
Dentro de grupos	5	38.5	7.7	7.7	25		

df : Grados de libertad; SS: Suma de cuadrados; MS: Cuadrados medios; Est. Var: Variación estimada; Var: Variación; F_{st} value: Índice de fijación.

El análisis de coordenadas principales (PCoA) muestra una agrupación de los genotipos similar al obtenido con el análisis de conglomerados (UPGMA), los genotipos transgénicos de maíz se encuentran distribuidos en un cuadrante distante del genotipo no transgénico. Los genotipos de la variedad de crisantemo Harman están agrupados en el cuadrante opuesto a los genotipos de la variedad Indianapolis (Fig. 14). La primer y segunda coordenada recogieron un 77.6 y 15.4 % de la variación total de los datos. El porcentaje acumulado con estas dos coordenadas fue de 93.08 %.

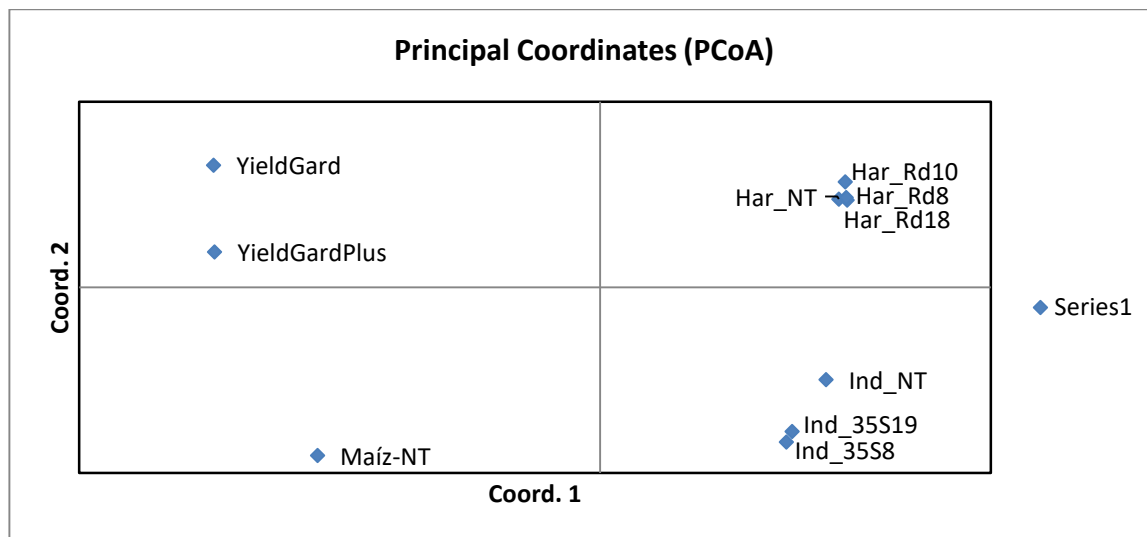


Figura 14. Análisis de componentes principales generado con datos de 10 iniciadores tipo ISSR.

CONCLUSIONES

El método SDS funcionó para obtener DNA de calidad y en cantidad necesaria para las evaluaciones.

Existió congruencia entre la información genética incorporada y la detección de los elementos genéticos *nptII* y *Tnos* en los genotipos de crisantemo de la variedad Harman; sin embargo, con los iniciadores del promotor 35S empleados en esta investigación no se logró obtener amplificación en los genotipos de la variedad Indianapolis. Los elementos genéticos 35S y *Tnos* fueron detectados en maíz

La determinación de similitudes generó 3 grupos: el primero integrado por los genotipos no transformados con potencial para ser utilizados como controles negativos ya que carecen de los elementos genéticos evaluados, el segundo; compuesto por las muestras de crisantemo transformadas que presentaron los elementos genéticos *nptII* y *Tnos*, el tercer grupo correspondiente a los eventos de maíz que contenían las secuencias 35S y *Tnos*.

La técnica Southern blot con hibridación no radioactiva no fue de utilidad en éste tipo de materiales transgénicos, debido a que sólo fue capaz de detectar el control positivo.

Hasta ahora no se había reportado la diferenciación de eventos transgénicos de crisantemo con iniciadores tipo ISSR sin embargo, en esta investigación se logró diferenciar a todos los genotipos con éste tipo de marcadores. Los iniciadores más informativos que permitieron cumplir el objetivo fueron UBC 872 y UBC811.

Con la técnica de combinación de iniciadores no se obtuvieron fragmentos distinguibles, reproducibles o con potencial para usarse como marcador molecular de la inserción del transgen en ninguno de los materiales de crisantemo. Sin embargo, se recomienda realizar evaluaciones con otros iniciadores tipo ISSR.

LITERATURA CITADA

- Ashraf, J., Malik, W., Iqbal, M. Z., Ali Khan, A., Qayyum, A., Noor, E., ... & Ahmad, M. Q. (2016). Comparative analysis of genetic diversity among Bt cotton genotypes using EST-SSR ISSR and morphological markers. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18(2), 517–531.
- Biosafetyscanner (Consultado en febrero de 2017). <http://en.biosafetyscanner.org/schedaevento.php?evento=54>
- Chandrashekar, R., Prasad, B., Vankudothu, N., Chaitanya, J., Bhavani, L., Reddy, R., & Rao K. (2015). A comparative genetic diversity study among elite Bt and Non-Bt cotton varieties of Andhra Pradesh by RAPD markers. *Discovery Biotechnology*, 6(16), 30–37.
- Cuellar, R. (2015). Plantas transgénicas de crisantemo que acumulan trehalosa muestran tolerancia a estrés biótico y abiótico. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México. 109 p.
- Da Silva, J. A. T. (2003). Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotechnology advances*, 21(8), 715–766.
- Fang, D. Q., Roose, M. L., Krueger, R. R., & Federici, C. T. (1997). Fingerprinting trifoliate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 95(1), 211–219.
- Fiebich, D., & Henning, F. (1992). Use of isoenzyme analysis in breeding of Chrysanthemum. *Gartenbauwissenschaft*, 57, 212–218.
- Gautam-Murty, S., Patel, F., Punwar, B. S., Patel, M., Singh, A. S., & Fougat, R. S. (2013). Comparison of RAPD, ISSR, and DAMD markers for genetic diversity assessment between accessions of *Jatropha curcas* L. and its related species. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15(5), 1007–1022.
- Huang, S., Tsai, C., & Sheu, C. (2000). Genetic analysis of Chrysanthemum hybrids based on RAPD molecular markers. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 41, 257–262.
- Kayis, S. A., Hakki, E. E., & Pinarkara, E. (2010). Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey. *African Journal of Agricultural Research*, 5, 2925–2933.
- Lema-Rumińska, J., Zalewska, M., & Sadoch, Z. (2004). Radiomutants of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) of the Lady group: RAPD analysis of the genetic diversity. *Plant Breeding*, 123(3), 290–293.

- Miñano, H. S., González-Benito, M. E., & Martín, C. (2009). Molecular characterization and analysis of somaclonal variation in chrysanthemum cultivars using RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 122(2), 238–243.
- Mukherjee, A., Dey, A., Acharya, L., Palai, S., & Panda, P. (2013). Studies on genetic diversity in elite varieties of *Chrysanthemum* using RAPD and ISSR markers. *Indian Journal of Biotechnology*, 12, 161–169.
- Palai, S. K., & Rout, G. R. (2011). Characterization of new variety of Chrysanthemum by using ISSR markers. *Horticultura Brasileira*, 29(4), 613–617.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537–2539.
- Roldán-Ruiz, I., Dendauw, J., Van-Bockstaele, E., Depicker, A., De Loose, M. (2000). AFLP Markers reveal high polymorphic rates in Ryegrasses (*Loium* spp.). *Mol. Breed*, 6, 125–135.
- Rout, G. R., & Mohapatra A. (2006). Use of molecular markers in ornamental plants: A Critical Reappraisal. *European Journal of Horticultural Sciences*, 71, 53–68.
- Roxas, N. J., Tashiro, Y., Miyazaki, S., Takeshita, A., & Oshima, T. (1993). Isozyme analysis in Higo chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 61(4), 919–924.
- Sánchez, A. M. B., Rojas, A. D. V., & Lugo, P. J. G. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en biomedicina*, 3(1), 25–33.
- Shao, Q. S., Guo, Q. S., Deng, Y. M., & Guo, H. P. (2010). A comparative analysis of genetic diversity in medicinal based on morphology, ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(6), 1160–1169.
- SIAP-SAGARPA (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2010). Cierre de la producción agrícola por cultivo. (Consultada en octubre de 2016). <http://www.siap.gob.mx/>
- Staub, J. E., Serquen, F. C., & Gupta, M. (1996). Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience*, 31(5), 729–741.
- Tyagi, P., Gore, M. A., Bowman, D. T., Campbell, B. T., Udall, J. A., & Kuraparthi, V. (2014). Genetic diversity and population structure in the US Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 127(2), 283–295.

- Ullah, I., Iram, A., Iqbal, M. Z., Nawaz, M., Hasni, S. M., & Jamil, S. (2012). Genetic Diversity Analysis of *Bt* Cotton Genotypes in Pakistan Using Simple Sequence Repeat Markers. *Genetics and Molecular Research*, 11(1), 597–605.
- Valadez-Moctezuma, E., Samah, S., & Luna-Paez, A. (2014). Genetic diversity of *Opuntia* spp. varieties assessed by classical marker tools (RAPD and ISSR). *Plant Systematics and Evolution*, 301(2), 737–747.
- Vosman, B., Arens, P., Rus-Kortekaas, W., & Smulders, M. J. (1992). Identification of highly polymorphic DNA regions in tomato. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 85(2), 239–244.
- Weising, K., Weigand, F., Driesel, A., Kahl, G., Zischler, H., Epplen, J. (1989). Polymorphic simple GATA/GACA repeats in plant genomes. *Nucleic Acids Research*, 17(23), 10128–10128.
- Weising, K., Wolff, K., Nybom, H. & Kahl, G. (2005). DNA Fingerprinting in Plants Principles, Methods and Applications (2^a ed., pp. 81-106). Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Wolff, K., & Peters-Van, R., (1993). Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. *Heredity*, 4, 335–41.
- Wolff, K., Rijn, J., & Hofstra, H. (1994). RFLP analysis in chrysanthemum. I. Probe and primer development. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 88(3), 472–478.
- Wolff, K., Zietkiewicz, E., & Hofstra, H. (1995). Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 91(3), 439–447.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176–183.

HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA DIFERENCIACIÓN DE ALGODÓN GENÉTICAMENTE MODIFICADO

MOLECULAR TOOLS FOR DIFFERENTIATION OF COTTON GENETICALLY MODIFIED

R.C. Cid-Contreras¹, A.J. López-Herrera¹, J.O. Mascorro-Gallardo¹, E. Valadez-Moctezuma¹

¹Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco Km 38.5 Chapingo Edo. de México. CP 56230.

RESUMEN

El análisis de muestras a ciegas en laboratorio es parte de las actividades necesarias para establecer y armonizar protocolos de detección, identificación y diferenciación de OGM. En esta investigación se analizó un set de 20 genotipos de algodón, como muestras a ciegas, con la finalidad de establecer un método de análisis para identificar y diferenciar genotipos transformados y no transformados. El método de análisis comenzó con la comparación de dos métodos de extracción de DNA (CTAB y SDS) a partir de tejido foliar, continuó con la identificación de elementos genéticos (35S, *nptII* y *Tnos*) por PCR punto final y terminó con la diferenciación de genotipos con marcadores tipo ISSR. La comparación de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$) determinó al método SDS como el mejor. Se identificaron 15 muestras GM de las cuales, 10 presentaron los tres elementos genéticos evaluados. Se obtuvieron 283 bandas de DNA de las cuales 174 fueron polimórficas (61.5 %). Considerando el porcentaje de bandas polimórficas e índice de marcador, los iniciadores MicroAnch4 [(AGAC)₄GC], MicroAnch6 [AC(GACA)₄] y UBC872 [(GATA)₄] fueron los más informativos ya que diferenciaron a todos los genotipos. Los análisis UPGMA y PCoA generaron dos grupos que fueron corroborados mediante análisis bayesianos. El AMOVA determinó un índice de fijación de 0.154 entre los dos grupos ($p=0.001$) y la partición de la variación fue del 85 % atribuible a los genotipos dentro de los grupos. Nuestro método de análisis permitió identificar, diferenciar y asociar marcadores moleculares a genotipos GM.

Palabras clave: muestras a ciegas, elementos genéticos, ISSR, UBC872.

Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Roberto Carlos Cid Contreras

Director de tesis: Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

ABSTRACT

The analysis of blind samples in the laboratory is part of the activities necessary to establish and harmonize protocols for detection, identification and differentiation of GMOs. In this research, a set of 20 cotton genotypes were analyzed, as blind samples, in order to establish a method of analysis to identify and differentiate transformed and untransformed genotypes. The method of analysis began with the comparison of two DNA extraction methods (CTAB and SDS) from foliar tissue, continued with the identification of genetic elements (35S, *nptII* and *Tnos*) by end-point PCR and ended with the differentiation of genotypes with ISSR type markers. Comparing Tukey's means ($\alpha \leq 0.05$) determined the SDS method as the best. Fifteen GM samples were identified, of which 10 presented the three genetic elements evaluated. 283 DNA bands were obtained, of which 174 were polymorphic (61.5 %). Considering the percentage of polymorphic bands and marker index, the primers MicroAnch4 [(AGAC)₄GC], MicroAnch6 [AC (GACA)₄] and UBC872 [(GATA)₄] were the most informative since they differentiated all genotypes. Two groups were generated by UPGMA and PCoA analysis, they were corroborated by Bayesian analysis. The AMOVA determined a fixation index of 0.154 between the two groups ($p=0.001$) and the partitioning of the variation was 85 % attributable to the genotypes within the groups. Our method of analysis allowed to identify, differentiate and associate molecular markers with GM genotypes.

Keywords: Blind samples, genetic elements, ISSR, UBC872.

INTRODUCCIÓN

El análisis en laboratorio para detectar e identificar la presencia de organismos genéticamente modificados (OGM), es una de las herramientas necesarias para fortalecer las capacidades nacionales que respaldan el marco regulatorio en Bioseguridad de México. Los laboratorios de detección y análisis de OGM emplean técnicas de métodos bioquímicos, inmunológicos y moleculares que permiten tener certeza sobre el tipo de modificación genética que pudiera estar presente en el material de estudio (Pérez *et al.*, 2013).

Dentro de los métodos moleculares, el denominado “método de cribado”, basado en la detección específica de las secuencias reguladoras más comunes, el promotor 35S y el terminador *nos*, permite determinar bajo un esquema cualitativo, las muestras de un set o un lote que fueron genéticamente transformadas (Querci *et al.*, 2007). También se puede analizar la presencia de genes utilizados como marcadores por su capacidad de conferir resistencia a antibióticos, el más utilizado es el gen de la neomycin phosphotransferase II (*nptII*) que confiere resistencia a kanamicina (Roa-Rodríguez & Nottenburg, 2002; Van Den Bulcke *et al.*, 2010).

En muestras a ciegas la detección de estas tres secuencias permite identificar aquellas que son transgénicas sin embargo, no permite diferenciar entre muestras de eventos simples o apilados en el mismo o distinto fondo genético. Una alternativa viable para este caso es el análisis de variabilidad existente en el fondo genético mediante marcadores moleculares. La aplicación de ésta técnica en algodón GM ha logrado establecer similitudes y relaciones genéticas, estructuras de población y diferencias entre eventos (Ullah *et al.*, 2012; Tyagi *et al.*, 2014; Chandrashekar *et al.*, 2015). Por lo anterior, en este trabajo se analizó un set de muestras de algodón con la finalidad de identificar mediante PCR el tipo de elementos genéticos presentes y diferenciar todos los genotipos mediante perfiles de DNA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se analizaron como muestras a ciegas 20 genotipos de algodón proporcionados por el SENASICA, un genotipo no transformado considerado como control negativo y el plásmido pBI121 fue incluido y utilizado como control positivo. La cantidad de genotipos utilizados es igual al promedio de eventos transgénicos de algodón sembrados en México del 2000 al 2005 (CIBIOGEM, 2017).

Cuadro 8. Descripción de los genotipos empleados en la investigación.

No.	CÓDIGO	ESPECIE	PROCEDENCIA
1	FM9250GL	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
2	DP1321B2RF	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
3	DP0147RF	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
4	FM9180B2F	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
5	FM1740B2F	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
6	FM1880B2F	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
7	FM2484B2F	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
8	FM9160B2F	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
9	FM9170B2F	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
10	DP0104B2RF	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
11	DP1032B2RF	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
12	ST4498B2F	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
13	DP0924B2RF	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
14	DP0920B2RF	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
15	DP1219B2RF	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
16	DP0912B2RF	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
17	DP1212B2RF	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
18	FM989	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
19	DP0935B2RF	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
20	ST5458B2F	<i>Gossypium</i> sp.	SENASICA
21	Cotton NT*	<i>Gossypium hirsutum</i>	SENASICA
22	pBI-121	---	UACH

*control negativo conocido (No Transgénico)

Extracción de DNA

A partir de tejido vegetal de cada uno de los materiales de algodón (3 g/planta) se evaluaron dos métodos de extracción de DNA: CTAB y SDS con ligeras modificaciones (Apendice I). Los productos de extracción se analizaron cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8 %, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y cuantitativamente mediante espectrofotometría en un Nanodrop (ND-1000). Los datos obtenidos de las variables cantidad y calidad de DNA se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$) en el programa SAS 9.0.

Dilución del DNA

Se ajustó la concentración de las muestras a 20 ng/µL en un volumen final de 100 µL, para lo cual se utilizó la siguiente formula:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

Donde:

C_i = concentración inicial

V_i = volumen inicial

C_f = concentración final

V_f = volumen final

Detección de elementos genéticos

Se trabajó en la detección de los elementos genéticos: 35S, nptII y Tnos debido a que éstos son necesarios para la expresión de genes de interés y están presentes en la mayoría de plantas GM (Hemmer, 1997; López *et al.*, 2003; Díaz & Galindo, 2014). Para cada elemento genético se realizaron tres reacciones independientes, la mezcla para PCR contenía 200 µM dNTPs, 1X Taq buffer, 3 mM MgCl₂, 20 pmol de cada iniciador (Cuadro 9), 1 U Taq DNA polimerasa (Promega) y 100 ng de DNA genómico. Las reacciones se llevaron a un volumen final de 25 µL con agua HPLC. Como blanco se utilizó una mezcla con todos los componentes exceptuando el DNA genómico. La PCR se realizó en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems (USA) con la

siguiente programación: 1 ciclo de Pre-desnaturalización a 94 °C durante 5 min, 35 ciclos (94 °C, 60 s; 62 °C, 45 s; 72 °C, 60 s) y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de acrilamida 8 % y tinción con nitrato de plata.

Con los resultados de las tres amplificaciones independientes para cada elemento genético se realizó la determinación empírica de la efectividad de su detección, se calculó el porcentaje de falsos positivos y negativos y se codificó la matriz binaria: banda presente 1, ausente 0, considerando la presencia del elemento genético en una muestra al observar al menos dos resultados positivos de los tres ensayos de detección de cada elemento. Se aplicó un análisis de conglomerados UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) usando el coeficiente de Simple Matching (SM) para agrupar a las muestras conforme a su similitud.

Cuadro 9. Características de los iniciadores utilizados en la investigación.

Nombre	Secuencia del iniciador	T _m ¹ (°C)	Amplicón (pb)	Fuente
35S	F: 5'-GCT CCT ACA AAT GCC ATC AGA TAG T-3' R: 5'-GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA-3'	61	195	Díaz y Galindo (2014)
<i>npII</i>	F: 5'-TGA TTG AAC AAG ATG GAT TGC-3' R: 5'-GAA CTC GTC AAG AAG GCG ATA-3'	60	780	Ghanem, (2011)
<i>Tnos</i>	F: 5'-GAA TCC TGT TGC CGG TCT TGC G-3' R: 5'-GCG GGA CTC TAA TCA TAA AAA CCC-3'	60	130	Díaz y Galindo (2014)

¹ temperatura de alineamiento utilizada

Digestión enzimática del DNA y técnica Southern blot

Los siguientes componentes fueron incluidos en una reacción de digestión enzimática para cortar el DNA genómico: 20 µg de DNA, 10 µL de 10× H buffer, 1 µL de BSA (10 mg/mL), 8 µL de la enzima *EcoRI* (8-20 U/µL) y agua HPLC hasta alcanzar un volumen final de 100 µL. Se homogenizó cada una de las mezclas con un pulso en vortex y centrifuga. Las reacciones fueron incubadas a 37 °C durante toda la noche y al día siguiente se procedió a visualizar la digestión mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa 0.8 %. El producto de PCR

obtenido con los iniciadores del gen *nptII* fue utilizado como sonda para la detección del transgen en la técnica Southern blot. El marcaje de la sonda, hibridación y detección fue realizado de acuerdo a las instrucciones del DNA-LAB/DET-KIT, NONRADIOACTIVE (Roche, Mannheim, Germany). Los procedimientos se repitieron hasta siete veces modificando las concentraciones de DNA, cantidad de enzima de restricción y tiempos de incubación con los respectivos anticuerpos.

Técnica ISSR

Se evaluaron 25 iniciadores tipo ISSR (set #9 University of British Columbia) de los cuales 16 amplificaron las muestras de algodón. La mezcla para PCR contenía 200 μ M dNTPs, 1X Taq buffer, 3 mM MgCl₂, 20 pmol primer, 1 U Taq DNA polimerasa (Promega) y 100 ng de DNA genómico. Las reacciones se llevaron a un volumen final de 25 μ L con agua HPLC. Se utilizó un termociclador GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems (USA) con la siguiente programación: 1 ciclo de Pre-desnaturalización a 94 °C por 5 min, 35 ciclos (94 °C, 60 s; T_m del primer, 45 s; 72 °C, 3 min) y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de acrilamida 8 % y tinción con nitrato de plata. Los perfiles de bandeo se codificaron en una matriz binaria: banda presente (1), ausente (0). La eficiencia de los iniciadores utilizados se determinó mediante el cálculo del contenido de información polimórfica (PIC), Resolving power (Rp) y Marker Index (MI) de acuerdo con Valadez-Moctezuma, *et al.*, (2014). El programa NTSYSpc 2.2 fue utilizado para obtener la matriz de similitud y el análisis de conglomerados UPGMA (Rohlf, 2002) usando el Coeficiente Simple Matching (SM) por considerar las dobles ausencias como un factor de similitud (Lamboy, 1994). El análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la matriz de similitud genética fue realizado en el paquete estadístico GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse 2012). La inferencia de la estructura genética de las 20 accesiones del set fue obtenida mediante el análisis Bayesiano en el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000); además los resultados sirvieron para identificar individuos

mezclados y contrastar los resultados de las pruebas estadísticas mencionadas anteriormente.

Combinación de iniciadores tipo ISSR y del gen *nptII*

Un nuevo método para identificar el posicionamiento del T-DNA en el fondo genético de los materiales transgénicos fue diseñado tomando como fundamento la técnica TAIL-PCR pero con la única diferencia de que en éste método no se usaron iniciadores anidados y el programa del termociclador no fue ejecutado bajo los gradientes de la temperatura de alineamiento predeterminados en dicha técnica (Clarke, 2003). El método consistió en realizar reacciones independientes con el iniciador UBC889, iniciadores forward y reverse del gen *nptII* y la combinación de estos iniciadores (UBC889 + forward del gen *nptII* y UBC889 + reverse del gen *nptII*). Las amplificaciones con el iniciador UBC889 así como con los iniciadores F y R del gen *nptII* sirvieron para discriminar, a través de la diferencia de pesos moleculares, los fragmentos que fueran iguales respecto a los nuevos fragmentos obtenidos por la combinación de los iniciadores indicados, es decir, los fragmentos de interés en el presente estudio fueron aquellos que contuvieron la información del elemento transgénico (*nptII*) bordeado por el ISSR. La mezcla para PCR contenía 200 µM dNTPs, 1X Taq buffer, 3 mM MgCl₂, 10 pmol primer, 1 U Taq DNA polimerasa (Promega) y 100 ng de DNA genómico. Las reacciones se llevaron a un volumen final de 25 µL con agua HPLC. Se utilizó un termociclador GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems (USA) con la siguiente programación: 1 ciclo de Pre-desnaturalización a 94 °C por 5 min, 35 ciclos (94 °C, 60 s; T_m del par de iniciadores correspondiente, 45 s; 72 °C, 3 min) y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de acrilamida 8 % y tinción con nitrato de plata. Los perfiles se analizaron visualmente para identificar bandas diferentes con potencial de marcador.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de DNA

En el análisis cualitativo se observaron bandas con mayor intensidad en los productos de extracción del método SDS y menor en los productos del método CTAB (Fig. 15), esta condición puede atribuirse a que durante el proceso del método CTAB los lavados con cloroformo disminuyen la concentración de los ácidos nucleicos (Weising *et al.*, 2005). Para este trabajo, la cantidad de DNA obtenido era importante ya que en la técnica Southern blot se requirió una cantidad considerable de DNA por genotipo de algodón.

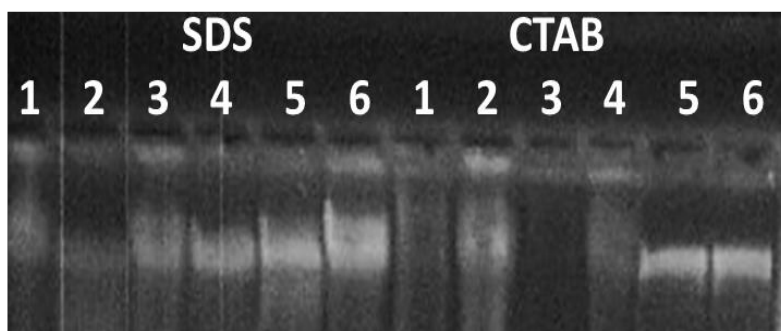


Figura 15. Gel de calidad de extracción de DNA y comparación de los productos obtenidos con dos métodos SDS y CTAB en seis accesiones de algodón.

La cuantificación de DNA fluctuó entre 7.5 y 365 ng/ μ L con el método CTAB y entre 1177 y 5245 ng/ μ L con el método SDS. El análisis de varianza indicó que hubo diferencia significativa entre métodos para la variable cantidad, la comparación de medias demostró que estadísticamente el mejor tratamiento para la obtención de DNA es el método SDS bajo nuestras condiciones (Cuadro 10). Por lo anterior, este método fue utilizado en lo sucesivo.

Cuadro 10. Cuadrados medios para las variables cantidad y calidad y comparación de medias de los métodos de extracción de DNA.

Fuente de variación	G.L.	Cantidad ng/μL	Calidad (260/280)
Método	1	77595314.5 *	0.043 ^{NS}
Error	40	693485.0	0.013
C.V.		56.0	6.22
Media		1485.6	1.88
Comparación de medias			
SDS		2844.9 a	1.91 a ^z
CTAB		126.5 b	1.85 a

^{NS}, *: no significativo y significativo a una $p \leq 0.05$, respectivamente.

^z Valores con la misma letra en cada columna no difieren estadísticamente Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

Detección de elementos genéticos

Se obtuvieron amplicones de 160, 780 y 190 pb en el 43.7, 65.6 y 65 % de las muestras del set y corresponden a los elementos genéticos 35S, *npII*, y *Tnos*, respectivamente (Fig. 16). Estas cifras pueden hacer referencia a que no todas las muestras del set son transgénicas y/o a que no todos comparten los mismos elementos genéticos. Los pesos moleculares obtenidos para el promotor 35S y el *Tnos* son parecidos a los reportados por Díaz y Galindo (2014); la diferencia puede deberse a que en el presente estudio se trabajó en geles de acrilamida mientras que los autores mencionados trabajaron en geles de agarosa y los niveles de sensibilidad y nivel de precisión son diferentes para ambos casos (Morillo *et al.*, 2009). El producto de amplificación de gen *npII* concuerda con el reportado por distintos autores (Valle-Sandoval, 2008; Ghanem, 2011). En todas las evaluaciones de PCR realizadas no se obtuvieron bandas de DNA para la reacción “blanco” debido a que en ésta reacción no se incluyó DNA.

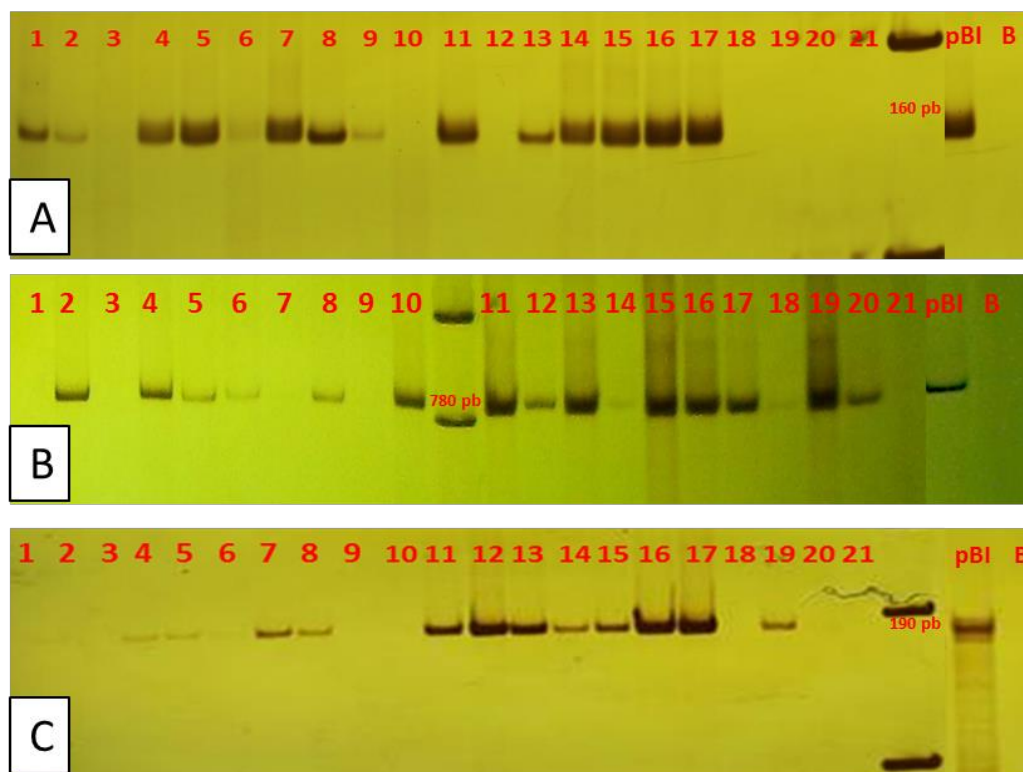


Figura 16. Detección de: (A) secuencia promotora 35S con 160 pb aproximadamente, (B) gen *nptII* con 780 pb, (C) secuencia *Tnos* con 190 pb. Carriles: 1 a 21 muestras de algodón, pBI: plásmido pBI121 y B: blanco.

Con la determinación empírica se detectaron las muestras que generaron falsos positivos (1, 9, 10, 18 y 21) posiblemente debido a contaminación de la reacción, a alineamientos inespecíficos de los iniciadores por degradación del DNA y/o a errores de manipulación. El porcentaje de falsos negativos en la detección del promotor 35S y gen *nptII* fue de 6.06 y 4.54 %, respectivamente; mientras que el porcentaje de falsos positivos fue de 4.54 % en ambos casos. Un falso negativo y ningún falso positivo fueron observados en la detección del elemento *Tnos* por lo que en éste caso la especificidad fue del 100 % (Cuadro 11). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos por Lipp *et al.* (1999) quienes basándose en el análisis del promotor 35S y *Tnos* en 96 muestras determinaron porcentajes de especificidad de 97.9 y 100 %, respectivamente.

Cuadro 11. Determinación empírica de la efectividad de la detección.

Muestra	35S			<i>npII</i>			<i>Tnos</i>			Frecuencia detectada
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1 de 9
2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	5 de 9
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 de 9
4	+	+	-	+	+	+	+	+	+	8 de 9
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9 de 9
6	+	-	-	+	+	-	+	-	+	5 de 9
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9 de 9
8	+	-	+	+	+	+	+	+	+	8 de 9
9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1 de 9
10	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1 de 9
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9 de 9
12	-	-	-	+	+	+	+	+	+	6 de 9
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9 de 9
14	+	+	+	+	+	-	+	+	+	8 de 9
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9 de 9
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9 de 9
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9 de 9
18	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1 de 9
19	-	-	-	+	+	+	+	+	+	6 de 9
20	-	-	-	+	-	+	-	-	-	2 de 9
21	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1 de 9
pBI121	-	+	+	+	+	+	+	+	+	8 de 9
Blanco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 de 9
Falsos positivos (%)	4.54			4.54			—			
Falsos negativos (%)	6.06			4.54			1.51			

1,2 y 3: Repeticiones de la reacción con DNA producto de una sola extracción de cada muestra.

Estos resultados sirvieron como base para elegir la secuencia del gen *npII* y utilizarla como sonda durante la técnica Southern blot ya que su longitud de 780 pb fue la mayor y estuvo presente en 15 de los 20 genotipos evaluados.

El análisis de conglomerados generó 2 grupos (Fig. 17), el primero contuvo a las muestras transgénicas y el segundo a las no transgénicas. Dentro del primer grupo las muestras 4, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16 y 17 presentaron los tres elementos genéticos; las muestras 6, 12 y 19 únicamente presentaron los elementos *npII* y *Tnos*. Lo anterior indica que las muestras que integran cada subgrupo son similares porque presentaron los mismos elementos genéticos.

La muestra 2 se ubicó en el primer grupo porque presentó los elementos 35S y *nptII*; mientras que la muestra 20 se ubicó cerca al segundo grupo porque únicamente presentó el elemento *nptII*. En total 15 muestras fueron identificadas como transgénicas lo que representa el 75 % del set.

Las muestras 1, 3, 9, 10 y 18 no presentaron ninguno de los tres elementos genéticos. Esto sugiere que el 25 % de las muestras del set no son transgénicas. Las similitudes entre muestras pueden atribuirse a que se trata de un mismo genotipo repetido en el set por lo que fue necesario diferenciar las muestras con marcadores ISSR

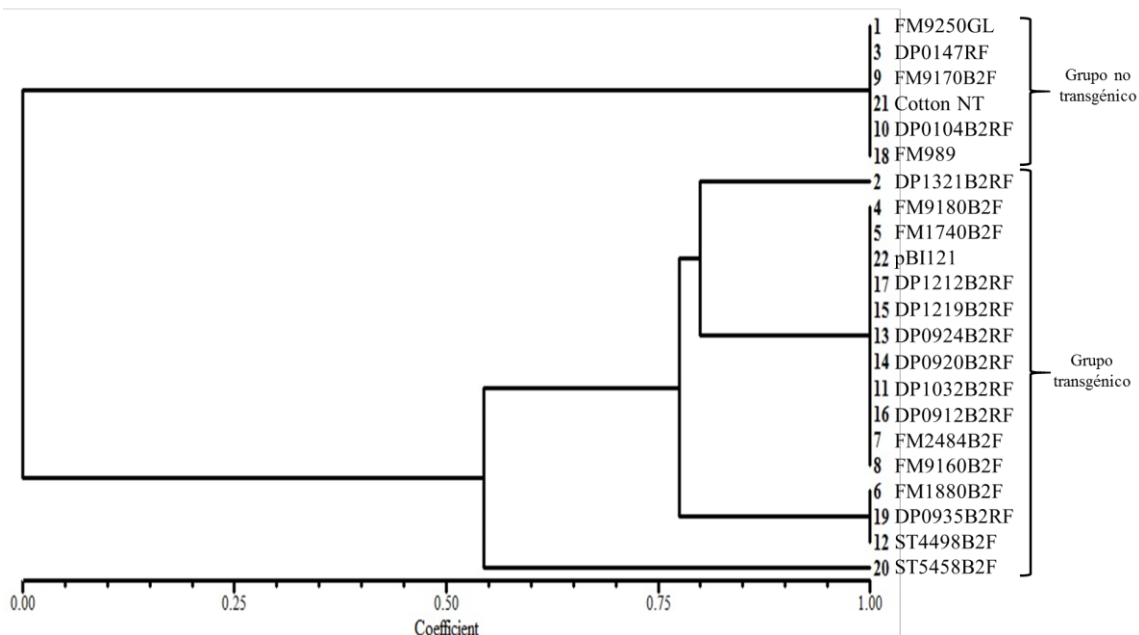


Figura 17. Dendrograma de las accesiones en estudio generado por el análisis de tres elementos genéticos en 21 genotipos de algodón transgénico y no transgénico. El grupo A está integrado por los genotipos con secuencias transgénicas y el grupo B está integrado por los genotipos sin secuencias transgénicas.

La separación de los grupos A y B reiteró que no todas las muestras de algodón del set eran transgénicas. La estructuración de los subgrupos del grupo A sugiere que las muestras son diferentes a nivel intergrupar debido a que portan diferentes elementos genéticos; pero iguales a nivel intragrupal, esto último se puede atribuir a que presentan los mismos elementos genéticos o que se trata de un mismo genotipo repetido en el set, de aquí la importancia de diferenciar las muestras con la técnica ISSR.

Digestión enzimática del DNA y técnica Southern blot

Los productos de digestión separados en agarosa 0.8 % mostraron un barrido congruente con las concentraciones de DNA utilizadas (50, 25 y 10 µg), (Fig. 18). Después de la transferencia a la membrana de nylon se comprobó que prácticamente el total del barrido había sido transferido, (Fig. 18 B). La hibridación y detección realizada con la sonda *nptII* marcada con digoxigenina durante los siete experimentos realizados, siempre resultó negativa a excepción del DNA control (gen *nptII* obtenido vía PCR) (Fig. 18 C).

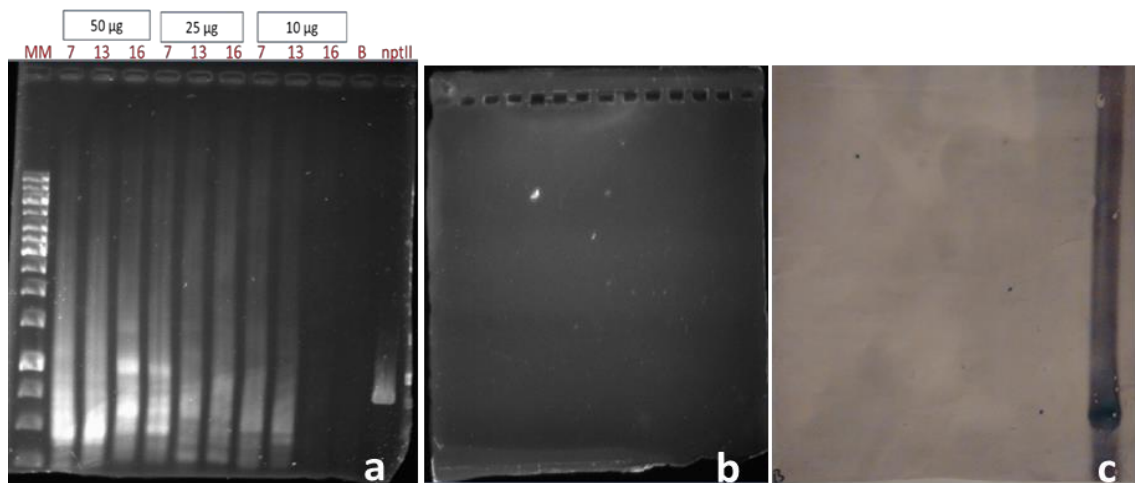


Figura 18. a) Electroforesis en gel de agarosa 0.8 % con DNA de tres muestras de algodón a diferente concentración digeridas con *EcoRI*, b) transferencia y c) detección en membrana de nylon.

La detección resultó negativa, aun con las variantes implementadas (concentración de DNA y cantidad de enzima), probablemente debido a que en las muestras experimentales, la secuencia blanco es millones de veces inferior respecto al resto del genoma y ésta representa un porcentaje extremadamente bajo que no fue posible detectar con este método. El control positivo siempre fue detectado en todos los experimentos, aun cuando la cantidad de DNA mínima colocada fue de 200 ng y como máximo 3000 ng. Esta secuencia tenía mayor posibilidad de ser detectada en todos los casos, ya que proviene del producto de PCR del gen *nptII* y representa el 100 % de información blanco para la sonda.

Técnica ISSR

Los 16 iniciadores evaluados generaron un total de 283 bandas de las cuales 174 fueron polimórficas (61.4 %). El porcentaje de bandas polimórficas fue mayor a los obtenidos por Dongre *et al.* (2004) y Noormohammadi *et al.* (2011), quienes obtuvieron porcentajes de bandas polimórficas de 54 y 54.34 %, respectivamente. El número de bandas polimórficas fluctuó entre 1 (Micro Anch2 y UBC 890) y 48 (UBC 872). El porcentaje de polimorfismo de los iniciadores osciló entre 6.6 % (UBC 890) y 100 % (UBC 872). El mayor valor de PIC (0.4221) calculado de acuerdo a la formula descrita por Roldán-Ruiz *et al.* (2000), fue obtenido con los iniciadores UBC 872 y Micro Anch6. Valores similares del PIC han sido reportados por Ashraf *et al.* (2016). El iniciador UBC 872 fue el mejor para evaluar la diversidad genética en estos materiales ya que presentó el mayor valor de poder de resolución (Cuadro 12).

Cuadro 12. Características de los iniciadores utilizados.

Iniciador	Secuencia	Tm ¹ (° C)	Bandas Totales	Bandas Polimórficas	PBP (%)	Rp	PIC	MI
Microsat 2	(GACA) ₄	48	9	3	33.33	2.0000	0.1733	0.5200
MicroAnch2	VDV(CT) ₇	68	11	1	9.09	0.0952	0.0082	0.0082
MicroAnch4	(AGAC) ₄ GC	56	30	30	100	13.8095	0.3196	9.5873
MicroAnch6	AC(GACA) ₄	54	30	30	100	19.7143	0.4221	12.6621
INI2	(GA) ₈ YC	54	14	7	50	2.4762	0.1257	0.8798
UBC 810	(GA) ₈ T	50	15	4	26.67	1.9048	0.0974	0.3894
UBC 811	(GA) ₈ C	52	22	17	77.27	10.1905	0.3236	5.5020
UBC 812	(GA) ₈ A	50	10	7	70	2.8571	0.2150	1.5048
UBC 814	(CT) ₈ A	50	20	10	50	8.4762	0.2880	2.8798
UBC 834	(AG) ₈ YT	52	11	5	45.45	4.1905	0.2523	1.2616
UBC 842	(GA) ₈ YG	54	13	3	23.08	2.3810	0.1486	0.4458
UBC 872	(GATA) ₄	42	48	48	100	32.7619	0.4221	20.2630
UBC 879	(CTTCA) ₃	42	12	4	33.33	3.5238	0.2056	0.8224
UBC 889	DBD(AC) ₇	68	15	2	13.33	0.6667	0.0399	0.0798
UBC 890	VHV(GT) ₇	68	15	1	6.67	0.9524	0.0562	0.0562
IS-16	B(ACA) ₅	50	8	2	25	2.8571	0.2812	0.5624
Total			283	174				

¹ temperatura de alineamiento; PBP: Porcentaje de Bandas Polimórficas; Rp: Poder de Resolución; PIC: Contenido de Información Polimórfica; MI: Índice de Marcador

El análisis de conglomerados generó una distribución de las muestras diferente a la obtenida en la detección de elementos genéticos. El dendrograma fue truncado en el valor de similitud de 0.715 dividiendo las 20 muestras del set en dos grupos y dejando a la muestra 21 como un genotipo independiente (Fig. 19). El primer grupo contiene a las muestras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 y 10 y el segundo grupo las muestras 7, 11, 12, 13, 18, 15, 16, 17, 19, 14 y 20. El mayor valor de similitud (0.84) se obtuvo entre los genotipos 16 y 17, mientras que el menor (0.58) entre los genotipos 1 y 21. Estos resultados sugieren que los elementos que componen éste set de algodón pertenecen a distintos genotipos.

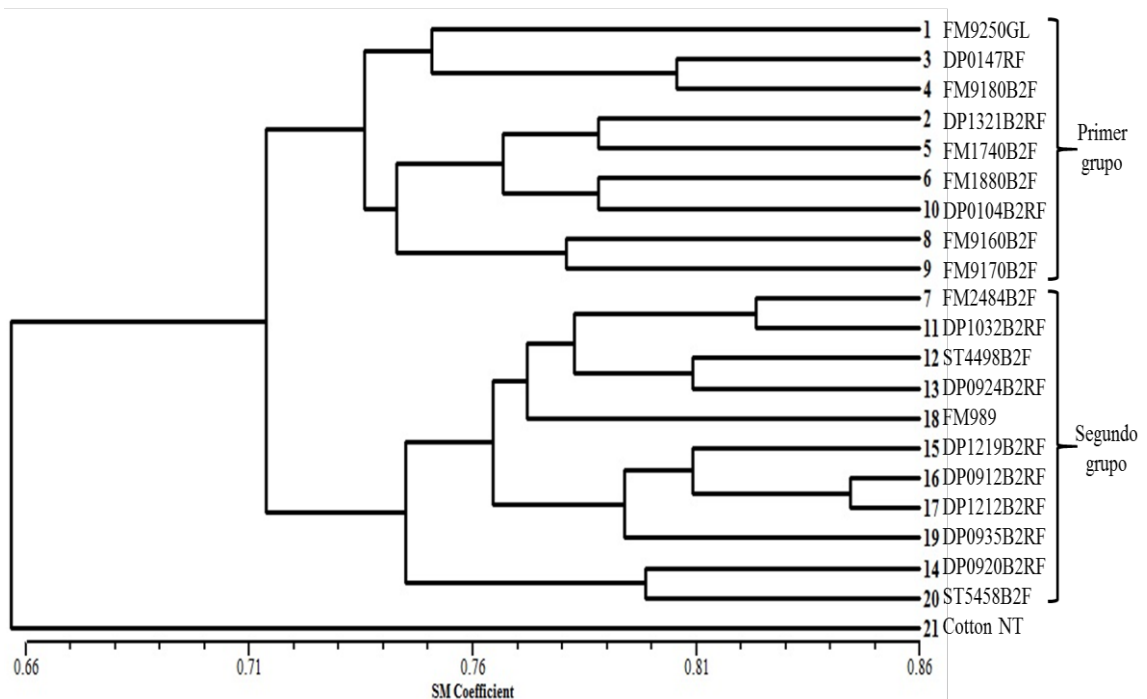


Figura 19. Dendrograma obtenido de datos de 16 iniciadores tipo ISSR en 21 materiales de algodón modificado y no modificado genéticamente

Para conocer la partición de la variación genética dentro y entre los grupos obtenidos se realizó el análisis molecular de varianza (AMOVA) con el software GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). El AMOVA determinó que un 15 % de toda la variabilidad genética está asociada a diferenciación entre poblaciones, mientras que el 85 % se atribuye a variación dentro de los grupos. Estos resultados apuntan a una constitución genómica muy similar o estrecha entre los dos grupos con valores análogos de $F_{st} = 0.154$ ($p=0.001$) y la partición de la variación atribuible a los genotipos dentro de los grupos (Cuadro 13). El valor de F_{st} encontrado en éste estudio muestra que existe una diferenciación genética moderada de acuerdo a los parámetros planteados por Wright (1978).

Cuadro 13. Análisis molecular de varianza usando marcadores ISSR.

Fuente	df	SS	MS	Est. Var.	Var. %	F_{st} value	P value
Entre grupos	1	95	95.7	6.2	15	0.154	0.001***
Dentro de grupos	18	615	34.2	34.2	85		

df : Grados de libertad; SS: Suma de cuadrados; MS: Cuadrados medios; Est. Var: Variación estimada; Var: Variación; F_{st} value: Índice de fijación.

El análisis de coordenadas principales (PCoA) generó dos grupos similares a los obtenidos con el análisis UPGMA; sin embargo, en este análisis el genotipo 14 se ubicó en diferente grupo. Observar las mismas estructuras con ambos tipos de análisis suele ser común cuando se analizan datos de marcadores tipo ISSR (Kayis *et al.*, 2010). La primer y segunda coordenada recogieron el 25.68 y el 13.1 % de la variación total, respectivamente. En esta evaluación, los genotipos no transgénicos 1, 3, 9, 10, 18 y 21 quedaron dispersos en la gráfica PCoA (Fig. 20) a diferencia de su comportamiento en la Figura 17, en donde fueron capaces de separarse de los transgénicos. Lo anterior sugiere diferencias genómicas entre los genotipos no transgénicos. El genotipo 21 (genotipo silvestre) quedó separado de ambos grupos debido a que no presenta mucha relación con las variedades cultivadas y/o transgénicas del set de algodón utilizado.

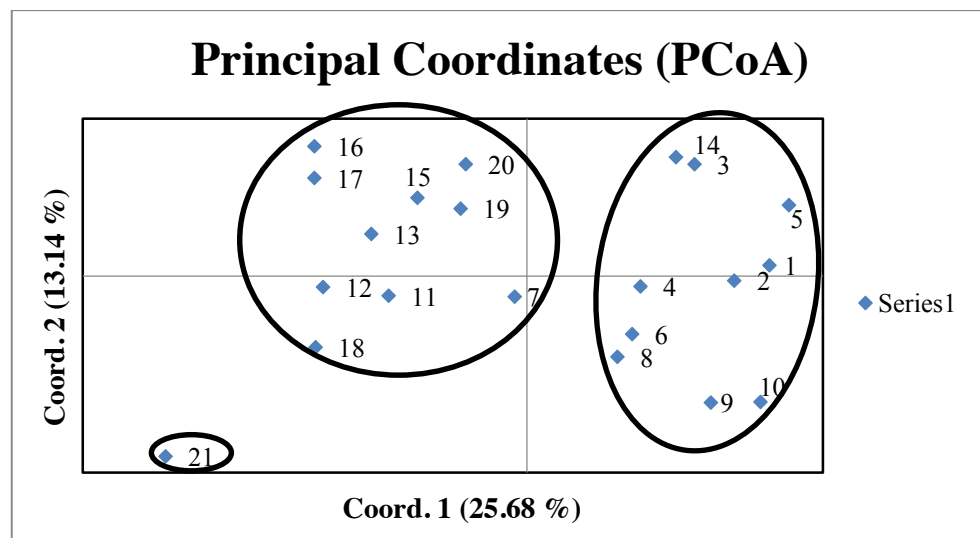


Figura 20. Análisis de coordenadas principales en 21 genotipos de algodón evaluados con 16 iniciadores tipo ISSR.

El análisis en STRUCTURE basado en modelos Bayesianos proporcionó probabilidades estimadas de Ln para K=2 a K=19 que oscilaron desde -4518 a -2396. Ya que el mayor valor de ΔK se obtuvo con K=2, dos grupos pueden ser visualizados en la Figura 21. El número de genotipos en el primer grupo fue de 10, mientras que 11 se integraron en el segundo grupo. La estructura de los genotipos tiene mayor relación con la obtenida en el PCoA que con la obtenida con el UPGMA.

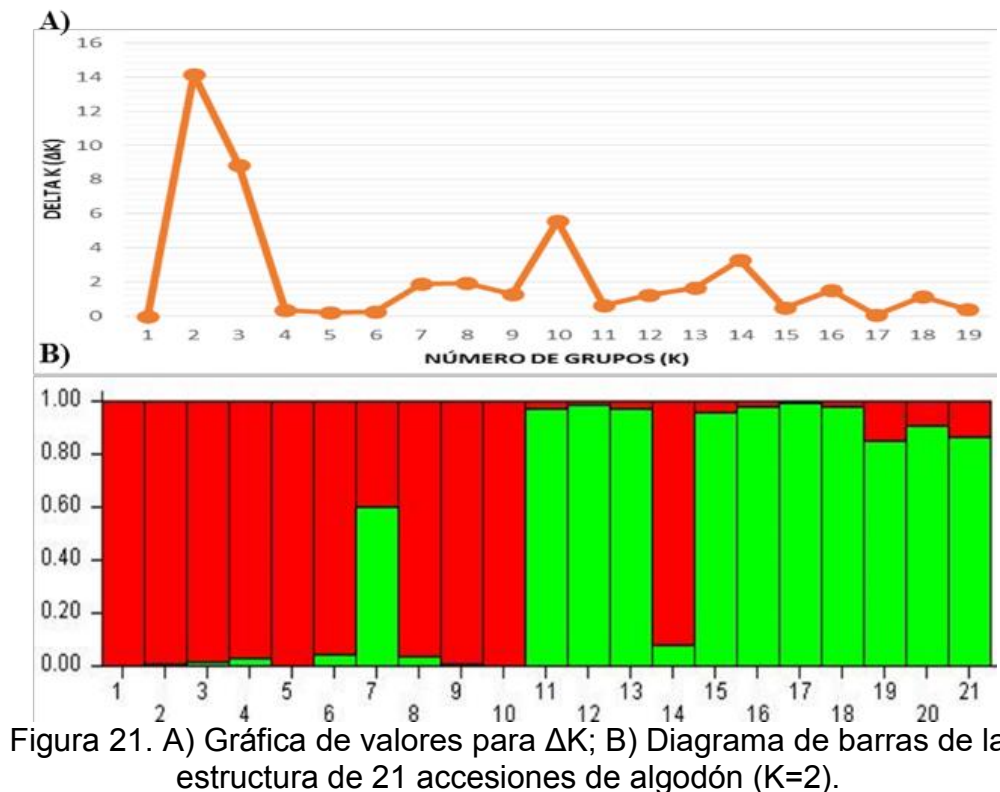


Figura 21. A) Gráfica de valores para ΔK ; B) Diagrama de barras de la estructura de 21 accesiones de algodón (K=2).

El análisis Bayesiano de la estructura de las accesiones a partir de los datos obtenidos con los marcadores ISSR confirmó los resultados obtenidos con los análisis UPGMA, AMOVA y PCoA. Implementar estos análisis ha sido sugerido en otros estudios (Samah *et al.*, 2015; Ashraf *et al.*, 2016).

Combinación de iniciadores tipo ISSR y del gen *nptII*

Los productos de PCR de los 21 genotipos mostraron una mayor cantidad de bandas en las reacciones que sólo contenían el iniciador tipo ISSR tal como se esperaba y que de hecho, fueron los mismos perfiles obtenidos en el análisis de la caracterización con ISSR. Con la combinación de iniciadores (UBC889 + *nptII* forward y UBC889 + *nptII* reverse) se redujo la cantidad de bandas por carril; ya que sólo se amplificaron aquellos fragmentos que contenían el elemento del transgen *nptII* y la inter-secuencia hasta el microsatélite UBC889, lo que concuerda con el objetivo establecido por Liu y Whittier (1995) en el desarrollo de la técnica TAIL-PCR con la que se detecta la inserción del transgen. Dada la longitud del gen *nptII*, de aproximadamente 780 pb, las bandas esperadas y consideradas como posibles marcadores fueron aquellas superiores a dicha longitud, además de ser diferentes a los productos amplificados únicamente con el iniciador UBC889 y con el par de iniciadores del gen *nptII*. Por lo anterior, se identificó en el carril del genotipo 4 amplificado con los iniciadores UBC889 + *nptII* reverse y del genotipo 6 amplificado con los iniciadores UBC889 + *nptII* forward, una banda que no estuvo presente en los carriles continuos correspondientes, esto sugiere que la combinación de iniciadores funcionó para amplificar una de las zonas que flanquean al T-DNA (Fig. 22) ya que el iniciador UBC889 se alineó con una secuencia complementaria cercana al gen *nptII*. En los 11 genotipos transgénicos restantes (5, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 19) no se logró observar una banda definida que pudiera considerarse un marcador específico de la zona de integración del T-DNA, esto puede ser debido a que el iniciador UBC889 no encontró una secuencia complementaria cercana al T-DNA que fuese capaz de amplificarse durante la PCR.

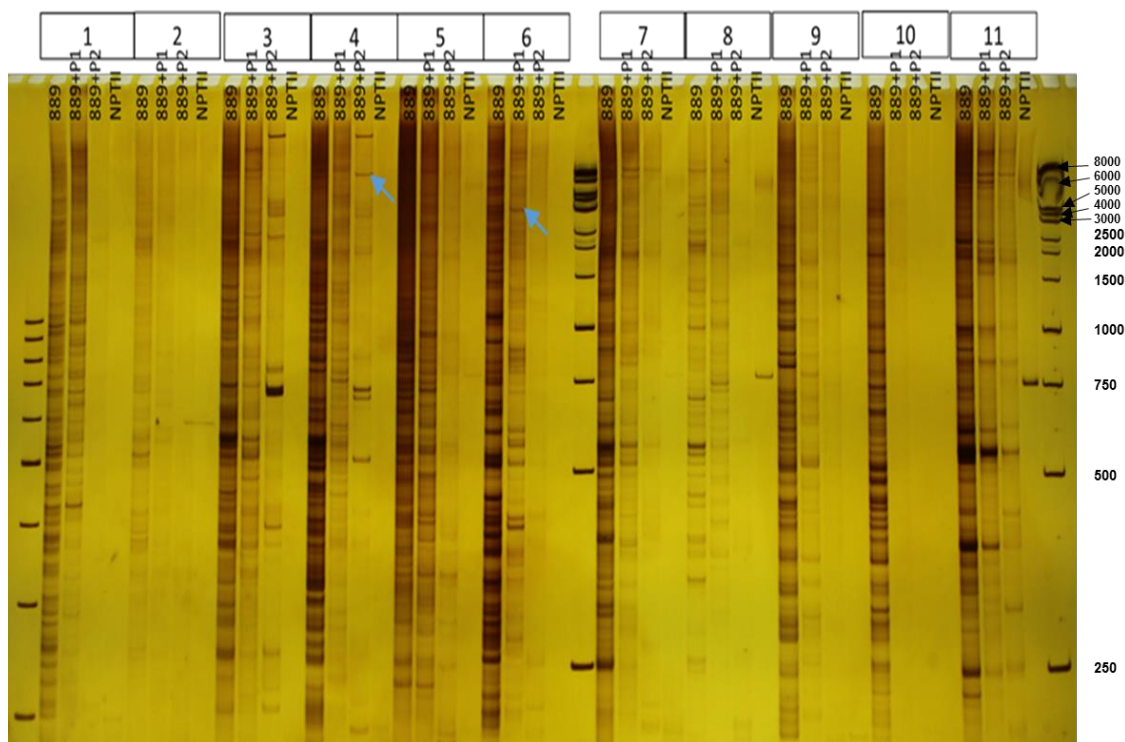


Figura 22. Productos de PCR obtenidos por la reacción independiente del iniciador UBC889, reacción conjunta del iniciador UBC889+Forward del gen *nptII*, UBC889+Reverse del gen *nptII* y los iniciadores F y R para amplificar el gen *nptII* en 11 materiales de algodón.

Una forma de comprobar que el marcador de DNA obtenido en el genotipo 4 y 6 contiene información del transgen es mediante la secuenciación de los fragmentos. De comprobarse que existe la secuencia del elemento del transgen e información propia del genoma de algodón; entonces estos resultados permitirán realizar otras combinaciones de iniciadores tipo ISSR con iniciadores forward y reverse del gen *nptII*, del promotor 35S y/o del terminador *nos* y comprobar la inserción a través del análisis de secuencias

CONCLUSIONES

A pesar de que el análisis de muestras a ciegas es complicado debido a la falta de información previa que permita interpretar y argumentar de forma objetiva los resultados obtenidos, en este trabajo se logró determinar que:

Los métodos CTAB y SDS fueron funcionales; sin embargo, se recomienda el uso del método SDS debido a que se obtiene mayor cantidad de DNA.

Los elementos genéticos: 35S, *npII* y *Tnos* se encontraron en 10 muestras (4, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16 y 17); *npII* y *Tnos* en tres muestras (6, 12 y 19); 35S y *npII* en una muestra (2) y *npII* en una muestra (20). No se detectó presencia de ningún elemento genético en cinco muestras (1, 3, 9, 10 y 18).

El sistema de marcadores tipo ISSR proporcionó gran cantidad de bandas polimórficas, lo que permitió conocer la variabilidad existente entre las muestras del set; sin embargo, con este análisis no se logró separar las muestras GM de las no transformadas.

Los iniciadores más informativos y que permitieron diferenciar a todas las muestras fueron UBC 872, MicroAnch6 y MicroAnch4

Con la finalidad de encontrar marcadores asociados al sitio de inserción del transgen, la combinación del iniciador UBC889 + *npII* reverse y del iniciador UBC889 + *npII* forward generó un fragmento en la muestra 4 y otro en la muestra 6, de pesos moleculares de 5000 y 3000 pb respectivamente, que posiblemente hacen referencia al sitio de inserción del transgen. Sin embargo se recomienda repetir las evaluaciones en ambas muestras y secuenciar el fragmento obtenido para comprobar la presencia de la secuencia del gen *npII*.

Las técnicas moleculares aplicadas permiten identificar, diferenciar y asociar marcadores moleculares a muestras GM.

LITERATURA CITADA

- Ashraf, J., Malik, W., Iqbal, M. Z., Ali Khan, A., Qayyum, A., Noor, E., ... & Ahmad, M. Q. (2016). Comparative analysis of genetic diversity among Bt cotton genotypes using EST-SSR ISSR and morphological markers. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18(2), 517–531.
- Chandrashekar, R., Prasad, B., Vankudothu, N., Chaitanya, J., Bhavani, L., Reddy, R., & Rao K. (2015). A comparative genetic diversity study among elite Bt and Non-Bt cotton varieties of Andhra Pradesh by RAPD markers. *Discovery Biotechnology*, 6(16), 30–37.
- Clarke, A. (2003). TAIL (THERMAL ASYMMETRIC INTERLACED) PCR for obtaining DNA sequence from flanking regions. Allan Wilson Centre for Molecular Ecology and Evolution, 1–4.
- Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados. (2017). (Consultado en febrero de 2017). <http://www.conacyt.mx/cibiogem/index.php/sistema-nacional-de-informacion/estadisticas>.
- Díaz, L. & Galindo, I. 2014. Detección e identificación de eventos asociados a organismos vivos modificados en semillas de maíz (*Zea mays* L.) en Venezuela empleando métodos de inmunoensayo y análisis por PCR. *Rev. Fac. Agron. (UCV)*, 40(1), 37–49.
- Dongre, A., Parkhi, V., & Gahukar, S. (2004). Characterization of cotton (*Gossypium hirsutum*) germplasm by ISSR, RAPD markers and agronomic values. *Indian Journal of Biotechnology*, 3(3), 388–393.
- Ghanem, S. (2011). Cloning of the nptII gene of Escherichia coli and construction of a recombinant strain harboring functional recA and nptII antibiotic resistance. *Genetics and Molecular Research*, 10(3), 1445–1454.
- Hemmer, W. (1997). Food Derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods (pp. 61). Basel: Agency BATS.
- Kayis, S. A., Hakki, E. E., & Pinarkara, E. (2010). Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey. *African Journal of Agricultural Research*, 5, 2925–2933.
- Lamdo, W. F. (1994). Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: the effects of PCR artifacts. *Genome Research*, 4(1), 31–37.
- Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., & Anklam, E. (1999). IUPAC Collaborative Trial Study of a Method To Detect Genetically Modified Soy Beans and Maize in Dried Powder. *Journal of AOAC International*, 82(4), 923–928.

- Liu, Y. G., & Whittier, R. F. (1995). Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, 25, 674–681.
- López, M., Mallorquín, P., & Vega, M. (2003). *Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria, Informe de Vigilancia Tecnológica*. GENOMA ESPAÑA/ CIBT-FGUAM. (pp. 12-28). España: Spainfo, S.A.
- Morillo, A., Morillo, Y., Chagüeza, Y., Caicedo, A., Jaramillo, J., Muñoz, O., ... & Muñoz, J. (2009). Caracterización de la diversidad genética en naranja y comparación del polimorfismo de microsatélites amplificados al azar (RAMs) usando electroforesis de poliacrilamida y agarosa. *Acta Agronómica*, 58(4), 234–244.
- Noormohammadi, Z., Shojaei-Jesvaghani, F., Sheidai, M., Farahani, F., & Alishah, O. (2011). Inter simple sequence repeats (ISSR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses of genetic diversity in Mehr cotton cultivar and its crossing progenies. *African Journal of Biotechnology*, 10(56), 11839–11847.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28, 2537–2539.
- Pérez, M., Rivera, J., & Matus, E. (2013). Manual de Protocolos de Medición de Organismos Genéticamente Modificados (pp. 30-52). México: Centro Nacional de Metrología (CENAM)
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.
- Querci, M., Jermini, M., & Van den Eede, G. (2007). Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. European Commission JRC, (pp. 3-11). Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas.
- Roa-Rodríguez, C. & Nottenburg, C. (2003). Antibiotic resistance genes and their uses in genetic transformation, especially in plants. In D. Ashton, (Ed.). CAMBIA Intellectual Property, Canberra.
- Rohlf, F. J. (2002) NTSYS-PC, numerical taxonomy system for the PC, ExeterSoftware, Ver. 2.2. Exeter Software, Setauket.
- Roldán-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A., & De Loose, M. (2000). AFLP Markers reveal high polymorphic rates in Ryegrasses (*Loium* spp.). *Molecular Breeding*, 6(2), 125–134.
- Samah, S., De-Teodoro, C., Serrato, M., & Valadez-Moctezuma, E., (2015). Genetic Diversity, Genotype Discrimination, and Population Structure of Mexican *Opuntia* sp., Determined by SSR Markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 34(3), 146–159.

- Tyagi, P., Gore, M. A., Bowman, D. T., Campbell, B. T., Udall, J. A., & Kuraparthi, V. (2014). Genetic diversity and population structure in the US Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 127(2), 283–295.
- Ullah, I., Iram, A., Iqbal, M., Nawaz, M., Hasni, S., & Jamil, S. (2012). Genetic diversity analysis of Bt cotton genotypes in Pakistan using simple sequence repeat markers. *Genetics and Molecular Research*, 11(1), 597–605.
- Valadez-Moctezuma, E., Samah, S. & Luna-Paez, A. (2014). Genetic diversity of *Opuntia* spp. varieties assessed by classical marker tools (RAPD and ISSR). *Plant Systematics and Evolution*, 301(2), 737–747.
- Valle-Sandoval, M.R. (2008). Obtención de Plantas Transgénicas de Crisantemo (*Dendrathera X grandiflorum* Kitam) cv. ‘Indianapolis’ que Acumulan Trehalosa. Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México. 137 p.
- Van Den Bulcke, M., Lievens, A., Leunda, A., Mbongolo, E., Barbau-Plednoir, E., & Sylviane, M. (2010). Transgenic Plant Event Detection. Patent Application Publication. US 2010/0120032 A1.
- Weising, K., Wolff, K., Nybom, H. & Kahl, G. (2005). DNA Fingerprinting in Plants Principles, Methods and Applications (2^a ed., pp. 81-106). Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Wright, S. (1978). Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations. Vol. 4. *University of Chicago Press, Chicago, IL, USA*.

APÉNDICES

Apéndice 1. Metodología de extracción de DNA

Método CTAB

Soluciones necesarias:

- Buffer de aislación: 2 % w/v CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 % PVP 40,000, 0.2 % β -mercaptoethanol (agregar justo antes de usarse)
 - Chloroform–isoamyl alcohol (24 + 1; v/v)
 - 100 % Isopropanol
 - 70 % Ethanol
 - TE buffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0
 - RNase A solution: 10 mg/ml RNase A in 10 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, pH 7.5.
 - 5 M NaCl
 - 100 % Ethanol
1. Moler 3 g de material vegetal fresco usando nitrógeno líquido, un mortero y un pistilo, hasta obtener un polvo muy fino. Evitar que el material vegetal molido se descongele antes de ser añadido al tampón de aislamiento. De lo contrario, las enzimas celulares pueden degradar rápidamente el ADN.
 2. Transferir el tejido molido a 15 ml de tampón de aislamiento precalentado (60 °C) en un tubo de polipropileno tapado o en un matraz Erlenmeyer de 50 ml. Suspender grumos con la ayuda de una espátula.
 3. Incubar durante 30 minutos a 60 °C en un baño de agua. Mezclar cada 10 minutos.
 4. Añadir 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico, tapar el tubo y mezclar durante 10 min en un agitador rotatorio o a mano. La mezcla debe realizarse suavemente pero a fondo para asegurar la emulsificación de las fases.
 5. Centrifugar durante 10 min (5000 $\times$ g, temperatura ambiente). Dependiendo de la pureza deseada de las preparaciones de ADN, la fase acuosa (superior) se puede volver a extraer una a varias veces con alcohol cloroformo-isoamílico fresco.

6. Después de centrifugar, transferir la fase acuosa final a un tubo de centrifuga evitando transferir cualquier partícula sólida.
7. Añadir 0,6 vol de isopropanol al 100 % y mezclar suavemente pero completamente invirtiendo el tubo varias veces. En esta etapa, el complejo DNA-CTAB puede precipitar como una red blanquecina. Dejar reposar en frío durante 30 min o toda la noche si no se logra observar el sedimento blanquecino. Si la muestra parece floculante, turbia o transparente después de mezclarse con isopropanol (lo que suele ocurrir), se puede recoger el precipitado por centrifugación a baja velocidad (10 min, $2000 \times g$, temperatura ambiente).
8. Añadir 20 ml de etanol al 70 %, agitar suavemente el sedimento durante un par de minutos y recoger por centrifugación (10 min, $5000 \times g$, $4^{\circ}C$). El CTAB residual se elimina en este paso.
9. Invertir los tubos y escurrir sobre una toalla de papel durante aproximadamente 1 h. Se debe tener cuidado de que los pellets no se despeguen del tubo. Los gránulos no deben contener etanol residual, ni deben estar demasiado secos. En ambos casos, la redisolución puede ser difícil.
10. Añadir un volumen apropiado de buffer TE (por ejemplo, 1 ml, dependiendo de las etapas de purificación subsiguientes elegidas) y dejar que los gránulos se disuelvan a $4^{\circ}C$ sin agitación. La inestabilidad del DNA y la presencia de polisacáridos contaminantes son los principales determinantes de la duración de este paso.
11. Añadir RNasa A tratada térmicamente hasta una concentración final de 250 $\mu g/ml$. Mezclar e incubar a $37^{\circ}C$ durante 2 horas.
12. Añadir 0,05 vol de solución de NaCl 5 M (concentración final 0,25 M), mezclar.
13. Añadir 0,35 vol de etanol al 100 %, mezclar por inversión y mantener en hielo durante 10 min.
14. Centrifugar durante 30 min ($5000 \times g$, $4^{\circ}C$). Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

15. Añadir 1 vol. de isopropanol al 100 %, mezclar por inversión y conservar durante 1 h a -20 °C.
16. Centrifugar durante 10 min (5000 × g, 4 ° C), lavar el pellet con etanol al 70 % y centrifugar de nuevo.
17. Drenar el pellet y dejar secar durante 1 hora para después disolver en 100 µl de buffer TE.

Método SDS

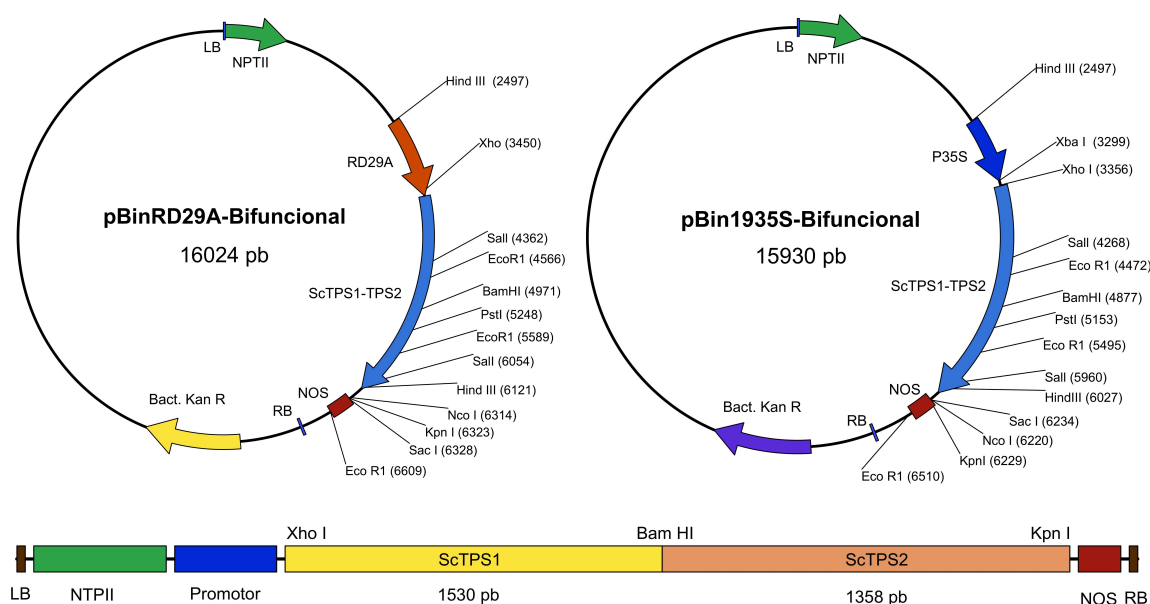
Soluciones necesarias:

- Nitrógeno líquido
 - Buffer de aislación: 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol (agregar justo antes de usar)
 - 20 % SDS
 - 5 M Potassium acetate
 - 100 % Isopropanol
 - Buffer TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0
 - RNase A solution: 10 mg/ml RNase A in 10 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, pH 7.5.
 - 5 M NaCl
 - 100 % Ethanol
-
1. Moler 3 g de material vegetal fresco usando nitrógeno líquido, un mortero y un pistilo, hasta obtener un polvo muy fino. Evitar que el material vegetal molido se descongele antes de ser añadido al tampón de aislamiento. De lo contrario, las enzimas celulares pueden degradar rápidamente el ADN.
 2. Transferir el polvo en 15 ml de buffer de aislamiento precalentado (65 ° C) en un tubo de polipropileno tapado. Suspender los grumos con una espátula.
 3. Añadir 1 ml de SDS al 20 % y mezclar bien. Incubar durante 20 minutos a 65 °C en un baño de agua. Mezclar cada 10 min.
 4. Añadir 5 ml de acetato de potasio 5 M, mezclar bien e incubar en hielo durante 30 min. En esta etapa, las proteínas y los polisacáridos se precipitan junto con el dodecil sulfato insoluble de potasio, dejando los ácidos nucleicos en solución.

5. Centrifugar durante 20 minutos ($20.000 \times g$, $4^{\circ} C$). Filtrar el sobrenadante a través de magitel en un tubo nuevo de centrífuga. Precipitar los ácidos nucleicos mediante la adición de 0,7 vol de isopropanol al 100 % frío.
6. Incubar durante 1 h durante una noche a $-20^{\circ} C$.
7. Centrifugar durante 20 minutos ($20.000 \times g$, $4^{\circ} C$). Desechar el sobrenadante.
8. Invertir los tubos y dejar escurrir sobre una toalla de papel durante aproximadamente 1 h. Tener cuidado de que los pellets no se deslicen por la pared del tubo.
9. Disolver los gránulos en 700 μl de tampón TE (durante la noche a temperatura ambiente, o 1 h a $65^{\circ} C$).
10. Añadir RNasa A tratada térmicamente hasta una concentración final de 250 $\mu g/ml$. Mezclar e incubar a $37^{\circ} C$ durante 2 horas.
11. Añadir 0,05 vol de solución de NaCl 5 M (concentración final 0,25 M), mezclar.
12. Añadir 0,35 vol de etanol al 100 %, mezclar por inversión y mantener en hielo durante 10 min.
13. Centrifugar durante 30 min ($5000 \times g$, $4^{\circ} C$). Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
14. Añadir 1 vol. de isopropanol al 100 %, mezclar por inversión y conservar durante 1 h a $-20^{\circ} C$.
15. Centrifugar durante 10 min ($5000 \times g$, $4^{\circ} C$), lavar el pellet con etanol al 70 % y centrifugar de nuevo.
16. Drenar el pellet y dejar secar durante 1 hora para después disolver en un volumen apropiado de buffer TE.

Apéndice 2. Construcción del transgen en crisantemo y alineamiento de los iniciadores

Construcción específica del T-DNA con el que fueron transformados los materiales de crisantemo.



A continuación, se muestra el alineamiento de cada uno de los iniciadores utilizados para amplificar los elementos genéticos: promotor 35S, gen *nptII* y terminador *nos*. Las secuencias de cada elemento genético fueron descargadas de la página del genbank ([/www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

35S

	
	5 15 25 35 45 55
35SForward	GCTCCTACAA ATGCCATCA- ---GATAGT- -----
35S GUS	GCTCCTACAA ATGCCATCAT TGCATAAAG GAAAGGCCAT CGTTGAAGAT GCCTCTGCCG
35S-comple	CGAGGATGTT TACGGTAGTA ACGCTATTTC CTTTCCGGTA GCAACTTCTA CGGAGACGGC
35SReverse	-----
	
	65 75 85 95 105 115
35SForward	-----
35S GUS	ACAGTGGTCC CAAAGATGGA CCCCCACCCA CGAGGAGCAT CGTGGAAAAA GAAGACGTTC
35S-comple	TGTCACCAGG GTTCTACCT GGGGGTGGGT GCTCCTCGTA GCACCTTTTT CTTCTGCAAG
35SReverse	-----
	
	125 135 145 155 165 175
35SForward	-----
35S GUS	CAACCACGTC TTCAAAGCAA GTGGATTGAT GTGATATCTC CACTGACGTA AGGGATGACG
35S-comple	GTGGGTGCAG AAGTTTCGTT CACCTAACTA CACTATAGAG GTGACTGCAT TCCCTACTGC
35SReverse	-----
	
	185 195 205 215 225 235
35SForward	-----
35S GUS	CACAATCCCA CTATCCTTCG CAAGACCCTT CCTCTATATA AGGAAGTTCA TTTCATTTGG
35S-comple	GTGTTAGGGT GATAGGAAGC GTTCTGGGAA GGAGATATAT TCCTTCAAGT AAAGTAAACC
35SReverse	GTGTTAGGGT GATAG-----
	
	245
35SForward	-----
35S GUS	AGAGGACACG
35S-comple	TCTCCTGTGC
35SReverse	-----

Gen *nptII*

						
	5	15	25	35	45	55
P1-Forward	~TGATTGAAC	AAGATGGATT	GC-----	-----	-----	-----
Gen_nptII_	ATGATTGAAC	AAGATGGATT	GCACGCAGGT	TCTCCGGCCG	CTTGGGTGGA	GAGGCTATTC
Gen_nptII	TACTAACTTG	TTCTACCTAA	CGTGCGTCCA	AGAGGCCGGC	GAACCCACCT	CTCCGATAAG
P2-Reverse	-----	-----	-----	-----	-----	-----
						
	65	75	85	95	105	115
P1-Forward	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gen_nptII_	GGCTATGACT	GGGCACAACA	GACAATCGGC	TGCTCTGATG	CCGCCGTGTT	CCGGCTGTCA
Gen_nptII	CCGATACTGA	CCCGTGTGTG	CTGTTAGCCG	ACGAGACTAC	GGCGGCACAA	GGCCGACAGT
P2-Reverse	-----	-----	-----	-----	-----	-----
						
	125	135	145	155	165	175
P1-Forward	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gen_nptII_	GCGCAGGGGC	GCCCCGTTCT	TTTTGTCAAG	ACCGACCTGT	CCGGTGCCCT	GAATGAACTG
Gen_nptII	CGCGTCCCCG	CGGGCCAAGA	AAAACAGTTC	TGGCTGGACA	GGCCACGGGA	CTTACTTGAC
P2-Reverse	-----	-----	-----	-----	-----	-----
						
	185	195	205	215	225	235
P1-Forward	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gen_nptII_	CAGGACGAGG	CAGCGCGGCT	ATCGTGCGTG	GCCACGACGG	GCGTTCCTTG	CGCAGCTGTG
Gen_nptII	GTCCTGCTCC	GTCGCGCCGA	TAGCACCAGC	CGGTGCTGCC	CGCAAGGAAC	GCGTCGACAC
P2-Reverse	-----	-----	-----	-----	-----	-----
						
	245	255	265	275	285	295
P1-Forward	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gen_nptII_	CTCGACGTTG	TCACTGAAGC	GGGAAGGGAC	TGGCTGCTAT	TGGGCGAAGT	GCCGGGGCAG
Gen_nptII	GAGCTGCAAC	AGTGACTTCG	CCCTTCCCTG	ACCGACGATA	ACCCGCTTCA	CGGCCCCGTC
P2-Reverse	-----	-----	-----	-----	-----	-----
						
	305	315	325	335	345	355
P1-Forward	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gen_nptII_	GATCTCCTGT	CATCTCACCT	TGCTCCTGCC	GAGAAAGTAT	CCATCATGGC	TGATGCAATG
Gen_nptII	CTAGAGGACA	GTAGAGTGGA	ACGAGGACGG	CTCTTTCATA	GGTAGTACCG	ACTACGTTAC
P2-Reverse	-----	-----	-----	-----	-----	-----

						
	365	375	385	395	405	415
P1-Forward	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gen_nptII_	CGGCGGCTGC	ATACGCTTGA	TCCGGCTACC	TGCCCATTTCG	ACCACCAAGC	GAAACATCGC
Gen nptII	GCCGCCGACG	TATGCGAACT	AGGCCGATGG	ACGGGTAAGC	TGGTGGTTTCG	CTTTGTAGCG
P2-Reverse	-----	-----	-----	-----	-----	-----
						
	425	435	445	455	465	475
P1-Forward	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gen_nptII_	ATCGAGCGAG	CACGTACTCG	GATGGAAGCC	GGTCTTGTTCG	ATCAGGATGA	TCTGGACGAA
Gen nptII	TAGCTCGCTC	GTGCATGAGC	CTACCTTCGG	CCAGAACAGC	TAGTCCTACT	AGACCTGCTT
P2-Reverse	-----	-----	-----	-----	-----	-----
						
	485	495	505	515	525	535
P1-Forward	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gen_nptII_	GAGCATCAGG	GGCTCGCGCC	AGCCGAACTG	TTCGCCAGGC	TCAAGGCGCG	CATGCCCGAC
Gen nptII	CTCGTAGTCC	CCGAGCGCGG	TCGGCTTGAC	AAGCGGTCCG	AGTTCCGCGC	GTACGGGCTG
P2-Reverse	-----	-----	-----	-----	-----	-----
						
	545	555	565	575	585	595
P1-Forward	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gen_nptII_	GGCGATGATC	TCGTCGTGAC	CCATGGCGAT	GCCTGCTTGC	CGAATATCAT	GGTGGAAAAT
Gen nptII	CCGCTACTAG	AGCAGCACTG	GGTACCCTTA	CGGACGAACG	GCTTATAGTA	CCACCTTTTA
P2-Reverse	-----	-----	-----	-----	-----	-----
						
	605	615	625	635	645	655
P1-Forward	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gen_nptII_	GGCCGCTTTT	CTGGATTTCAT	CGACTGTGGC	CGGCTGGGTG	TGGCGGACCG	CTATCAGGAC
Gen nptII	CCGGCGAAAA	GACCTAAGTA	GCTGACACCG	GCCGACCCAC	ACCGCCTGGC	GATAGTCCTG
P2-Reverse	-----	-----	-----	-----	-----	-----
						
	665	675	685	695	705	715
P1-Forward	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gen_nptII_	ATAGCGTTGG	CTACCCGTGA	TATTGCTGAA	GAGCTTGGCG	GCGAATGGGC	TGACCGCTTC
Gen nptII	TATCGCAACC	GATGGGCACT	ATAACGACTT	CTCGAACCGC	CGCTTACCCG	ACTGGCGAAG
P2-Reverse	-----	-----	-----	-----	-----	-----
						
	725	735	745	755	765	775
P1-Forward	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gen_nptII_	CTCGTGCTTT	ACGGTATCGC	CGCTCCCGAT	TCGCAGCGCA	TCGCCTTCTA	TCGCCTTCTT
Gen nptII	GAGCACGAAA	TGCCATAGCG	GCGAGGGCTA	AGCGTCGCGT	AGCGGAAGAT	AGCGGAAGAA
P2-Reverse	-----	-----	-----	-----	-----AT	AGCGGAAGAA
						
	785	795				
P1-Forward	-----	-----				
Gen_nptII_	GACGAGTTCT	TCTGA				
Gen nptII	CTGCTCAAGA	AGACT				
P2-Reverse	CTGCTCAAG-	-----				

Terminador *nos*

Alignment: D:\Documentos\Escritorio\pBI\Tnos\Forward y Reverse en Tnos de pBI121.txt

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      5          15          25          35          45          55

Tnosforward -----GA ATCCTGTTGC CGGTCTTGCG
Tnos_pBI12  GATCGTTCAA ACATTTGGCA ATAAAGTTTC TTAAGATTGA ATCCTGTTGC CGGTCTTGCG
Tnos_pBI12  CTAGCAAGTT TGTAACCGT TATTTCAAAG AATTCTAACT TAGGACAACG GCCAGAACGC
TnosReverse -----

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      65          75          85          95          105         115

Tnosforward -----
Tnos_pBI12  ATGATTATCA TATAATTTCT GTTGAATTAC GTTAAGCATG TAATAATTAA CATGTAATGC
Tnos_pBI12  TACTAATAGT ATATTAAAGA CAACTTAATG CAATTCGTAC ATTATTAATT GTACATTACG
TnosReverse -----

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      125         135         145         155         165         175

Tnosforward -----
Tnos_pBI12  ATGACGTTAT TTATGAGATG GGTTTTTATG ATTAGAGTCC CGCAATTATA CATTTAATAC
Tnos_pBI12  TACTGCAATA AATACTCTAC CCAAAAATAC TAATCTCAGG GCGTTAATAT GTAAATTATG
TnosReverse -----C CCAAAAATAC TAATCTCAGG GCG-----

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
      185         195         205         215         225         235

Tnosforward -----
Tnos_pBI12  GCGATAGAAA ACAAATATA GCGCGCAAAC TAGGATAAAT TATCGCGCGC GGTGTCATCT
Tnos_pBI12  CGCTATCTTT TGTTTTATAT CGCGCGTTTG ATCCTATTTA ATAGCGCGCG CCACAGTAGA
TnosReverse -----

      ....|....|  ....|.
      245         255

Tnosforward -----
Tnos_pBI12  ATGTTACTAG ATCGGG
Tnos_pBI12  TACAATGATC TAGCCC
TnosReverse -----

```