



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“AUTENTIFICACIÓN DE MAÍZ TRADICIONAL Y
GENÉTICAMENTE MODIFICADO EN PRODUCTOS
COMERCIALES EN MÉXICO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

SANDRA LÓPEZ MORÁN

ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MOTIEL SOSA

COASESOR: M.C. JOSEFINA MORENO LARA.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

**DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN:L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Autenticación de Maíz Tradicional y Genéticamente Modificado en Productos Comerciales en México.

Que presenta la pasante Sandra López Morán

Con número de cuenta: 303818120 para obtener el título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cuautitlan Izcalli, Mex. a 18 de febrero de 2011

PRESIDENTE	<u>Dr. José Francisco Montiel Sosa</u>	
VOCAL	<u>Dra. Elsa Gutiérrez Cortéz</u>	
SECRETARIO	<u>MC. Tais Nopal Guerrero</u>	
1er SUPLENTE	<u>IA. Miriam Alvarez Velasco</u>	
2º SUPLENTE	<u>Dr. Sergio Jiménez Ambriz</u>	

DEDICATORIAS

A mi madre, Rosa, por su amor, apoyo y comprensión, porque me dio la vida y me dio su visa; porque a pesar de no entender muchas de sus razones siempre me ha complacido en cada etapa de mi vida.

Para mis hermanos, Jorge, Andrea y David, porque a pesar de las muchas diferencias que tenemos hemos aprendido a seguir adelante en los momentos difíciles y tener como objetivo lograr todas nuestras metas.

Para mi tía, María Luisa, por ser como una segunda madre, porque siempre estuviste allí cuando más te necesitamos y porque siempre estubo por parte tuya el apoyo, sin pedir nada a cambio.

A Raúl, por querer construir un camino juntos, por todo lo que me das y por todo lo que eres y tienes, por que aprendí que es posible y necesario exigir lo imposible, por ser una persona humilde y alegre, que comparte todo aun teniendo poco, que a pesar de los sacrificios siempre esperas pacientemente escucharme y compartir las alegrías de cada día, y sobre todo esto y más cosas quiero que sepas que la posición que tu tienes en la vida, especialmente en la mía, tiene un valor sin igual.

Para mis amigos, por todo su apoyo, por hacerme los momentos difíciles pasables y hacer mi vida en la UNAM lo más divertido y amena posible, gracias por su apoyo académico, personal y su amistad.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a todas las personas que fueron parte del desarrollo de éste trabajo de tesis y todas aquellas que de alguna forma fueron parte del proyecto:

Al Dr. José Francisco Montiel Sosa por el interés mostrado durante la elaboración e investigación de ésta Tesis y por todas y cada una de las facilidades otorgadas para su desarrollo.

Al M.C. Josefina Moreno Lara por el apoyo, dedicación y paciencia incondicional presentadas para el desarrollo de esta Tesis, por enseñarme a que todo se tiene que fundamentas científica y técnicamente.

Al Q.F.B. Angélica Saldaña por haberme enseñado varias de las técnicas utilizadas en éste trabajo, así como por su paciencia, apoyo e interés.

Al I.A. Ana Sánchez por su amistad, así como por sus consejos y observaciones siempre tan certeros.

Al I.A. Karla García por su amistad, su apoyo, comentarios y observaciones, no solo durante la elaboración de la tesis, sino en todo el transcurso de la carrera, gracias por ser una buena amiga.

A Brenda Rebollo, por ser una excelente amiga y confidente por entender mis tristezas y alegrías, por compartir un poco del mucho cariño que ofrece, porque sabe que el apoyo es mutuo y porque sabemos que siempre se debe caminar hacia enfrente y porque espero que muy pronto comparta éste momento de llegar a ser nombrada Ingeniero.

Al I.A. Arturo Jácome, por ser un buen amigo y una excelente persona, por enseñarme muchas lecciones de vida, eres un claro ejemplo a seguir.

Al Dra. Elsa Gutiérrez Cortes, M.C. Tais Nopal Guerreo, I.A. Miriam Alvarez Velasco y Dr. Sergio Jiménez Ambriz, mis sinodales, por el interés prestado a éste trabajo.

A mi familia en general por el mucho o poco apoyo que han brindado, porque gracias a eso me he formado y concientizado en la persona que soy.

Al Lic. Rocío Carraro Zanella, por el apoyo, experiencias y comentarios que me ha compartido, los cuales en muchas ocasiones me hicieron reflexionar y con esto seguir siempre adelante, porque siempre se lucha por lo que uno quiere y pretender, gracias por la confianza en todo este tiempo.

Se agradece el apoyo al programa PAPIME PE203211 de la DGAPA UNAM, a este trabajo, ya que se obtuvo el segundo lugar en la sesión de carteles dentro del XIII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, otorgado por el programa de Químico en Alimentos de la Universidad Autónoma de Zacatecas, la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, y la División Ciencias de la Vida Universidad de Guanajuato.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
 CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	
1.1 Características del maíz, <i>Zea mays</i>	12
1.2 El maíz en México y en el mundo.....	17
1.3 Mejoramiento agronómico y selección artificial en maíz.....	21
1.4 Perspectivas y evaluación del maíz transgénico en México.....	22
 CAPÍTULO 2. TRANSGÉNESIS EN PLANTAS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA	
2.1 Biotecnología e Ingeniería Genética en plantas.....	25
2.2 Cultivo de tejidos vegetales.....	26
2.3 Métodos y técnicas de transformación en plantas.....	28
2.4 Situación mundial de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) de uso agrícola.....	32
2.5 Uso y comercialización de maíz Genéticamente Modificado en el mundo y repercusiones para México.....	34
2.6 Presencia del promotor 35S y T-NOS en eventos comerciales de maíz liberados al ambiente.....	37
 CAPÍTULO 3. MÉTODOS PARA LA AUTENTIFICACIÓN DE ALIMENTOS	
3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	39
3.1.1 Fundamento de la técnica de PCR.....	39

3.1.1.1 Desnaturalización.....	41
3.1.1.2 Hibridación.....	41
3.1.1.3 Elongación.....	42
3.1.2 Condiciones de la reacción.....	42
3.1.3 Componentes de la reacción.....	44
3.2 Limitaciones de la técnica.....	46
CAPÍTULO 4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	
4.1 Justificación.....	47
4.2 Descripción del Cuadro Metodológico.....	47
4.3 Materiales.....	51
4.4 Métodos.....	55
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
CONCLUSIONES.....	82
ANEXO 1.....	84
REFERENCIAS.....	88
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
FIGURA 1. Preservación de los antecedentes genéticos de las variedades de maíz.....	9
FIGURA 2. México Centro de origen de maíz.....	11
FIGURA 3. Intensidades de colores de maíz.....	13
FIGURA 4. Esquema de la planta de maíz.....	14
FIGURA 5. Representación de un corte transversal de un grano de maíz, indicando las partes que lo componen.....	16
FIGURA 6. Representación de la distribución de razas de maíz en México.....	18
FIGURA 7. Producción, consumo y promedio de cotización del grano De maíz 2000 y 2011.....	19
FIGURA 8. Introgresión del flujo génico en cultivos de plantas silvestres de maíz.....	24
FIGURA 9. Distintos tipos de manipulación y cultivos <i>in vitro</i> de sistemas vegetales.	26
FIGURA 10. Secuenciación del promotor CaMv 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV).....	37
FIGURA 11. Esquema de la amplificación de una molécula de DNA molde en los ciclos de la PCR.....	40
FIGURA 12. Condiciones de temperatura en un ciclo estándar de PCR.....	43

FIGURA 13. Cuadro metodológico.....	48
FIGURA 14. Productos comerciales utilizados para analizar la presencia de maíz transgénico.....	52
FIGURA 15. Procedimiento para la dilución de primers en la reacción de PCR.....	58
FIGURA 16. Programa de PCR, para maíz.....	59
FIGURA 17. Programa de PCR, para maíz transgénico.....	60
FIGURA 18. Ejemplo de una fotografía de un gel de agarosa, realizado por electroforesis.....	63
FIGURA 19. Detección de maíz a partir de primers diseñados en un programa bioinformático: MITOMAP, en un gel de agarosa al 2%.....	69
FIGURA 20. Identificación de siete variedades de maíz a partir de primers diseñados por autenticación específica de maíz, en un gel de agarosa al 2%.....	70
FIGURA 21. Identificación de un primer bloque de siete variedades de maíz a partir de primers diseñados para autenticación específica de maíz, en un gel de agarosa al 2%.....	72
FIGURA 22. Identificación de un segundo bloque de siete variedades de maíz a partir de primers diseñados para autenticación específica de maíz, en un gel de agarosa al 2%.....	72
FIGURA 23. Identificación de un tercer bloque de siete variedades de maíz a partir de primers diseñados para autenticación específica de maíz, en un gel de agarosa al 2%.....	73

FIGURA 24. Representación de las nueve muestras comerciales que amplificaron con los primers diseñados para autenticación específica de maíz, en un gel de agarosa al 2%.....	74
FIGURA 25. Amplificación de CaMV y T-NOS, dos transgénicos comunes en la actualidad experimentados en maíz, en un gel de agarosa al 2%.....	75
FIGURA 26. Representación de las nueve muestras comerciales con los primers que amplifican al transgénico CaMV, en un gel de agarosa al 2%.....	76
FIGURA 27. Representación de las nueve muestras comerciales con los primers que amplifican al transgénico T-NOS, en un gel de agarosa al 2%.....	77
FIGURA 28. Identificación de CaMV en muestras criollas de maíz, en un gel de agarosa al 2%.....	78
FIGURA 29. Identificación de T-NOS en muestras criollas de maíz, en un gel de agarosa al 2%.....	79
FIGURA 30. Identificación del protocolo de autenticación de maíz para cuatro muestras obtenidas del Estados de Chiapas y de Nayarit, en un gel de agarosa al 2%.....	80
FIGURA 31. Identificación del protocolo de autenticación de maíz transgénico para cuatro muestras obtenidas del Estado de Chiapas y de Nayarit, en un gel de agarosa al 2%.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
TABLA 1. Taxonomía del maíz.....	15
TABLA 2. Composición promedio de la materia seca del grano entero.....	17
TABLA 3. Principales tipos de maíz transgénicos liberados al ambiente.....	36
TABLA 4. Muestras de maíz analizadas.....	51
TABLA 5. Muestras de productos comerciales procesadas a base de maíz que se analizaron.....	52
TABLA 6. Límites en cantidades necesarias para realizar una adecuada PCR.....	58
TABLA 7. Componentes y cantidades necesarias para la preparación de una muestra al realizar una electroforesis.....	62
TABLA 8. Muestras de maíz, nomenclatura y concentración de DNA, al extraer el DNA total de la muestra.....	64
TABLA 9. Muestras de maíz, nomenclatura y concentración de DNA, al diluir 2 µL de DNA y adicionarle 50 µL de agua libre de nucleasas.....	65
TABLA 10. Cantidad de muestra diluida en agua, teniendo una concentración aproximada a 60 ng/µL de DNA.....	65
TABLA 11. Muestras de productos comerciales, nomenclatura y valores de concentración aproximado a 60 ng/µL.....	67

RESUMEN

El maíz, es un cereal que se puede cultivar en casi todos los climas, casi todas las altitudes y casi todos los suelos; se cultiva pronto, se almacena con facilidad y se conserva por largo tiempo; se prepara con sencillez y no requiere de equipos complejos para consumirse. Por su importancia genética se le está convirtiendo en el patrimonio privado de dos o tres empresas transnacionales. Sin embargo, nada ha amenazado a la agricultura y los campos mexicanos como la actual contaminación de las variedades criollas con maíz transgénico, lo cual constituye uno de los bienes estratégicos más importantes de la nación. Ello resulta especialmente preocupante no sólo debido a la importancia sociocultural y económica de la agricultura tradicional del maíz, sino también porque México es el centro de origen de este importante cereal. Con este trabajo se propone examinar, el flujo genético de maíz transgénico hacia variedades criollas, así como la aparición de estos transgénicos en productos comerciales. En términos generales, el proyecto incluye información sobre:

- los aspectos socioeconómicos y ecológicos de la agricultura tradicional del maíz;
- los planteamientos más recientes sobre los posibles riesgos y beneficios del maíz transgénico;
- los aspectos económicos del maíz transgénico, incluidos sus efectos en el cultivo tradicional en el México rural;
- los vínculos entre diversidad genética del maíz, biodiversidad y sustento de las comunidades rurales mexicanas, y los marcos jurídicos nacional e internacional.

A consecuencia de estos puntos importantes en el presente trabajo se muestra la intervención de los transgénicos del maíz en productos comerciales que tienen un alto nivel de consumo y que sin embargo en su etiqueta no está mencionada esta especificación. Estos resultados fueron obtenidos gracias a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que mediante la amplificación de un fragmento de DNA específico se puede hacer la comparación entre maíz criollo y maíz genéticamente modificado. Llegando a la conclusión de que efectivamente se encontró evidencia de introducción de maíz transgénico, esto se puede deber a que en la actualidad existe una guerra por el control de los alimentos, de la comida diaria y de las semillas que son consumidas, ya que forman un elemento fundamental para el control de las poblaciones no sólo en México, sino también en poblaciones mundiales.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo surgió como consecuencia de la polémica de los alimentos genéticamente modificados, para lo cual se tiene la intención de organizar toda la información recabada para propiciar una reflexión de manera integral y global, que no solamente incorpore diferentes puntos de vista que existen sobre este controvertido aspecto del desarrollo científico – tecnológico, sino que integrará al mismo tiempo las diferentes disciplinas y aspectos de su problemática, teniendo en cuenta que para una solución satisfactoria se requiere una reflexión integral e interdisciplinaria, particularmente en nuestro país.

En México se encuentran diversas variedades de maíz (figura 1), por lo que si se presenta una pérdida de estas variedades trae principalmente problemas como: ecológicos ya que pone en peligro su existencia; sociales ya que al perderse las tradiciones ancestrales, se pierde el vínculo que los pueblos tienen con el maíz y la base de su alimentación; y por último, un problema económico ya que al poner en peligro la producción del grano se genera una crisis económica al sector agrícola (40).

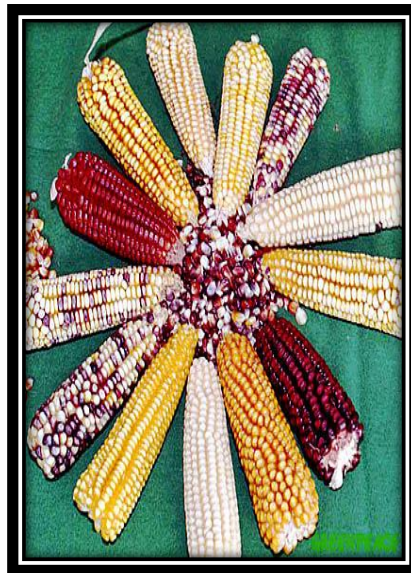


FIGURA 1. Preservación de los antecedentes genéticos de las variedades de maíz.

Un “alimento genéticamente modificado” o como se denomina comúnmente “alimento transgénico” se diferencia de otro “no modificado”, en que al primero se le ha modificado ciertos genes que pueden o no ser propios de dicho alimento mediante métodos moleculares,

proporcionando una característica diferencial frente al “no modificado”. Dicha modificación genómica y el desarrollo de técnicas biológicas han permitido no sólo conocer la estructura del ADN sino su papel en la expresión contenido en su código (11).

La obtención de estos nuevos alimentos, se realiza generalmente mediante la inserción de una cantidad proporcional mínimo de DNA en comparación con el genoma total del alimento por lo que los métodos de análisis requieren de técnicas específicas con una alta capacidad de detección (32).

La ciencia es una forma de conocer y explicar el mundo que nos rodea, pero se diferencia de otras formas de conocimiento en que utiliza maneras particulares de observar, pensar, experimentar y probar, las cuales constituyen los aspectos fundamentales de su naturaleza. La ciencia puede entenderse como un proceso de producción de conocimientos, que no sólo cuenta con instrumentos que extienden los sentidos y que permiten hacer observaciones cuidadosas e intervenciones en los fenómenos, sino que cuenta también con el establecimiento de teorías que les dan sentido (8).

En el caso de la ingeniería genética, la cual se expresa como una tercera revolución, está relacionada con el mundo biológico al que pertenece el ser humano; la capacidad de manipular en forma directa los genes que determinan la forma y función de los organismos vivos utilizando medios técnicos sofisticados tiene repercusiones inmediatas en los seres humanos, particularmente en la producción de alimentos y en la salud. Desde el inicio de la “agricultura”, hace aproximadamente entre 10 000 y 12 000 años, las plantas y los animales se han cultivado y criado selectivamente para obtener nuevas variedades de utilidad para el ser humano, pero este mejoramiento por procesos naturales de reproducción es lento y es una técnica limitada a aquellos organismos con reproducción sexual (8).

Las nuevas tecnologías surgidas de la ingeniería genética permiten transferir directa y rápidamente el material genético de organismos poco emparentados entre sí, produciendo formas “nuevas” o variedades en corto tiempo; esta transferencia permite “crear” organismos con determinadas características deseadas para llevar a cabo ciertos procesos particulares,

superando las limitaciones de la reproducción sexual, en la medida en que permite añadir, combinar o quitar funciones de los organismos vivos (8).

En la figura 2 se muestra una pintura en la cual se expresa ampliamente que el maíz es la planta más domesticada y evolucionada del reino vegetal. Desde el siglo pasado diversas teorías han sido expuestas para explicar el origen y la evolución del maíz, y se ha aceptado al teocintle de Chalco (*Zea mays ssp mexicana*) como el antecesor directo del maíz (29).

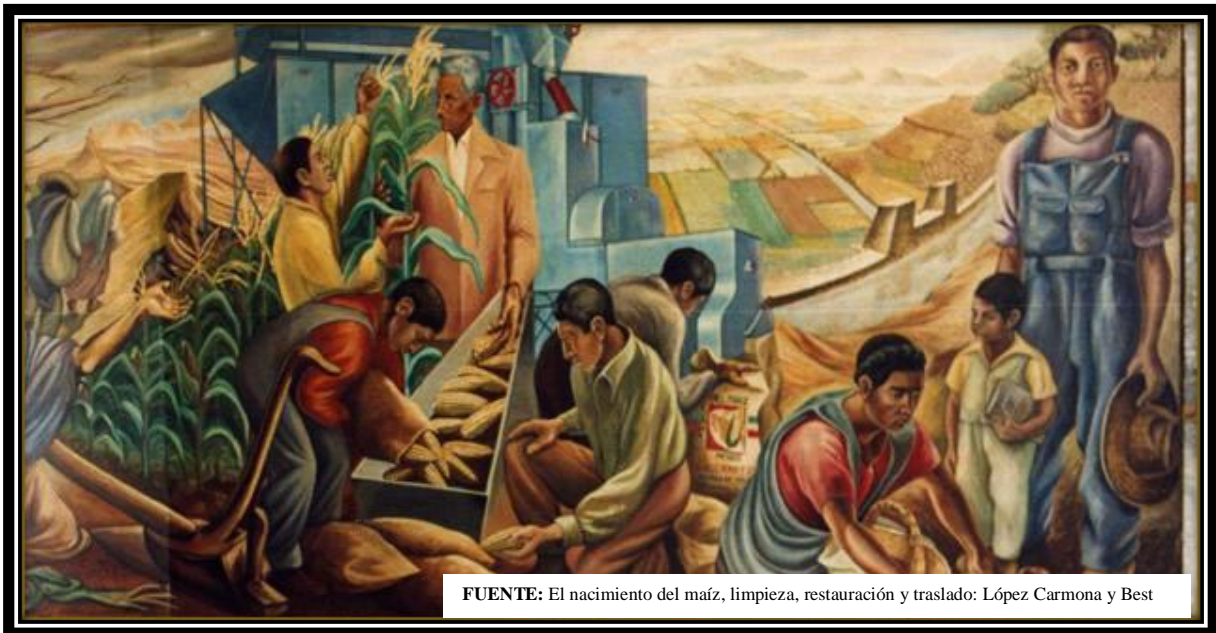


FIGURA 2. México, centro de origen del maíz.

Por lo cual para entender mejor el objetivo de estudio, primero se debe entender los antecedentes que generan al maíz como motivo de estudio y posteriormente se presenta la estrategia experimental propuesta y realizada para la determinación y obtención de resultados. Lo que se pretende obtener de este trabajo experimental es demostrar que efectivamente los alimentos que consumimos no reportan claramente los ingredientes de los cuales están hechos y que son proporcionados al consumidor a un precio muy accesible; además la importancia que tiene en la actualidad la utilización de métodos para la autenticación de especies como es la Reacción en cadena de la polimerasa, la cual genera resultados satisfactorios y verídicos.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1 Características del maíz, *Zea mays* L.

La denominación *Zea* es una voz de origen griego, derivada de *zeo* = *vivir*. Esta planta es conocida con el nombre común de maíz, derivado de la palabra taína *mahís* con que los indígenas del Caribe la denominaban. Dependiendo de la región, *Zea mays* recibe también en español nombres como oroña, danza, zara, millo, mijo o panizo (35).

En México, las mazorcas maduras, pero frescas reciben el nombre de elote que viene del nombre náhuatl *elotl*, mismas que en Sudamérica y otros países del área sudamericana reciben el nombre de *choclo* (del quechua *chujllu*) y en Venezuela el nombre de *jojoto*. El nombre nahuatl del maíz, *tlayoli*, todavía es de uso común en el estado mexicano de Oaxaca. En el Perú y Bolivia, lo llaman *sara* en quechua como en la época de los Incas. En Canarias se le denomina *millor*, palabra tomada del portugués (*milho*), a la *mazorca de maíz* se le denomina *piña de millo* y en China *Arroz de Jade*, *Trigo de Jade* (*Yu mai*) y *Sorgo de Jade* (35).

Por otro lado maíz, literalmente significa “lo que sustenta la vida”. Botánicamente pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta anual alta dotada de un amplio sistema radicular fibroso. Las variedades cultivadas fundamentalmente para alimentación comprende el maíz dulce y el reventador, aunque también se usa una buena medida de maíz dentado, el amiláceo o harinoso y el cristalino; este último también se utiliza para pienso (20).

Junto con el trigo y el arroz, el maíz constituye uno de los recursos naturales renovables más relevantes en toda la historia de la humanidad; el grano posee diversas intensidades de colores: blanco, amarillo, rojo, azul, morado, púrpura, negro, variegado y pinto, lo cual puede apreciarse en la figura 3; una de sus principales ventajas es la amplia plasticidad de adaptación, apenas igualada por el frijol para formar el “Taco Mexicano” (51).



FIGURA 3. Intensidades de colores de maíz.

La figura 3 muestra los múltiples colores que presentan las variedades del maíz, lo cual ha sido de gran interés y estudio debido a la información genética que presenta cada una ante problemas de sequía y de consumo humano (15).

Zea mays es una planta monoica; sus inflorescencias masculinas y femeninas se encuentran en la misma planta, alcanza hasta los 2,5 m de altura, con un tallo erguido, rígido y sólido; algunas variedades silvestres alcanzan los 7 m de altura. El tallo está compuesto a su vez por tres capas: una epidermis exterior, impermeable y transparente, una pared por donde circulan las sustancias alimenticias y una médula de tejido esponjoso y blanco donde almacena reservas alimenticias, en especial azúcares. La figura 4 muestra una planta de maíz esquematizando las partes que lo componen e ilustrando cada una de ellas (35).

Las hojas toman una forma alargada íntimamente enrollada al tallo, del cual nacen las espigas o mazorcas. Cada mazorca consiste en un tronco u *olote* que está cubierta por filas de granos, como se puede apreciar en la figura 4. El maíz es absolutamente capaz de reproducirse por sí solo. Por su gran masa de raíces superficiales, es susceptible a sequías, intolerancia a suelos deficientes en nutrientes, y a caídas por severos vientos. El maíz es el cereal más eficaz como productor de grano, en esto contribuyen varios factores: gran tamaño de la planta, dotada de

un área foliar muy considerable, con un tallo fuerte y alto, sistema de raíces abundantes y tejido vascular (conductor) amplio y resistente (35).



FIGURA 4. Esquema de la planta de maíz.

En la figura 4 se declara la importancia que presenta el maíz en los alimentos ya que estos han aumentado progresivamente, esto garantiza a la agricultura un margen de rentabilidad que le permita adquirir nuevas cosechas generando de esta forma un proceso más productivo (23).

El grano de maíz tiene alto valor nutritivo como fuente de energía, por su alto contenido de carbohidratos, pero no posee las suficientes proteínas, tanto en cantidad como en calidad, por ser incompleto en dos aminoácidos esenciales: lisina y triptófano; además es insuficiente en la vitamina niacina y en minerales, excepto en calcio por la forma de industrializar a harina nixtamalizada. La deficiencia en niacina y triptófano, condiciona que el exceso de maíz en la dieta alimenticia predisponga a la pelagra, enfermedad grave, consistente en inflamación superficial de la piel, y trastornos digestivos y nerviosos (51).

La taxonomía es la forma más elemental de agrupar a los individuos, partiendo de sus propiedades más generales a las más específicas, por lo cual en la tabla 1 se puede observar la forma taxonómica para representar al maíz (1).

TABLA 1. Taxonomía del maíz.

REINO	Plantae
SUBREINO	Tracheobionta
SUPERDIVISIÓN	Spermatophyta
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Lilliosida
SUBCLASE	Commelinidae
ORDEN	Cyperales
FAMILIA	Poaceae
GENERO	<i>Zea L.</i>
ESPECIE	<i>Zea mays L.</i>

FUENTE: Acquaah, G. 2007

En el ciclo biológico del maíz se distinguen varios estadios: 1) Semilla, 2) Germinación, 3) Emergencia, 4) Plántula, 5) Amacollamiento (ocasionalmente), 6) Crecimiento activo, 7) Encañe, 8) Prefloración, 9) Floración masculina (espigamiento), 10) Floración femenina (jiloteo), 11) Polinización, 12) Fecundación, 13) Grano lechoso (elote), 14) Grano masoso (elocinte), 15) Madurez fisiológica (barroceo o camagua), 16) Madurez de cosecha (16-25% de humedad), 17) Grano comercial o semilla (12-14% de humedad), 18) Rastrojo (planta seca con 12-14% de humedad, sin mazorca). El fruto de la planta del maíz se llama comercialmente grano, botánicamente es una carióspside y agrícolamente se le conoce como semilla, en la Figura 5 se indica el diagrama de un grano de maíz y el nombre de sus partes (51).

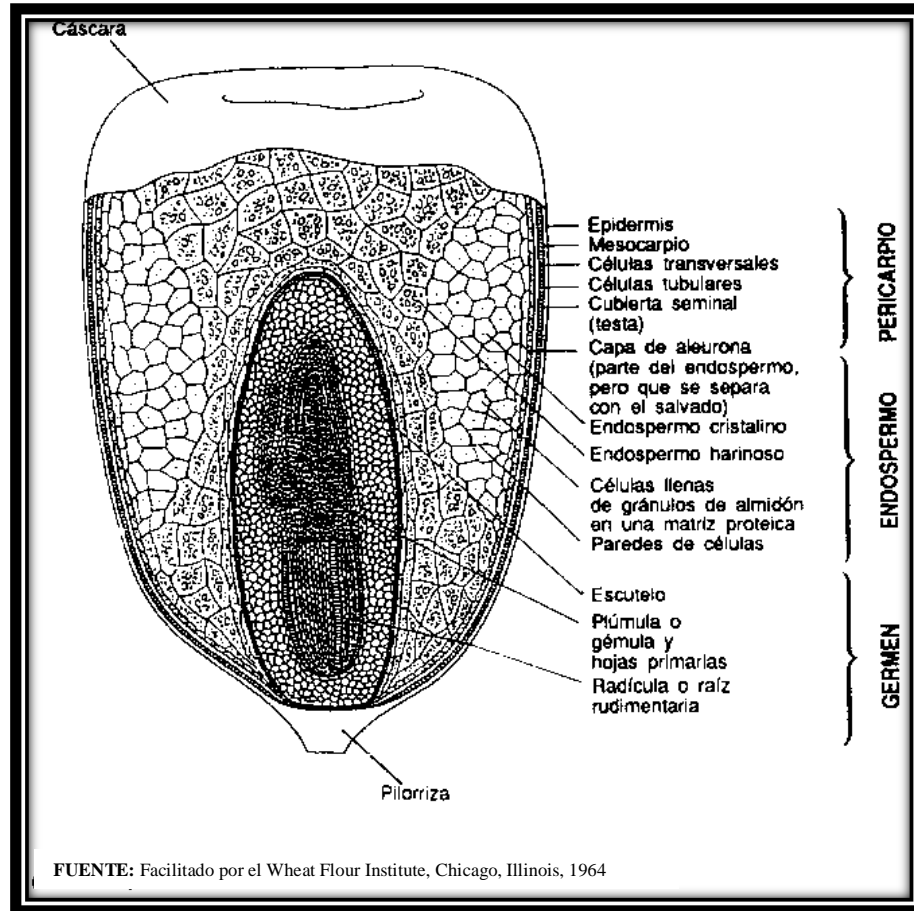


FIGURA 5. Representación de un corte transversal de un grano de maíz, indicando las partes que lo componen.

- Pericarpio: protege la semilla.
- Endospermo: es la reserva de la que se alimenta la nueva planta hasta que pueda empezar a sintetizar por sí misma, formado por un 90% de almidón, un 7% de proteínas y cantidades menores de sustancias minerales, aceites...
- Embrión o germen: lo forma un eje embrionario integrado a su vez por la plúmula y la radícula y el escutelo o cotiledón, cuya función es la de servir de reserva a la semilla y la plántula en sus primeras etapas de desarrollo (35).

El endospermo incluye aproximadamente el 82% del grano; también aproximadamente el pericarpio abarca el 6% y el embrión el 12%. La composición promedio de la materia seca del grano entero se representa en la Tabla 2.

TABLA 2. Composición promedio de la materia seca del grano entero.

COMPONENTE	POR CIENTO
Almidón	72.40
Grasas (aceite)	4.70
Proteína	9.60
Cenizas	1.43
Azúcares	1.94
Fibra	9.93

FUENTE: Reyes, C.P. 1990

El maíz es una de las plantas más útiles al hombre, una de sus principales características es su gran adaptación, ya que se cultiva desde Ecuador a diferentes latitudes norte y sur; desde el nivel del mar, hasta más de 3 200 msnm; en suelos y climas muy variables y con una tecnología muy diversa. Se adapta mejor en suelos húmedos y fértiles, en regiones subtropicales templadas y en regiones tropicales altas, con temperaturas altas durante el día y bajas durante la noche (51).

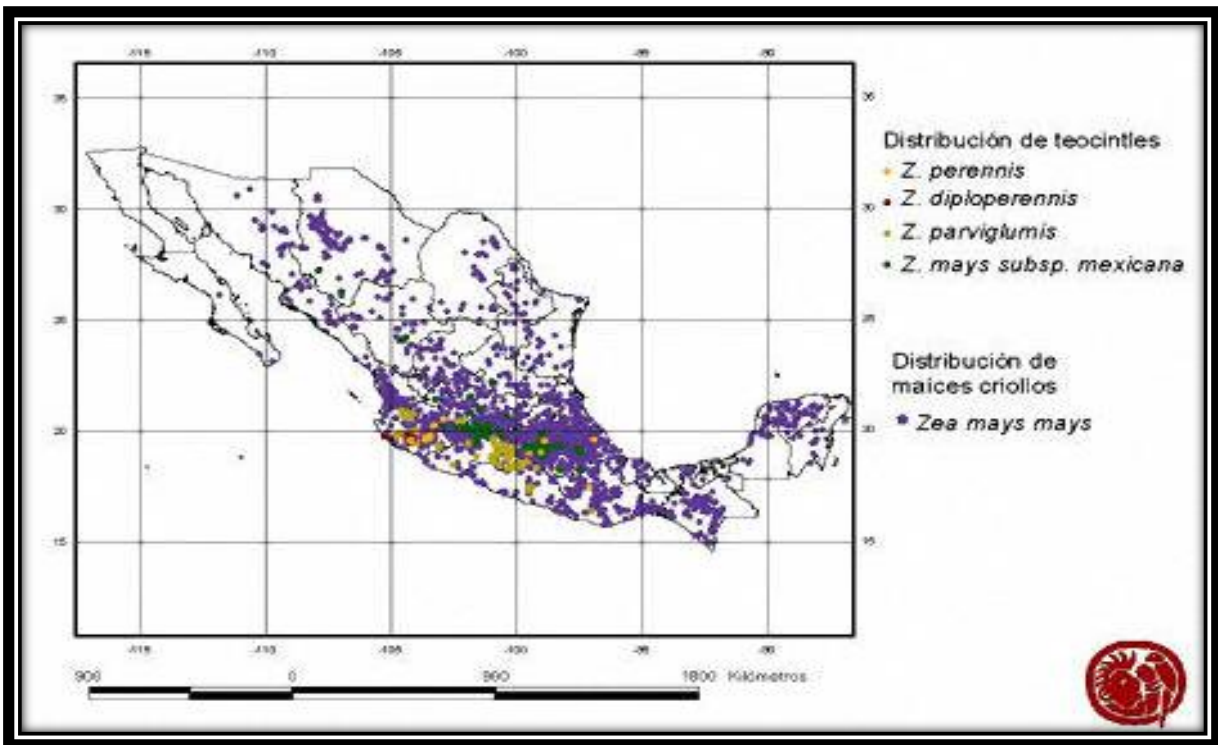
1.2 El maíz en México y en el mundo

Por su gran diversidad de variedades y usos, la planta, grano o cultivo, ha tenido muchas especulaciones sobre su origen, en relación al origen geográfico, algunos estudiosos consideran que el maíz es nativo de Asia, otros piensan que es de América. Esto último es lo más aceptado, ya que existen los suficientes testimonios que avalan al Nuevo Mundo como al verdadero. Hay suficiente evidencia indicando que México fue el centro primario de origen, domesticación y dispersión del maíz; que ocurrió hace más de 6 mil años y que las migraciones humanas lo llevaron a Sudamérica. De México se dispersó hacia el norte del continente y posteriormente hacia Europa y Asia. Los factores que han favorecido y acelerado la variación y evolución del maíz son: las migraciones humanas, las mutaciones, la selección natural o artificial, el aislamiento y la endogamia, el cruzamiento entre variedades diferentes y la hibridación con *Tripsacum* o con *Teocintle* (51).

En la actualidad principalmente se siembran semillas de siete clases:

- Variedades criollas, ejemplos: hoja morada, olote delgado...
- Variedades mejoradas, corresponde a todas aquellas que se encuentran en los programas de mejoramiento genético con símbolo V-número, ejemplo: V-424
- Variedades sintéticas, presentan símbolo VS-número, ejemplo: VS-201
- Variedades híbridas, presentan símbolo H-número, ejemplos: H-352, H-507...
- Generaciones avanzadas de híbridos o Híbridos acriollados, ejemplos: F2, F3...
- Cruzas naturales recíprocas entre maíces criollos con variedades mejoradas.
- Híbridos naturales de las diversas clases de semillas descritas con Teocintle (45).

En México, las miles de variedades dispersas en su territorio se han agrupado en 30 razas y 6 subrazas; 25 bien definidas y 5 en estudio. Las razas de maíz, cuyas variedades son ampliamente comerciales son: a) Vandeño, b) Tuxpeño, c) Tabloncillo, d) Chalqueño y e) Celaya; en la Figura 6 se presenta un mapa que indica la distribución de las razas de maíz en México (11).



FUENTE: Comisión Nacional para la Biodiversidad, Importancia económica del maíz.

FIGURA 6. Representación de la distribución de razas de maíz en México.

La diversidad de razas y variedades de los centros de origen le confieren gran fragilidad, en caso de que se genere una contaminación con transgénesis de las variedades criollas a nivel nacional por la polinización abierta, o bien por la conservación y el intercambio de semillas, se pueden acumular varias modificaciones genéticas en los maíces criollo que afecten su capacidad productiva y su naturaleza como alimento, por lo que en la figura 6 se observa los principales estados de asentamiento de teocintles y de maíz criollo para identificar una posible recuperación o revertir el daño a estas razas acumuladas durante miles de años (12).

En el 2010 se alcanzó un volumen nacional de 24.9 millones de toneladas producidas en 7.54 millones de hectáreas de tierra que representó el 36.26% del área total nacional cultivada (53). En la Figura 7 se muestra el rendimiento del maíz en México para los usos que se le dan, teniendo que como rendimiento promedio nacional es de 3.3 toneladas por hectárea y que las principales entidades productoras son Sinaloa, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Guanajuato y Chiapas; de acuerdo con datos de la SAGARPA la inversión en el sector es de alrededor de 17 074 millones de pesos y su valor de producción es de 68 764 850.61 miles de pesos. (39)

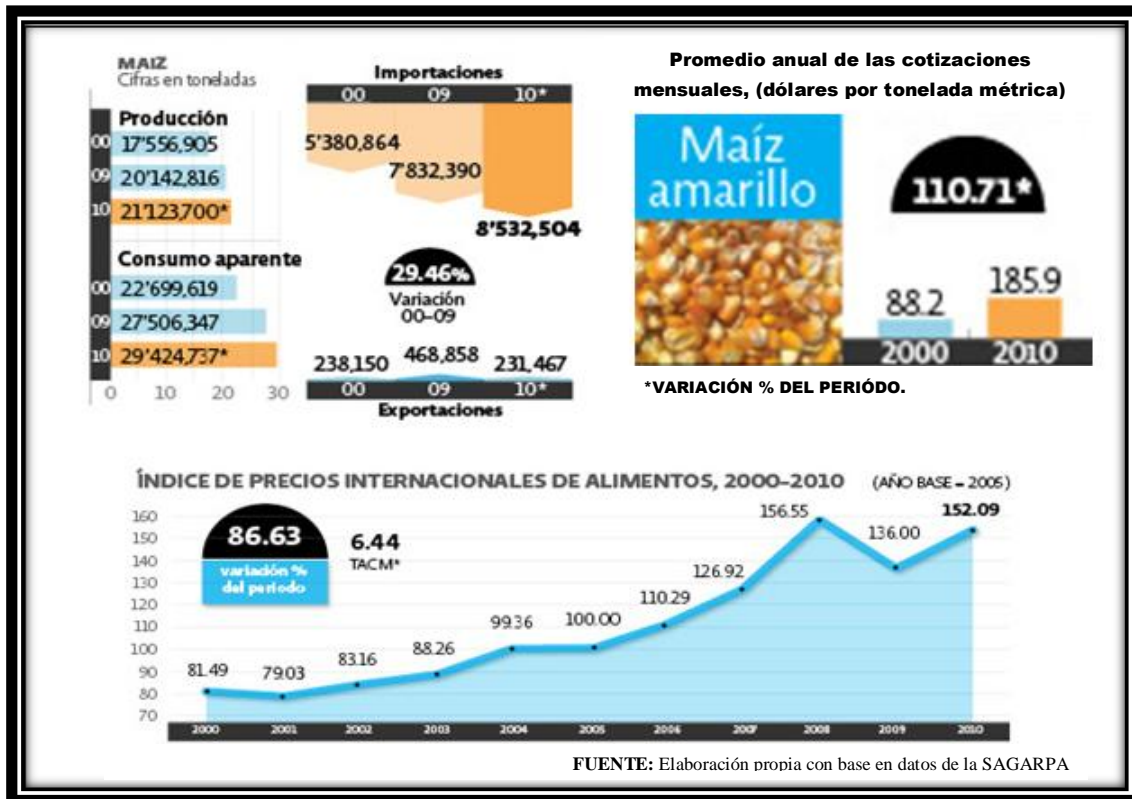


FIGURA 7. Producción, consumo y promedio de cotización del grano de maíz 2000 y 2011

Mundialmente se estima que la producción de maíz 2010/2011 será de 814,25 millones de toneladas (2). Entre los principales países productores de Maíz se encuentran:

- Estados Unidos 316,16 millones de toneladas
- China 168,0 millones de toneladas
- Unión Europea (27 estados) 55,19 millones de toneladas
- Brasil 51,0 millones de toneladas
- México 24, millones de toneladas
- Argentina 22,0 millones de toneladas
- India 21,0 millones de toneladas
- Sudáfrica 12,5 millones de toneladas
- Ucrania 11,9 millones de toneladas
- Canadá 11,71 millones de toneladas
- Nigeria 8,7 millones de toneladas
- Indonesia 8,0 millones de toneladas
- Egipto 7,0 millones de toneladas
- Filipinas 7,0 millones de toneladas
- Serbia 6,8 millones de toneladas
- Vietnam 5,5 millones de toneladas
- Otros países 77,78 millones de toneladas

El maíz tiene múltiples usos, entre los que se encuentran: (51)

➤ Planta	➤ Mazorca	➤ Grano
Forraje verde	Elote-alimento humano	Alimentación humana
Ensilado	Forraje tosco	Alimentación del ganado
Rastrojo, forraje tosco	Olote (combustible)	Materia prima en la industria
Materia orgánica al suelo		Semilla

En México el grano de maíz, tiene escaso uso ganadero; el maíz se aprovecha directamente como alimento humano (tortillas, bollos, arepa, elote, etc.) o como materia prima en la

industria alimentaria (harina, maicena, aceite, mieles, etc.) e industria diversa. Se estiman más de 800 artículos, que utiliza la humanidad, en los cuales interviene el maíz, representando también un aprovechamiento en la ganadería y en las industrias básicas y complementarias. Su importancia puede analizarse en diversos aspectos como son:

- **Académico:** es una planta de amplio espectro en su utilidad para múltiples ejemplos y medios de ayuda en cursos de biología, química y agronomía. Son escasas las especies de plantas que compiten con el maíz.
- **Científico:** como recurso biológico para explicar teorías, principios y leyes que han contribuido en los avances de las ciencias biológicas y sus aplicaciones en agronomía; en la creación de nuevas tecnologías que se aplican en fitotecnia y conocimiento de causas que explican los efectos en diversos caracteres de plantas y animales.
- **Social:** el maíz significa trabajo, moneda, pan y religión para grandes conglomerados humanos, ya que representa un bienestar social en y entre los pueblos que lo producen, evitando así, la dependencia del extranjero y resguardando su soberanía al no tener que importar este producto básico.
- **Económico:** la importancia del maíz en el mundo y en México, se manifiesta por lo siguientes rubros: significa bienestar económico para los países autosuficientes y/o exportadores; los múltiples usos como alimento humano directo o transformado en carne, huevo, leche y derivados; como instrumento en la industria; por su amplia área geográfica de cultivo, ya que se encuentra en 134 países dispersos en el mundo (82% de los países lo producen) y por su alto volumen de producción (51).

1.3 Mejoramiento agronómico en maíz

En esencia, todas las propiedades de los organismos dependen de la suma de sus genes; los primeros estudios de Watson y Crick y otros, a principios de los años cincuenta, condujeron a la construcción del modelo de la doble hélice describiendo la estructura molecular del DNA y las implicaciones para la comprensión de la replicación genética. Desde entonces ha habido gran cantidad de descubrimientos sobre las complejas interacciones requeridas para expresar la información codificada en la molécula de DNA en la expresión celular o del organismo. Los cambios en la molécula de DNA que posibilitan la aparición de códigos complementarios para

una especie es el medio utilizado por los organismos para evolucionar y adaptarse a nuevas condiciones medio ambientales (57), (32).

En esencia, los cambios en el DNA de un organismo pueden ocurrir de dos maneras:

- Por mutación, que consiste en la adición o eliminación de uno o más componentes químicos de la molécula de DNA.
- Por intermediarios de información genética o DNA entre organismos similares normalmente por reproducción sexual y por transformación horizontal en bacterias (57), (7).

La genética clásica fue, hasta hace un poco, la única vía mediante la cual la herencia podía ser estudiada o manipulada. Sin embargo, en los años recientes, las nuevas técnicas han permitido la posibilidad de manipulación genética de organismos a tasas antes nunca pensadas, permitiendo incluso el intercambio de DNA en el laboratorio entre distintas especies. La manipulación del material genético en organismos puede ahora conseguirse de tres maneras claramente definibles: a nivel organismo, celular y molecular (57), (9).

1.4 Perspectivas y evaluación del maíz transgénico en México

Los alimentos elaborados con base en cultivos transgénicos o procesados con ayuda de componentes de otros organismos modificados genéticamente (OGM) han aparecido en los anaqueles y en las notas periodísticas cada vez con mayor frecuencia. La percepción de su naturaleza, intención, utilidad y riesgos, por distintos sectores sociales, ilustra las diversas maneras de la desorganización entre el desarrollo científico-tecnológico y el conocimiento público, en ambos sentidos (36).

Los alimentos transgénicos se derivan, de manera genérica, de variedades dentro de especies vegetales, animales o de microorganismos conocidos que han sido “modificados genéticamente” y se utilizan desde hace casi un decenio, ya sea como componentes principales

o desde antes, como insumos complementarios del proceso de los mismos.¹ Esta modificación genética se entiende actualmente y de manera convencional, como la producida por procedimientos derivados de la biotecnología moderna, es decir, los que involucran la movilización de fragmentos de ADN (genes recombinantes o transgenes), del genoma de un organismo a otro, el cual se propaga luego para constituirse en una variedad MG (8).

En principio, algunas experiencias de divulgación y el análisis somero de la cobertura de prensa sobre este tema siguieren que existe un considerable grado de desconocimiento, tanto en el público general como en los grupos empresariales (8). Es decir, existen diferencias acentuadas en la *percepción* de los motivos, la confiabilidad en los métodos y los efectos finales de la ingeniería genética aplicada a la producción agroalimentaria. Las causas son diversas pero, por un lado, los modos de difusión e intercambio de información sobre la naturaleza y alcances de la biotecnología agrícola no han sido suficientemente directos, amplios y plurales, lo que ha fortalecido la polarización de opiniones en torno a su generación, uso y regularización (52).

Por otro lado, si bien se reconoce un derecho indiscutible para la elección personal en materia de consumo, lo cual se fundamenta en un espectro contrastante de concepciones sobre la gestación productiva y ambiental, en lo relativo a las opciones de política pública, el asunto es más complejo. Un punto de vista importante es asumir que cada tecnología o producto derivado tiene riesgos y beneficios potenciales que motivaron su generación o adopción. Sin ir más lejos, nuestro sistema alimentario depende mayoritariamente de cultivos intensos de temporal; almacenamiento rústico y empaque en zonas industriales (8), (4).

Aunque tales procedimientos se traducen normalmente en un mayor volumen de productos saludables, frescos y no perecederos a costos pocos variables, diversas eventualidades podrían provocar peligros graves si no hubiera un marco regulatorio y mecanismos de control que los eviten (6), (10).

¹ Se excluyen de esta otros OGM, cuyos productos tienen una aplicación en el área farmacéutica, ambiental e industrial, los cuales requerirían de un estudio adicional en términos del análisis de riesgos y percepción pública.

En términos ecológicos, los riesgos hasta ahora más discutidos de la liberación de transgénicos en el medio ambiente son los que derivan del movimiento no intencional de los transgenes a poblaciones de variedades tanto cultivadas como silvestres para las cuales dichas transformaciones genéticas no fueron diseñadas. En el caso del maíz en México, los datos se resumen en dos aspectos fundamentales: 1) la posibilidad de introgresión (que los genes entren y persistan) de las variedades transgénicas hacia las razas de maíces locales o criollos y hacia los parientes silvestres del maíz que se encuentren en México y, 2) las consecuencias biológicas de esta introgresión (5). El flujo génico de maíz a teosinte (*Z. mays. ssp. mexicana*) ocurre a tasas bajas en cada generación, pero cuando las plantas crecen en proximidad, los alelos de los cultivos introgresan a las poblaciones de los parientes silvestres después de varias generaciones. La figura 8 muestra un ejemplo de introgresión de caracteres genéticos de variedades mejoradas a nativas cuando ambas crecen incluso a distancias mayores de varios cientos de kilómetros (8).



FIGURA 8. Introgresión del flujo génico en cultivos de plantas silvestres de maíz.

Por lo tanto, el flujo génico y la introgresión a variedades locales cultivadas y silvestres será difícil de evitar una vez que crezcan plantas transgénicas en los campos mexicanos, como muestra la figura 8. Además, los individuos de teosinte y maíz portadores de los transgenes pueden constituirse en puentes para la introgresión de los transgenes a nuevas variedades. Finalmente, el intercambio de semillas entre agricultores puede también hacer que las áreas en las cuales ocurra la introgresión sean mayores a las que se esperan por el flujo génico vía polen (8), (27).

CAPÍTULO 2. TRANSGÉNESIS EN PLANTAS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA

2.1 Biotecnología e ingeniería genética en plantas

La necesidad del ser humano de obtener diferentes fuentes que le proporcionen alimentos en diferentes regiones y ambientes dio lugar al nacimiento y desarrollo de la agricultura. Aun cuando la “biotecnología” es un término relativamente reciente, sus orígenes se pueden rastrear en los albores de la civilización humana, cuando para subsistir, los campesinos del neolítico empezaron a modificar su ecosistema al seleccionar de sus cosechas cierto tipo de semillas para sembrar en el siguiente periodo (8), (27).

Los beneficios que se han obtenido en los últimos dos siglos a partir de la modificación de diferentes organismos ha favorecido el mejoramiento y la generación de transformaciones en diversas tecnologías. Este sería el caso de la aplicación de la genética al mejoramiento y la generación de transformaciones en diversas tecnologías (31). La aplicación sistemática de esta forma de selección ha llevado al mejoramiento masivo de diferentes granos básicos, los cuales se han introducido en diferentes regiones del mundo (8).

La ingeniería genética ha producido plantas de cultivo resistentes a las plagas, desde un cierto punto de vista el medio ambiente es el que sale ganando, porque se disminuye el uso de pesticidas; pero lo más paradójico es que las organizaciones que se han dedicado a proteger el medio ambiente han sido las que se han opuesto de forma más ruidosa a la introducción de estas plantas, a las que se denomina genéticamente modificadas (GM). Como en el caso de la ingeniería genética en animales, la dificultad del primer paso en biotecnología vegetal consiste en lograr introducir el fragmento deseado de ADN (el gen útil) en la célula vegetal, y después en el genoma de la planta (63). Tal como los biólogos moleculares descubren con frecuencia, la naturaleza inventó un mecanismo para realizar esta tarea siglos antes de que los biólogos pensarán siquiera en ello (24).

Conviene puntualizar que la ingeniería genética de plantas es una realidad, pero queda todavía un campo en experimentación cuyas expectativas de aplicación han despertado un enorme interés en el ámbito mundial (8), (66).

2.2 Cultivo de tejidos vegetales

El trabajo práctico con células y tejidos vegetales tiene ciertas particularidades que le hacen único en varios aspectos. A continuación se relacionan algunos procedimientos básicos que soportan la experimentación en este campo, lo cual se puede apreciar en la figura 9.

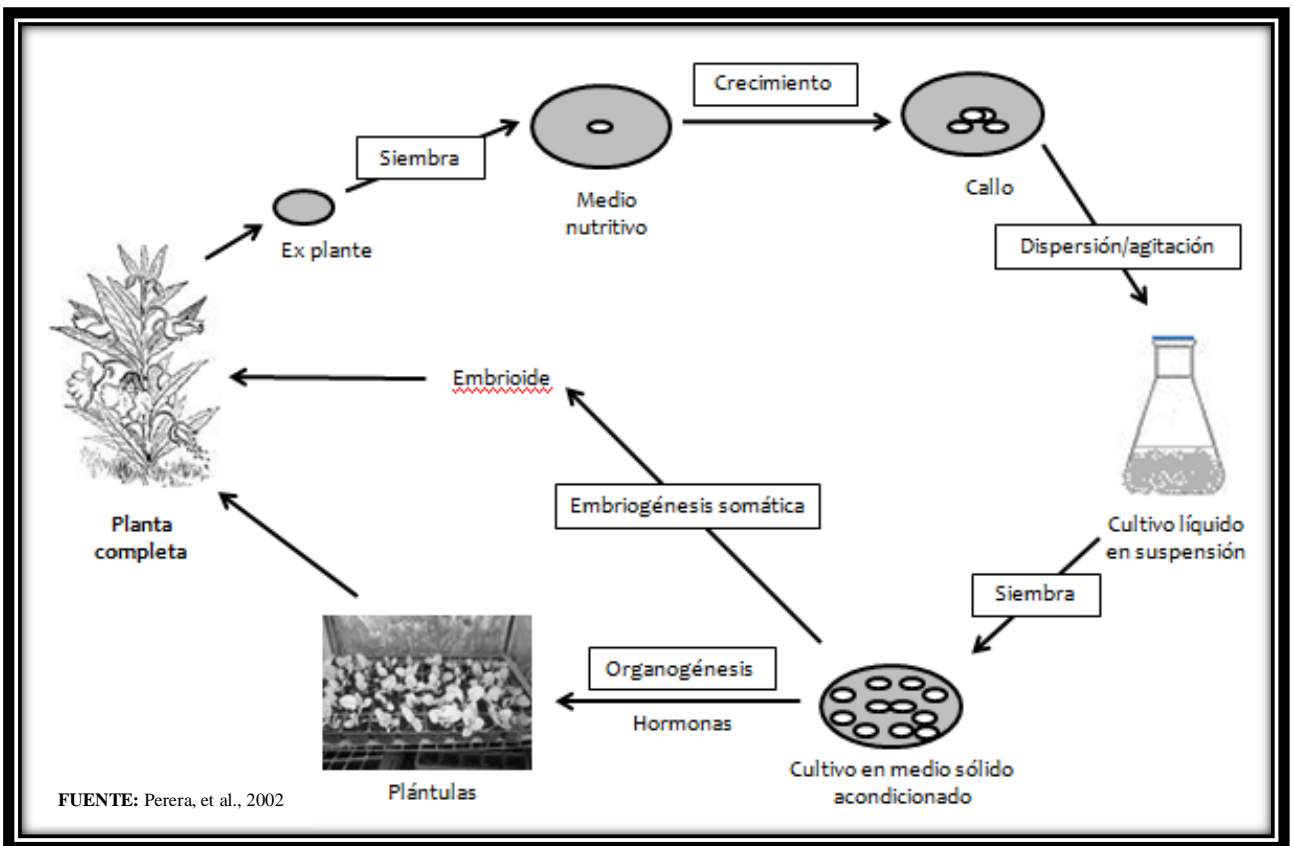


FIGURA 9. Distintos tipos de manipulación y cultivos *in vitro* de sistemas vegetales.

En la figura 9 se puede apreciar los pasos que se siguen para generar un organismo con características nuevas, además se observa que son diversos los métodos que se pueden ocupar para este fin, por lo que a continuación se explica brevemente lo que la Ingeniería Genética ha logrado hasta la actualidad (47).

- Cultivo de tejidos y obtención de callos: Consiste en el crecimiento indefinido de pequeñas piezas de tejido, denominadas *explantes*, aisladas de un organismo y cultivadas en medios nutritivos adecuados. Los explantes más frecuentes derivan de hijas, yemas, extremos de la raíz, segmentos nodales o semillas en germinación. Estos se lavan con un desinfectante (agua oxigenada, hipoclorito, etc.) para eliminar microorganismos y se deja en un medio nutritivo donde, puede llegar a formar una masa celular indiferenciada llamada *callo* que, una vez establecida, puede propagarse indefinidamente por subdivisión (47).
- Cultivos líquidos en suspensión: Si una pieza de un callo joven se transfiere a un medio líquido y se agita, la masa celular en mayor o menor grado produce una suspensión de células aisladas que pueden subcultivarse indefinidamente en un medio que contenga los nutrientes y hormonas adecuados. La mayoría de estos cultivos son muy heterogéneos a causa de la presencia de agregados celulares; además, ciertas especies presentan una gran inestabilidad genética que se detecta tras largos períodos de cultivo (*variación somaclonal*). Algunas plantas (tabaco, soja) forman callos poco compactos que se deshacen más fácilmente por agitación y que producen líneas celulares mucho más homogéneas (47).
- Cultivos en medio sólido: Los cultivos en suspensión pueden “sembrarse” en un medio sólido en el que las células se dividen y forman callos, de manera análoga a como las bacterias forman colonias. El medio acondicionado se consigue haciendo crecer una gran densidad de células de la misma o distinta especie en medio líquido fresco durante algunos días y luego eliminando las células por filtración; el medio así obtenido, cuya composición no está bien definida, promueve la proliferación celular, tras la incorporación de un agente gelificante, este medio se utiliza para la preparación de placas sobre las que las células aisladas de un cultivo en suspensión pueden dividirse y formar callos. El cultivo *in vitro* de tejidos es una forma muy frecuente de conservar diversas variedades vegetales en los llamados *bancos de germoplasma* (47).

- **Regeneración de una planta completa:** La presencia de fitohormonas es necesaria para el mantenimiento de cultivos vegetales. Para cada especie vegetal en concreto, la naturaleza de la(s) hormona(s) presente(s) en el medio y en su concentración, son factores determinantes para la diferenciación de sus células hacia la formación de distintos tejidos. El proceso de *organogénesis* se puede conseguir en condiciones específicas para cada especie y ha supuesto un avance extraordinario para el desarrollo de la Ingeniería Genética en vegetales ya que permite la regeneración de un individuo completo a partir de una única célula; haciendo crecer a ésta en un medio con una composición adecuada de hormonas se puede lograr que crezca formando un brote y, luego, modificando dicha composición hormonal, se puede inducir la formación de raíz, para regenerar finalmente una planta completa (47).
- **Embriogénesis somática:** Además de la regeneración de tejidos, en algunas especies y en ciertas condiciones de cultivo específicas para cada una, se pueden inducir sobre el callo un proceso diferente conocido como *embriogénesis somática* que implica un camino distinto de diferenciación hacia un *embriode*, semejante al observado en el cigoto tras la fertilización. El embriode es parecido al embrión, pero surge de una célula somática y no de la fusión de dos células germinales; puede desarrollarse hasta una planta totalmente funcional sin necesidad de inducir artificialmente la formación de raíz y tallo, por lo que en algunos casos se producen para su comercialización (47).

2.3 Métodos y técnicas de transformación en plantas

La existencia de una fuerte pared celular ha obligado a desarrollar procedimientos especiales, más o menos complicados, para lograr la manipulación genética de plantas (24). Por un lado, se ha tratado de eliminar el obstáculo físico que supone la pared celulósica; por otro, se han buscado procedimientos alternativos de transformación que dirijan la entrada de DNA al interior celular incluso en presencia de esa pared (47). A continuación se resumen los pasos más importantes de estos métodos.

- **Transformación de protoplastos:** La eliminación de la pared de celulosa de las células vegetales convierte a éstas en *protoplastos*, que, al estar rodeados sólo por una membrana plasmática, capturan DNA exógeno más fácilmente. Los protoplastos se pueden preparar a partir de células en suspensión, de células de un callo o de tejidos intactos mediante un tratamiento enzimático con pectinasas, que rompen los agregados y liberan las células, y con celulasas y hemicelulasas, que degradan la pared. Tras ellos, los protoplastos se recogen por centrifugación, se lavan y se separan de las células intactas y de los restos celulares mediante sedimentación a través de sacarosa. El protoplasto puede regenerar la pared celular en un medio sólido nutriente; es un proceso que se alarga entre 5 y 10 días, tras lo cual empieza a dividirse, e incluso puede llegar a regenerar una planta entera directamente o a través de la formación de callo (47).
- **Transformación de discos de hojas:** Esta técnica es una buena alternativa a la regeneración de plantas a partir de protoplastos. Cuando, a partir de una hoja, se recortan pequeños discos (de algunos milímetros de diámetro), las células de su borde tienen una gran capacidad regenerativa (además de ser fácilmente transfectadas por el sistema más eficaz de transformación en plantas, el de *Agrobacterium tumefaciens*). Tras 2-4 semanas, los discos se transfieren a medios que estimulan la diferenciación celular y en los que se consigue la regeneración de la planta. El proceso completo, desde que se cortan los discos hasta que se tienen plantas con raíz, puede llevar de 4-7 semanas, lo que es mucho más rápido que la regeneración a partir de un cultivo de protoplastos (47).
- **Infección con *Agrobacterium*:** Es uno de los procedimientos que más han contribuido al desarrollo de la manipulación genética de vegetales. *Agrobacterium* es una bacteria capaz de transferir DNA desde su citoplasma al interior de células de plantas, por un método manual. La manipulación de ese DNA permite la incorporación de pasajeros que finalmente aparecerán en la célula vegetal. La inoculación de discos de hojas con cultivos de esta bacteria es un procedimiento estándar para la modificación de

dicotiledóneas, aunque su eficiencia sobre monocotiledóneas es baja, por lo que su uso con ellas es más restringido (47).

- **Transformación con precipitados de DNA:** El sistema de *Agrobacterium* no es eficaz sobre plantas monocotiledóneas, como los cereales. Para estos casos, se han tratado de desarrollar procedimientos basados en métodos físicos. La captura de DNA en forma de co-precipitado con fosfato cálcico ha dado buenos resultados con células animales en cultivo, pero no funciona con células vegetales ni con protoplastos (47).
- **Electroporación:** Mediante ésta técnica utilizando campos de entre 200 y 600 volts se consigue transferir DNA extraño a protoplastos de arroz y maíz con rendimientos aceptables. Es un método que se ha impuesto por su eficacia y por la versatilidad de su instrumental que puede usarse, con algunas adiciones al equipo, sobre otros muchos sistemas celulares (bacterias, levaduras, células animales, etc). En el caso de las plantas se lleva a cabo sobre protoplastos y, por tanto, implica la regeneración de la planta a partir de ellos, etapa lenta, difícil y con el riesgo de la variación somaclonal que acompaña a un cultivo prolongado. Recientemente, se ha logrado la electroporación de células previamente tratadas para la degradación mínima y controlada de su pared, alcanzando un rendimiento aceptable y permitiendo tiempos de regeneración más cortos (47).
- **Transformación con microproyectiles (biobalística):** Esta técnica especial utiliza minúsculas esferas de metal como balas que, disparadas por un mecanismo adecuado, pueden penetrar en una célula intacta sin destruirla. Las balas, de entre 0.4 y 4 μm de diámetro, suelen ser de tungsteno o de oro y el DNA que se desea introducir es precipitado sobre ellas con cloruro cálcico. El mecanismo de disparo se basa en una pistola especial que lanza los microproyectiles a más de 400 m/s sobre las células receptoras; originalmente se usaba más carga explosiva, pero posteriormente se están aplicando sistemas eléctricos o neumáticos (47).

Las células que se van a transformar se pueden presentar como cultivos en suspensión depositados en filtros, como callos o como sección de tejidos intactos (hojas, tallos, semillas, etc.). Las células que están situadas en el centro del cono de tiro son las más afectadas y pueden llegar a ser destruidas, pero las que ocupan zonas concéntricas sobreviven, ya que el proyectil penetra en su citoplasma sin dañarlas seriamente. Tras el “bombardeo”, las células son colocadas en condiciones adecuadas para la regeneración de la planta. La *biobalística* se presenta con un potencial enorme para su aplicación a la experimentación en Ingeniería Genética (47).

Por otro lado, también se hace énfasis a las técnicas con las cuales se lleva a cabo la transformación en plantas. Se tiene una amplia gama de técnicas de biología molecular a las cuales se les denominan "BLOTS" (13). Todas se basan en la transferencia de material biológico de un gel sobre una membrana porosa de una manera que preserva la forma en que se separa en el gel. Hay una variedad de formas de hacer la transferencia de difusión positiva, ya sea absorbiendo, succionando o de campo eléctrico (electrotransferencia) (56). A continuación se explica en que consiste cada una de estas técnicas:

- **Southern Blot:** El nombre de la técnica deriva en parte del apellido del investigador que la desarrolló (Edward M. Southern) y de la palabra inglesa Blot, que significa traspasar. El Southern Blot es una técnica que permite la identificación (presencia o ausencia) de secuencias específicas de DNA de diferentes fuentes e identificar el tamaño del fragmento de restricción que contiene la secuencia (13).
- **Northern Blot:** Es una técnica de laboratorio que se utiliza para identificar y localizar las secuencias de RNAm que son complementarias a un fragmento de DNA o RNA llamado sonda. Es básicamente una prueba para detectar la presencia del RNA mensajero en un tejido en particular y la cual permite también determinar el tamaño de la transcripción de ese ARN mensajero. El procedimiento se hace transfiriendo todo el RNA mensajero de un tipo determinado de tejido desde un gel a una membrana de nylon o nitrocelulosa. La presencia de un ARN en particular se detecta hibridizando

esta membrana con una sonda de ácido nucleíco, generalmente de cDNA o rRNA del gen de interés (13).

- **Western Blot:** Es una técnica inmunoenzimática que se utiliza para la detección de proteínas. Se basa en la separación de las proteínas de una muestra en función del tamaño mediante una electroforesis en condiciones desnaturalizantes y una detección posterior con anticuerpos específicos contra la proteína que se desea detectar, permite determinar el contenido relativo de proteínas presente en diferentes muestras (56).
- **Dot Blot:** Es proceder similar al Northern con la diferencia de que el RNA no es sometido a electroforesis sino que se sitúa directamente sobre la membrana. Este tipo de análisis requiere de un molde asociado a succión con vacío para colocar el RNA que puede producir círculos o puntos. Esta prueba es muy útil para estudiar un gran número de muestras, pero tienen la limitante de no ofrecer información sobre el tamaño de las bandas del RNA hibridado (38).

2.4 Situación mundial de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) de uso agrícola.

En todo el mundo, los cultivos transgénicos son presentados por sus promotores – la industria biotecnológica y los científicos financiados por ella – como la nueva revolución tecnológica que traerá múltiples beneficios para la humanidad: prometen que aumentará los rendimientos en las cosechas y disminuirá el uso de agroquímicos, que producirá cultivos tolerantes a enfermedades, a sequía y suelos salinos, así como alimentos más nutritivos. Anuncian que será la solución para el hambre y la desnutrición en el mundo (25).

Se enorgullecen de que es un fenómeno global porque en 6 años el área cultivada con transgénicos se multiplicó por 30, pasando de 1.7 millones de hectáreas en 1996 a 52.6 millones de hectáreas en 2001 (8), (3).

El debate de los alimentos GM ha combinado dos problemas diferentes. En primer lugar, las cuestiones puramente científicas de si los alimentos GM plantean una amenaza para nuestra salud o el medio ambiente. En segundo lugar, existen cuestiones económicas y políticas centradas en las prácticas agresivas de las compañías internacionales y los efectos de la globalización (18), (22).

Una valoración significativa del alimento GM debería basarse en consideraciones científicas, no políticas ni económicas. A pesar del interés por el impacto de las empresas multinacionales se ha señalado una polémica sobre los alimentos GM ya que es un rasgo de las sociedades para las que la alimentación no es una cuestión vital (18).

La función más importante de los alimentos GM reside en la salvación que ofrecen a las regiones en vías de desarrollo, donde los altos índices de natalidad y la presión para producir en una tierra de labranza de existencia limitada conducen a una utilización excesiva de pesticidas y herbicidas de efectos devastadores tanto sobre el medio ambiente como sobre los agricultores que los emplean; donde las deficiencias alimentarias constituyen una forma de vida y con demasiada frecuencia, de muerte; y donde la destrucción de un cultivo por una plaga puede ser una verdadera sentencia de muerte para los agricultores y sus familias (63).

La agricultura de OGM es una categoría extensa y posee un rango amplio de aplicación por tal motivo se incluye una seguridad tanto ecológica como comestible. Ecológicamente se refiere al impacto de la agricultura de OGM en el ambiente, especialmente el impacto de la diversidad biológica, en cuanto a una seguridad comestible envuelve la influencia de OGM que no afecten la salud del ser humano (14), (36).

Ante tal situación se debe enfocar la atención de maíz genéticamente modificados por tres razones:

1. El maíz es el primer cultivo genéticamente modificado que ha causado controversia, que este tema fue particularmente resuelto en Europa, con el consentimiento de un permiso para sembrarlo en 1997 (16).

2. El maíz está entre los tres mejores cultivos del mundo (junto con el arroz y trigo) con una producción de 550-600 millones de toneladas en 2001 (65).
3. El maíz es una planta modelo que es asociada íntimamente con otros crecimientos comprendido como planta genética (16).

En muchos países existen en la actualidad comités de especialistas auspiciados por los gobiernos para verificar la seguridad de OMG en la producción alimentaria, los cuales examinan los detalles técnicos concerniente al uso de tales productos por la población; estos comités sólo consideran los hechos científicos y la seguridad del producto (18). Tales comités en la actualidad incorporan, además de expertos científicos relevantes, expertos en temas éticos y de consumo. Mientras que en un principio la preocupación sobre alimentos modificados genéticamente concernía principalmente a aspectos de seguridad alimentaria, en años recientes han llegado a cobrar importancia en el proceso de decisión, otros aspectos de ámbito moral, social o ético (57), (44).

2.5 Uso y comercialización de maíz genéticamente modificado en el mundo y repercusiones para México.

En la década de los setenta, cuando comenzaron a desarrollarse los primeros experimentos de ingeniería genética con microorganismos, muchos biólogos moleculares creían que estos protocolos eran inseguros y que los microorganismos manipulados genéticamente deberían ser contenidos estrictamente para prevenir su liberación al medio ambiente (34).

El miedo fundamental era, y para muchos todavía lo sigue siendo, que los microorganismos manipulados genéticamente pudieran escapar del laboratorio al medio ambiente y producir consecuencias impredecibles y quizá catastróficas (57).

En respuesta a este tipo de preocupaciones, se establecieron normativas para asegurar los protocolos de trabajo y distintos niveles de contención basados en la potencialidad de la posible amenaza. Sin embargo, con el tiempo y las habilidades de manejo técnico, muchas de estas regulaciones se han ido relajando progresivamente en sistemas de bajo riesgo comprobado (57), (42), (29).

El incremento rápido y tremendo en el área global dedicado a las semillas transgénicas ha ocurrido en años recientes; colocando actualmente a EU, Argentina, Brasil, Canadá y China con un cupo del 98% de área plantada mundial con semillas genéticamente modificadas (62).

Anualmente, la Agencia de Agrobiotecnología Internacional ISAAA publica un informe sobre el desarrollo mundial del cultivo de plantas útiles modificadas genéticamente. En 2004, 8.25 millones de agricultores de todo el mundo cultivaron plantas modificadas genéticamente. Por lo que el crecimiento superficial absoluto (7.2 millones de hectáreas) fue por primera vez mayor en los países en vías de desarrollo y emergentes (China, Argentina, Brasil, India) que en los países industrializados. El mayor crecimiento lo registró el maíz transgénico; entre 2004 y 2005, las superficies crecieron un 25%, hasta 19.3 millones de hectáreas. El maíz transgénico se cultiva en Estados Unidos, España, Uruguay y Filipinas (50) (34).

En Europa, sólo España cultiva plantas transgénicas a gran escala (maíz 60 000 hectáreas). En Alemania se ha iniciado el cultivo de prueba del maíz. Cilve James, el presidente de la ISAAA, ve en el maíz el mayor potencial del crecimiento de los tipos transgénicos. Para el año 2015 se prevé el cultivo de plantas transgénicas en 30 países, en una superficie de 150 millones de hectáreas, ya que se parte de la base de que el cultivo de plantas transgénicas seguirá siendo atractivo económicamente en los próximos años. Sobre todo, las especies transgénicas resistentes a los insectos contribuyen a una mejora de los ingresos, ya que reducen las malas cosechas por culpa de los parásitos (50) (21).

Para cultivar plantas transgénicas los agricultores deben cumplir normas especiales. De este modo se evita una mezcla incontrolada con productos convencionales. En el resto del mundo esto es diferente. En 1996, en Estados Unidos se cultivaron las primeras plantas genéticamente modificadas en superficies explotadas por la agricultura. Hasta 2004, sus superficies de cultivo habían aumentado en todo el mundo hasta más de 81 millones de hectáreas. Sobre todo, estas superficies se encuentran en Estados Unidos, Argentina, Canadá y China (50) (55).

Los países de la UE importan aproximadamente 35 millones de toneladas de maíz lo que proporciona materias primas para numerosos ingredientes alimenticios, entrando en contacto con plantas transgénicas modificadas sin que ellos mismos estén modificados genéticamente

(50) (26). La introducción en el mercado de alimentos genéticamente modificados son sujeto de evaluación extensiva debido a los efectos potenciales en la salud del ser humano, incluyendo toxicidad y alergias (9) (42). En la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos de maíz transgénicos liberados al ambiente.

En México el maíz es el alimento principal, el cual ha representado el pasado y el presente tanto en la economía, cultura y agricultura. En contraste con los Estados Unidos y Europa, la fuente comercial de esta semilla corresponde del 1-4% de las semillas cultivadas en México. En 2001, sin embargo se publicó un estudio en *Nature*, reportando la presencia del promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) y del terminador de la nopaline synthase (NOS t) en parcelas de la Sierra Juárez, región del estado de Oaxaca. Esto se debe que no se tiene un monitoreo adecuado de la introducción de transgenes a parcelas tradicionales de maíz debido a la mala organización de las agencias gubernamentales en México (49) (30).

TABLA 3. Principales tipos de maíz transgénico liberados al ambiente.

Material	Características	Fecha de comercialización	Compañía responsable	Origen y certificación del material	Afecta principalmente
2% maíz GM Bt11	Resistencia a insectos (gen CryIA[b]) y tolerancia a glifosato de amonio (gen PAT); 35S pro; NOS 3't	1998	Syngenta	Instituto de Referencia de materiales y certificado de medidas	Alergias en niños
100% maíz GM T176	Resistencia a insectos (gen CryIA[b]) y tolerancia a glifosato de amonio (gen PAT); 35S pro; 35S t	1997	Syngenta	--	Alergias en niños
100% maíz GM T25	Tolerancia a glifosato de amonio (gen PAT); 35S pro; NOS 3't	1998	Bayer Crop Sciences	Servicio nacional de Protección de Plantas (DGPC); no certificado	Población con pacientes con asma-rinitis
100% maíz GM MON810	Resistencia a glifosato (gen CP4EPSPS); 35S pro; NOS 3't	1998	Monsanto	--	Población con pacientes con asma-rinitis

35S pro, promotor del 35S del Virus del Mosaico de Coliflor; 35S t, terminador del 35S del Virus del Mosaico de Coliflor; NOS 3't terminador de *Agrobacterium tumefaciens* de nopaline synthase; DGPC, Dirección General de Protección de Culturas.

FUENTE: Perera, et al., 2002

2.6 Presencia del promotor 35S y T-NOS en eventos comerciales de maíz liberados al ambiente

La detección cualitativa de los eventos transgénicos está basada en la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando primers que reorganicen regulatoriamente la región que se deriva de los promotores del Virus del Mosaico de Coliflor (CaMV) y del terminador de la Nopaline synthase de *Agrobacterium tumefaciens* (T-NOS), ambos elementos son secuencias de DNA natural en hortalizas y microorganismos (62) (30) (10).

El análisis funcional de un promotor requiere del conocimiento de secuencias de nucleótidos en la región regulatoria; una buena visión de esta construcción es realizada bajo tres aspectos: (a) el sujeto promotor tiene la función de análisis; (b) se reporta un gen; (c) se señala el término de la transcripción (59). A comienzos de la década de 1980, Chua y colaboradores en la Universidad Rockefeller aislaron el promotor responsable de la transcripción de todo el genoma del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) que infecta los nabos. El promotor fue nombrado CaMV promotor 35S, ya que se genera una transcripción viral impulsada por el promotor 35S (58).

El promotor 35S es un promotor constitutivo muy fuerte, que provoca altos niveles de expresión de genes en las plantas dicotiledóneas (Figura 10). Sin embargo, es menos eficaz en monocotiledóneas, especialmente en los cereales. Las diferencias en el comportamiento se debe probablemente a diferencias en la calidad y / o la cantidad de factores de regulación (45).

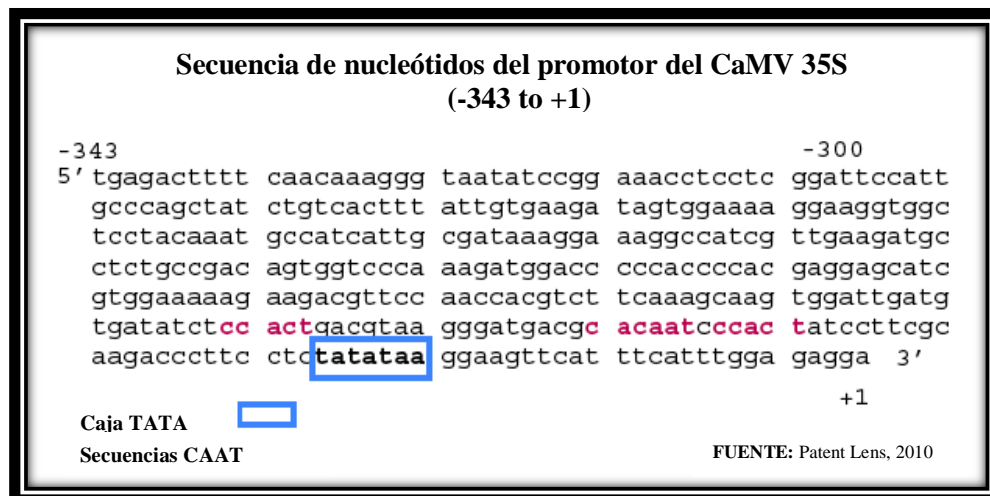


FIGURA 10. Secuenciación del promotor 35S del Virus del Mosaico de Coliflor (CaMV).

El promotor responsable de la transcripción de otra parte del genoma de CaMV, el promotor 19S CaMV, también se utiliza como un promotor constitutivo, pero no es tan ampliamente utilizado como el promotor 35S (45) (10).

El uso de los organismos transgénicos debe hacerse a partir de un riguroso análisis de los riesgos que puedan representar para el medio ambiente, la biodiversidad y la salud humana. El análisis de riesgo es una técnica aplicada en muchas áreas diferentes con el propósito de prevenir y minimizar efectos adversos y abarca tres etapas: la evaluación del riesgo, el manejo del riesgo y la comunicación del riesgo. La evaluación de los riesgos derivados del uso de OGMs debe considerar distintos ámbitos, particularmente el medio ambiente y la salud humana. Aunque comúnmente no se evalúan explícitamente los riesgos relacionados con actividades socioeconómicas y culturales, éstos también pueden jugar un papel importante en la toma de decisiones (43) (41).

Algunos de los factores que van a influir en los niveles de riesgo se relacionan con la modificación genética y cómo se llevó ésta a cabo, con el organismo modificado y con el ambiente en donde se pretende liberar. Por lo anterior el análisis de riesgo debe hacerse “caso por caso y paso por paso”, considerando en todo momento el trinomio “modificación genética, organismo receptor y medio ambiente de liberación” (43) (19).

La evaluación del riesgo considera sistemáticamente las siguientes cuestiones: ¿cuáles son los daños o efectos adversos que pueden ocurrir?, ¿cuál es la probabilidad de que los daños o efectos adversos ocurran? – con su grado de incertidumbre asociado–, si los daños o efectos adversos ocurren ¿cuáles son las consecuencias? y, con base en la detección de los posibles daños y efectos adversos, su probabilidad de ocurrencia y sus consecuencias, ¿cuál es el riesgo total?. Es difícil poder identificar todos los daños o efectos adversos que pueden ocurrir, en parte porque nos enfrentamos aún a niveles de incertidumbre considerables (17).

Sin embargo, resulta un ejercicio ilustrativo identificar y medir algunos de los atributos que pueden estar asociados a posibles efectos adversos, en los diferentes niveles de complejidad biológica (43).

CAPÍTULO 3. MÉTODOS PARA LA AUTENTIFICACIÓN DE ALIMENTOS

3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

3.1.1 Fundamento de la técnica de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que ha revolucionado el modo de manipular, clonar y detectar fragmentos de DNA, lo que ha valido a su descubridor K. B. Mullis el Premio Nobel, trabajando para la Cetus Corporation. La PCR parte de la premisa de que el DNA bicatenario puede desnaturalizarse, de manera que ahora en cada una de sus hebras pueden alinearse unos oligonucleótidos diseñados para ser complementarios a porciones de cada una de las cadenas. Cuando estos oligonucleótidos se sitúan en extremos opuestos de una región particular, pueden servir como cebadores para una DNA polimerasa, lo que permite formar una porción de DNA bicatenario definida por estos dos cebadores (10), (33).

La repetición de los ciclos de desnaturalización, alineamiento (hibridación) y polimerización (elongación) es capaz de producir cantidades crecientes del producto, resultando una amplificación de orden exponencial de la secuencia enmarcada por los cebadores. Por lo que, bastaría una cantidad muy pequeña de DNA molde para obtener una gran masa tras la PCR; se ha utilizado para amplificar un gen partiendo de una única célula o de una única molécula de DNA molde (10).

En la Figura 11 se ejemplifica la descripción anterior. El número de copias al terminar la PCR se puede estimar como:

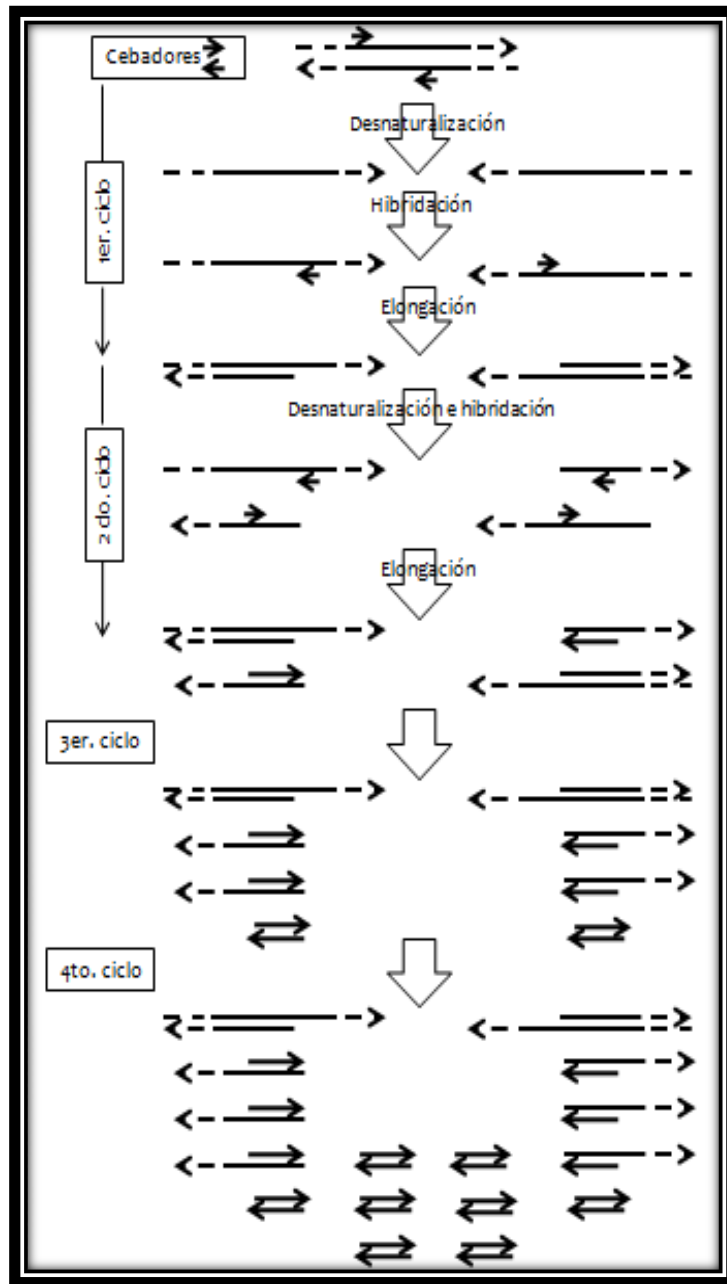
$$N = N_o \times (1 + R)^c \dots\dots\dots (1)$$

c = es el número de ciclos.

N = es el número de copias obtenidas,

N_o = es el número de copias que se han depositado en la reacción inicialmente,

R = es el rendimiento de cada ciclo exponencial en tanto por uno (normalmente debe oscilar entre 0.7 y 0.85)



FUENTE: Teji3n, et al. 2005.

FIGURA 11. Esquema de la amplificaci3n de una mol3cula de DNA molde en los ciclos de la PCR.

Los principios de la amplificaci3n in vitro en las l3neas de repetic3n son en tres procesos: desnaturalizaci3n, hibridaci3n y elongaci3n (60).

3.1.1.1 Desnaturalización

Un comportamiento característico observado en las disoluciones de DNA, cuando son calentadas a partir de 80° o sometidos a pH ácido o alcalino, es una repentina pérdida de viscosidad, acompañada de un aumento de la absorbancia a 260 nm; éste fenómeno se denomina desnaturalización o fusión por que tiene lugar bruscamente, a partir de una temperatura determinada. Se produce a causa de la rotura de los enlaces de hidrógeno que mantiene apareadas a las bases nitrogenadas y de la alteración de las interacciones hidrofóbicas entre ellas, lo que conduce a una separación total o parcial, de los filamentos de DNA, obteniéndose hebras separadas en toda su extensión (desnaturalización total) o en parte (desnaturalización parcial), sin que se vea alterado el esqueleto covalente formado por los enlaces entre el ácido fosfórico y la desoxirribosa (60).

No todas las moléculas de DNA experimentan el fenómeno de la desnaturalización de igual manera, ya que depende de la composición de las bases. Las cadenas con una alta proporción de pares G-C muestran una temperatura de fusión más elevada que las poseen proporciones inferiores. La temperatura de fusión del DNA, en la mayoría de las especies, varía entre 70°-100°, cuando la proporción de G-C sobre el total de nucleótidos aumenta entre el 20%-80%. De ello se deduce que las regiones en la cadena de DNA, ricas en pares A-T, son las primeras en desnaturalizarse (60).

3.1.1.2 Hibridación

Cuando la temperatura desciende por debajo de la de fusión, las hebras de DNA desnaturalizadas tienen la oportunidad de aparearse nuevamente. Este fenómeno, conocido como hibridación o annealing, reproduce la cadena original intacta y tiene lugar rápidamente cuando la desnaturalización no es completa, permaneciendo, como mínimo, un segmento de algo más de una docena de nucleótidos de dúplex original (60).

Cuando la desnaturalización es completa la hibridación tiene lugar en dos fases, una primera muy lenta que forma al azar un fragmento corto en doble hélice y, posteriormente una segunda

fase más rápida de apareamiento a partir del fragmento inicial, reproduciendo finalmente la doble cadena completa. El apareamiento de hebras complementarias responde a un proceso cooperativo en el que intervienen interacciones hidrofóbicas y establecimiento de puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas, siguiendo una ley de complementariedad, pero en ningún caso tiene carácter específico siendo independiente de la procedencia del DNA (60).

3.1.1.3 Elongación

Llevando la disolución a una temperatura adecuada y en presencia de un gran exceso molar de los cuatro dNTPs, la polimerasa elonga el sustrato cebado. En los primeros ciclos se sintetizan largas moléculas, pero en repeticiones posteriores, la elongación empezará a encontrarse limitada por la longitud del molde que, a su vez, aparecerá fijada por el segundo cebador. A medida que se repite el ciclo, la mezcla de productos se enriquece progresivamente en la especie molecular que incorpora en sus extremos a ambos fragmentos cebadores (48).

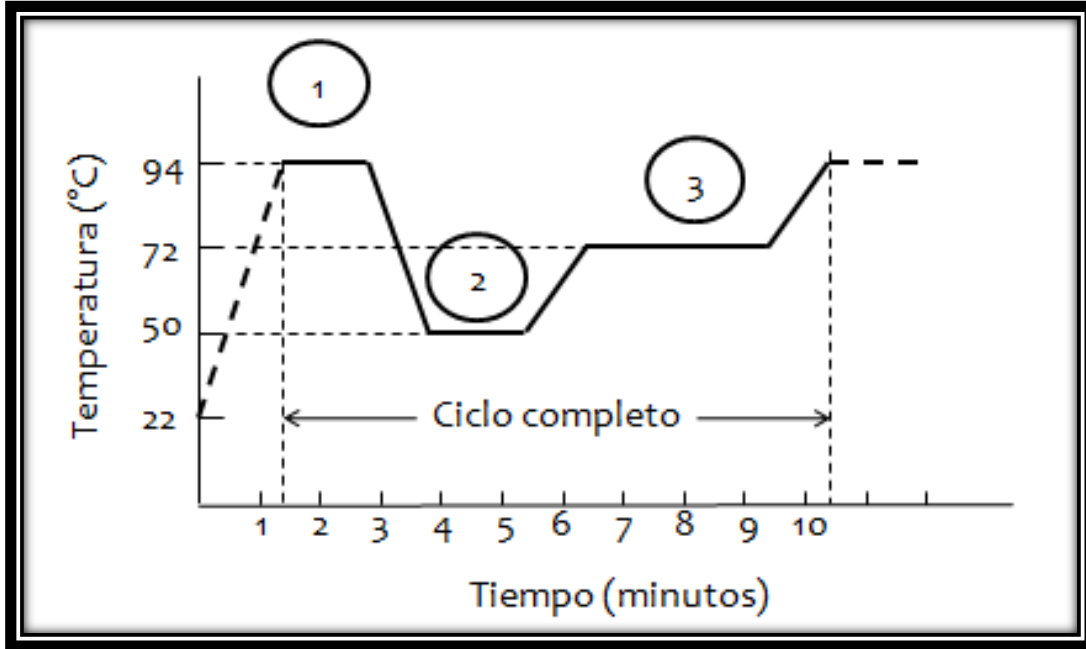
3.1.2 Condiciones de la reacción

La reacción de PCR se lleva a cabo en un volumen de 100 μL y en un medio que contiene:

- Un tampón Tris-HCl que a temperatura ambiente mantiene el pH en un valor de 8.3, y que a la temperatura de polimerización (72 °C) cae hasta 7.2
- Sal (KCl) e iones Mg^{2+} ; aunque su concentración óptima es muy baja, el Mg^{2+} es esencial para la reacción, lo que obliga a evitar la presencia de EDTA en las disoluciones de otros componentes.
- Una mezcla de los cuatro dNTPs, a una concentración saturante.
- Los dos oligonucleótidos cebadores, también en exceso.
- El DNA molde.
- La DNA-polimerasa *Taq* (48).

Las condiciones típicas para la reacción de amplificación se pueden observar en la Figura 17, en la cual se identifican los tres procesos antes mencionados:

- 1 minuto a 94 °C, para provocar la desnaturalización del DNA.
- 2 minutos a 50 °C, para provocar la unión de los cebadores al molde.
- 3 minutos a 72 °C, para que la polimerasa catalice la elongación de cebador (48).



FUENTE: Perera, et al. 2002

FIGURA 12. Condiciones de temperatura en un ciclo estándar de PCR. (16)

A duración de cada etapa debe corregirse para incluir el tiempo necesario para que la mezcla alcance la temperatura fijada, tiempo que depende de muchos factores (fuente de calor, volumen de la reacción, material del tubo, etc.). La reacción de PCR se ha automatizado: existen aparatos (termocicladores) que pueden programarse para que modifiquen de forma cíclica las condiciones de la reacción de modo que la muestra pueda atravesar repetidamente las tres etapas del proceso de amplificación (48).

El número de ciclos de amplificación depende de la concentración de la secuencia a amplificar en la mezcla en la reacción. La amplificación de una región de copia única del genoma permite su detección directa en un gel de agarosa o de poliacrilamida, requiriendo al menos de 25 ciclos. Si se requiere cubrir un número superior de ciclos, hay que tener en cuenta que la actividad de la polimerasa *Taq* no se mantiene más allá de unos 25 o 30 ciclos, y puede ser necesario reponerla con enzima fresca (48).

3.1.3 Componentes de la reacción

1. Cebadores

La especificidad y la estabilidad del híbrido formado entre la hebra molde y los cebadores es crucial para el resultado de la reacción de PCR. A la hora de diseñar la estructura de estos últimos es necesario atender a diversos factores:

- La longitud de los oligonucleótidos utilizados para cebar la reacción de PCR suele ser del rango de 15 a 30 nucleótidos. Cuanto mayor sea su tamaño, mayor es la probabilidad de que se asocien a secuencias no perfectamente complementarias y conduzcan a la amplificación de productos no específicos; para las mismas condiciones de la reacción, cuanto más corto sea el cebador, más perfecta tiene que ser su complementariedad con el molde, y más específica será la amplificación, aunque su unión al molde es más débil y conduce a un rendimiento menor (48).
- La composición de bases de los cebadores es importante por el efecto que tiene sobre la estabilidad del híbrido; lo ideal es que tengan un 50% de GC. Si el porcentaje es inferior interesa que tenga una mayor longitud, para evitar una baja temperatura de fusión (48).
- Deben evitarse secuencias con bases repetidas (más de 3 o 4 seguidas), para dificultar uniones no correctas (48).
- Hay que reducir la posibilidad de formación de estructuras bicatenarias no productivas, bien intramoleculares (cebadores con estructura secundaria) o intermoleculares (cebadores parcialmente complementarios entre sí) (48).

- Los cebadores han de estar presentes en la reacción a una concentración adecuada. Su ausencia detiene el proceso de amplificación, pero en cantidad excesiva puede provocar su unión inespecífica y la amplificación de secuencias no deseadas (48).

2. DNA-polimerasa termoestable

La actividad más utilizada hoy en día para la amplificación por PCR es la DNA-polimerasa *Taq*, de la que existen dos formas comerciales: la nativa, purificada de *Thermophilus aquaticus*, y otra modificada por ingeniería genética y expresada en *Escherichia coli* (AmpliTaq^{MR}). En ambas la actividad polimerasa va acompañada de una exonucleasa 5' a 3', pero carecen de exonucleasa 3' a 5' por lo que no son capaces de corregir los errores producidos en la elongación, que resultan incorporados al fragmento amplificado con una secuencia de alrededor de uno por cada 10⁴ nucleótidos (48).

Sus propiedades son equivalentes y ambas se utilizan en reacciones de PCR. También se comercializan otras polimerasa termoestables, como la polimerasa Vent^{MR}, de *Thermococcus litoralis*, o la polimerasa *Pfu*, aislada de *Pyrococcus furisus*, presentadas como enzimas que introducen menos errores y son, por tanto, más fieles a la amplificación (48).

3. Secuencia a amplificar o secuencia blanco (target sequence)

El DNA portador de la secuencia a amplificar puede incorporarse a la reacción en forma mono o bicatenaria. Aunque su tamaño no es un factor crítico, la amplificación de secuencias presentes en un DNA muy grande produce mejor rendimiento si se fragmenta previamente. Con frecuencia, el material que contiene a la secuencia blanco es DNA genómico preparado a partir de un tejido o cultivo celular (48).

Gracias a la alta especificidad de la reacción de PCR, esta secuencia no ha de ser previamente purificada, a partir de un extracto crudo se consigue fácilmente su amplificación. Salvo por la acción de nucleasas, el DNA es una molécula bastante estable, por lo que se ha logrado amplificar secuencias presentes en muestras de la más extraña procedencia: biopsias

embebidas en parafina hace más de 40 años, muestras de sangre seca almacenada en papel, restos de momias egipcias de varios miles de años de antigüedad (48).

3.2 Limitaciones de la técnica

El gran nivel de amplificación que se consigue a partir de muestras de DNA extraordinariamente escasas, convierte a la PCR en una técnica analítica insustituible. Sin embargo, presenta una importante limitación: produce una alta tasa de errores en la incorporación de dNTPs; la polimerasa *Taq* carece de actividad exonucleasa 3' a 5' y, por lo tanto, de la capacidad para la revisión del nucleótido incorporado y, en su caso, para su degradación y sustitución por el correcto. Esto provoca la incorporación de errores con una frecuencia de alrededor de 1×10^{-4} por ciclo, lo que se traduce en la aparición de un 0.25% de fallos tras 30 ciclos de amplificación. No es un problema grave en ciertos casos, por ejemplo, cuando el objetivo de la reacción es la preparación de una sonda para la detección de una cierta secuencia. Sin embargo, cuando el producto de la amplificación es clonado, el análisis de un clon individual (portador de una molécula individual procedente de la amplificación) no lleva a un resultado que pueda generalizarse, ya que puede contener ciertos errores (48).

CAPÍTULO 4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

4.1 Justificación

En México el maíz presenta una gran importancia debido a su alto valor energético, además es utilizado de muchas formas para generar una amplia gama de productos, por lo que es indispensable para los productores obtener la mejor producción posible. En la actualidad la mayoría de las cosechas de maíz son genéticamente modificadas, esto es con la finalidad de que se obtengan el menor número de mermas y que sobre todo el maíz presente mejores propiedades físicas sin la utilización de fertilizantes o plaguicidas.

El propósito de autenticar maíz tradicional del genéticamente modificado es que en nuestro país aún no se permite la utilización de maíz modificado para consumo humano ni animal, debido a que no se tienen reportadas cuales son las consecuencias que se pueden presentar ante su consumo. Sin embargo, varias industrias alimentarias los utilizan para la elaboración de sus productos y no lo reportan en su etiqueta, para que el producto no sea rechazado por el consumidor; por otro lado, el consumidor tiene derecho de conocer si el maíz o el producto derivado que consume tiene características de un maíz de naturaleza criolla o es genéticamente modificado y ya es bajo su responsabilidad su consumo o no.

4.2 Descripción del Cuadro Metodológico

El objetivo general del trabajo es establecer una metodología experimental para identificar maíz transgénico y criollo, aplicando la técnica de PCR, la cual se basa en la identificación y amplificación de regiones específicas de DNA para detectar su presencia en productos comerciales que se consumen en México. En la Figura 13 se observa el Cuadro metodológico, el cual esquematiza las actividades a realizar en cada objetivo planteado.

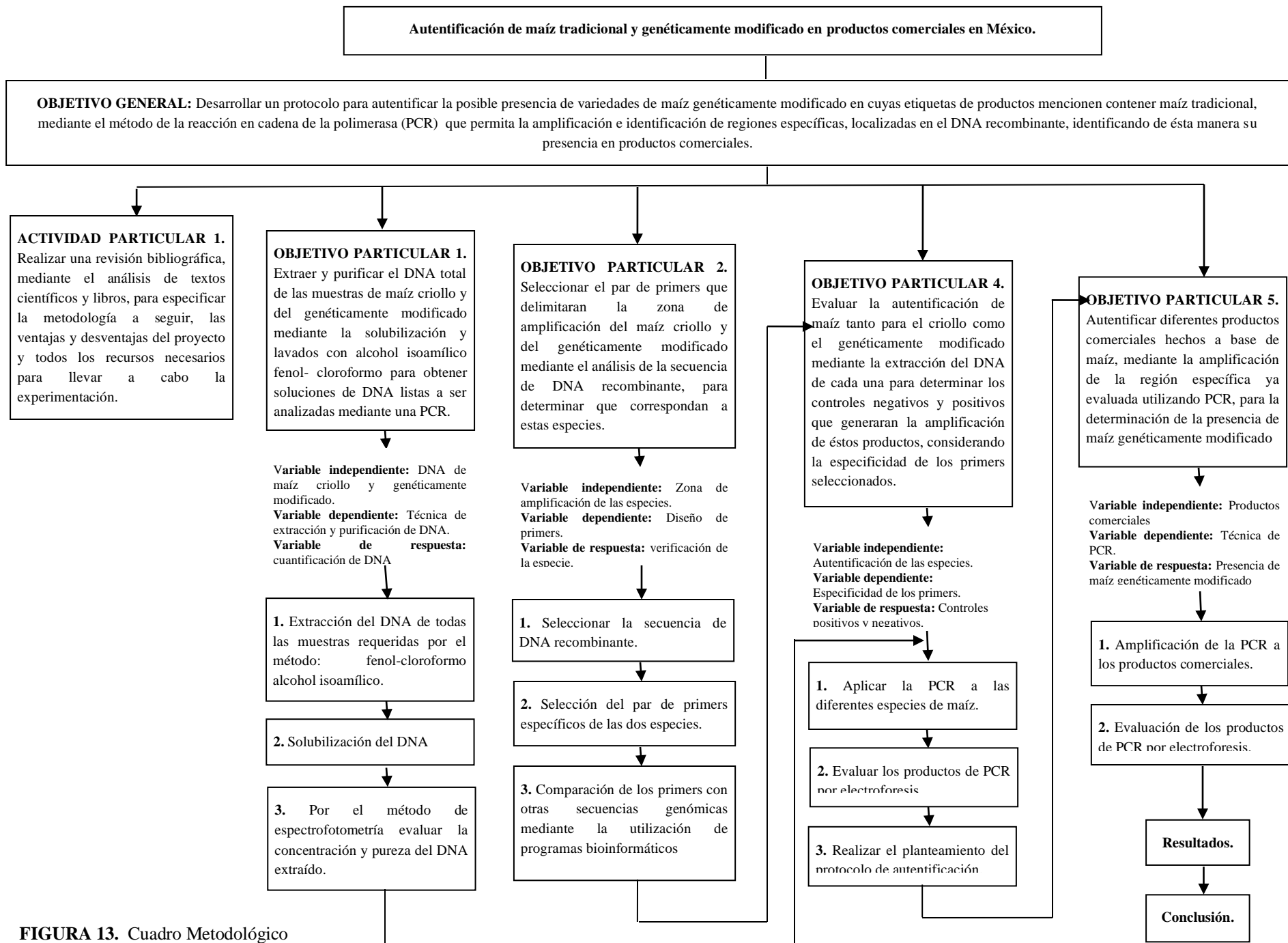


FIGURA 13. Cuadro Metodológico

La metodología del presente trabajo se divide en 4 partes, con el fin de que las actividades que se realicen se desglosen adecuadamente y ordenadamente; la metodología experimental se propone de la siguiente manera:

ACTIVIDAD PRELIMINAR 1. Realizar una revisión bibliográfica, mediante el análisis de textos científicos y libros, para especificar la metodología a seguir, las ventajas y desventajas del proyecto y todos los recursos necesarios para llevar a cabo la experimentación.

OBJETIVO PARTICULAR 1. Extraer y purificar el DNA total de las muestras de maíz criollo y del genéticamente modificado mediante la solubilización y lavados con alcohol isoamílico fenol-cloroformo para obtener soluciones de DNA listas a ser analizadas mediante una PCR.

Variable independiente: DNA de maíz criollo y genéticamente modificado.

Variable dependiente: Técnica de extracción y purificación de DNA.

Variable de respuesta: Cuantificación de DNA.

Actividad 1. Extracción del DNA de todas las muestras requeridas por el método: fenol-cloroformo alcohol isoamílico.

Actividad 2. Solubilización del DNA

Actividad 3. Por el método de espectrofotometría evaluar la concentración y pureza del DNA extraído.

OBJETIVO PARTICULAR 2. Seleccionar el par de primers que delimitaran la zona de amplificación del maíz criollo y del genéticamente modificado mediante el análisis de la secuencia de DNA recombinante, para determinar que correspondan a estas especies.

Variable independiente: Zona de amplificación de las especies.

Variable dependiente: Diseño de primers.

Variable de respuesta: Verificación de la especie.

Actividad 1. Seleccionar la secuencia de DNA recombinante.

Actividad 2. Selección del par de primers específicos de las dos especies.

Actividad 3. Comparación de los primers con otras secuencias genómicas mediante la utilización de programas bioinformáticos.

OBJETIVO PARTICULAR 3. Evaluar la autenticación de maíz tanto para el criollo como el genéticamente modificado mediante la extracción del DNA de cada una para determinar los controles negativos y positivos que generaran la amplificación de productos, considerando la especificidad de los primers seleccionados.

Variable independiente: Autenticación de la especie.

Variable dependiente: Especificidad de los primers.

Variable de respuesta: Controles positivos y negativos.

Para realizar las actividades de este objetivo es necesario seguir las actividades del objetivo 1, ya que de este se obtiene el DNA purificado para posteriormente aplicarlo en PCR.

Actividad 1. Aplicar la PCR a las diferentes especies de maíz.

Actividad 2. Evaluar los productos de PCR por electroforesis.

Actividad 3. Realizar el planteamiento del protocolo de autenticación.

OBJETIVO PARTICULAR 4. Autenticar diferentes productos comerciales hechos a base de maíz, mediante la amplificación de la región específica ya evaluada utilizando PCR, para la determinación de la presencia de maíz genéticamente modificado.

Variable independiente: Productos comerciales.

Variable dependiente: Técnica de PCR.

Variable de respuesta: Presencia de maíz genéticamente modificado.

Actividad 1. Amplificación de la PCR a los productos comerciales.

Actividad 2. Evaluación de los productos de PCR por electroforesis.

Finalmente se evalúan todos los resultados obtenidos para llegar a una conclusión, mediante el análisis de las técnicas utilizadas.

4.3 Materiales

4.3.1 Material biológico

De acuerdo a lo que se describe en el cuadro metodológico, se requirieron de varias muestras objetivo las cuales fueron divididas en dos clases, por un lado las muestras secas y por el otro las muestras procesadas, esto con el fin de que el análisis se realizara de una manera más concreta y sencillas. Las muestras utilizadas se muestran en las Tablas 4 y 5, teniendo un precio aproximado neto de cada uno de ellos y en la Figura 19 se muestran gráficamente las presentaciones de las muestras procesadas.

Las muestras de maíz se obtuvieron de diferentes parcelas del municipio de Coyotepec, Estado de México, ya que en la actualidad aún se cosecha en forma tradicional y a partir de las semillas que se obtuvieron una cosecha antes; las muestras comerciales se obtuvieron de centros comerciales, basándome en la preferencia del cliente hacia el producto.

TABLA 4. Muestras de maíz analizadas.

Muestras secas	Cantidad utilizada (g)	Precio aproximado neto
Maíz criollo blanco	250	\$ 2.00
Maíz criollo pinto	250	\$ 2.00
Maíz criollo azul	250	\$ 2.00
Maíz pozolero	250	\$ 4.00
Maíz palomero	250	\$ 5.00
Maíz azul comercial	250	\$ 4.00
Maíz transgénico CPI	250	---

TABLA 5. Muestras de productos comerciales procesadas a base de maíz que se analizaron.

Muestras procesadas	Contenido neto	Marca	Precio aproximado neto
Fécula de maíz	47 g	MAIZENA	\$ 3.50
Masa instantánea	1 kg	MASECA	\$ 9.85
Corn Flakes	300 g	GOLDEN HILL 'S	\$ 15.50
Corn Flakes	200 g	KELLOGG 'S	\$ 13.80
Tostadas de maíz	108 g	CHARRAS	\$ 7.74
Tostadas de maíz	175 g	MILPARREAL	\$ 10.60
Elotito cultivado	250 g	PASA	\$ 20.89
Maíz pozolero	1 kg	OVAR B	\$ 20.17
Elote dorado	220 g	LA COSTEÑA	\$ 5.50
Fritos	68 g	SABRITAS	\$ 4.50
Mexicanitas	160 g	GAMESA	\$ 10.00
Palomitas para microondas	85 g	ACT II	\$ 7.29
Señor Maíz	100 g	GOURMET	\$ 24.40
Tostitos	380 g	SABRITAS	\$ 30.00
Tiritas fritas de maíz	300 g	OVAR B	\$ 22.80
Empanizador	160 g	KELLOGG 'S	\$ 11.40
Hojuelas de maíz	600 g	BASICOS	\$ 25.65
Crema de elote	78 g	KNORR	\$ 15.00



FIGURA 14. Productos comerciales utilizados para analizar la presencia de maíz transgénico.

De cada una de los productos comerciales se tomó una muestra de 50 gramos, los cuales fueron puestos en recipientes secos con tapa e identificados, para las muestras secas se tomaron 10 gramos y se dejaron remojando un día antes de su utilización, esto con el propósito de retirarles el embrión con el cual se trabajó, posteriormente se molieron y homogenizaron. Para las muestras procesadas sólo se molieron aquellas que eran totalmente secas y para aquellas muestras procesadas frescas se congelaron, se molieron y homogenizaron (61), (46).

4.3.2 Reactivos y productos biológicos

A continuación se presentan los reactivos y productos biológicos que se utilizaron en cada método:

Extracción de DNA:

- Agua desionizada o bidestilada con pH de 7.
- Solución de lisis (tris base 50 mM, pH= 8, EDTA 0.1 M, SDS 0.5 %)

- Enzima proteinasa k a concentración de 20 mg/mL marca Qiagen
- Mezcla Fenol – Cloroformo – Alcohol isoamílico, en proporción 25:24:1
- Etanol frío.

Amplificación (PCR):

- PCR Master Mix (50 unidades de Taq DNA polimerasa, 400 µM de cada Dntp Y 3mM de MgCl₂).
- Agua libre de nucleasas.
- Pareja de Primers producidos por InvitroGen.

Primers para detectar que pertenece a maíz

F: GAAGGGGGCTGGTTGCTCCG

R: ATGAGGCCGGGTGGGCATCG

Primers para detectar maíz transgénico

CaMV 35S (F): GCTCCTACAAATGCCATCA

CaMV 35S (R): GGATAGTGGGATTGTGCGTC (28)

T-NOS (F): GAATCCTGTTGCCGGTCTTG

T-NOS (R): TTATCCTAGTTTGCGCGCTA (28)

Electroforesis:

- Agarosa marca Gibco ERL, Life Technologies.
- Tris acetato y EDTA (TAE) 1X como solución buffer, pH=8
- Bromuro de etidio en concentración de 10 mg/mL
- Marcadores de peso molecular de 1kb, 50bp y 100bp marca Promega
- Tinte cargador azul/naranja 6X, marca Promega.

4.3.3 Equipo utilizado

- Agitador Vortex marca Lab-Line, modelo Super Mixer 1290

- Balanza Analítica Electrónica Ohaus, modelo AS200
- Calentador para tubos eppendorf, modelo Multi-Block, marca Lab-Line
- Espectrofotómetro marca WPA, modelo UV1101 Biotech Fotometer
- Microcentrífuga refrigerada marca Acrvall RMC 14
- Termociclador marca Perkin Elmer modelo Gene Amp PCR system 2400
- Juego de micropipetas marca Finnpiet de volúmenes desde 0.5 µl hasta 1000 µL
- Cámara de electroforesis horizontal pequeña de 16x4x6.5 cms. (largo x alto x ancho), con un área de soporte de gel de 7.5 x 5 cm. (largo x ancho)
- Fuente de poder marca Biord, modelo Power Pac 1000
- Horno de microondas marca Panasonic
- Transluminador marca Cole Parmer, modelo 9814 series tables
- Equipo de Fotografía para luz UV marca Kodak Digital Science (cámara fotográfica DC40, software: Kodak, Digital Science 1D Versión 2.0.2)
- Autoclave pequeña

4.4 Métodos

Para este punto es necesario contar con los 3 pares de primers con los que se llevará a cabo la reacción, esto llevará a la obtención de un buen amplificado. Estas parejas de primers se obtuvieron mediante una revisión bibliográfica y posteriormente fueron verificados en un programa bioinformático: Mitomap, mostrando una excelente afinidad con la especie de interés, utilizando sólo una parte de la metodología reportada por Karamollaoglu, et al., 2009.

Los primers que detectan maíz fueron diseñados mediante el programa bioinformático: Mitomap (ver Anexo 1); y los primers para detectar maíz transgénico para las dos opciones fueron obtenidos de un artículo: Biosensores con microbalanza basados con cristal de cuarzo para la detección de DNA de organismos genéticamente modificados, obtenida de la revista de Ingeniería Bioquímica, los cuales fueron analizados para comprobar que si podrían amplificar para las zonas esperadas en este proyecto.

4.4.1 Extracción de DNA total a partir de tejido muscular

Para la extracción de DNA de las muestras de alimentos se utilizó un protocolo descrito por Sambrook, J. (2001) que está basado en la disolución del tejido de la muestra usando detergentes y proteinasas, extracción de proteínas y polisacáridos con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico y la precipitación del DNA con etanol (54). El protocolo completo se describe a continuación:

Disgregación del tejido de maíz:

- Enjuagar el tejido con agua estéril y no tocarlo con las manos, usar guantes.
- Dejar remojando los granos de maíz con agua libre de nucleasas aproximadamente 12 horas antes de su utilización.
- Con la ayuda de un bisturí retirar sólo el embrión de cada grano de maíz.
- Moler el fragmento de maíz (embrión) utilizado con mortero.
- Pesar 0.125 g de maíz en un tubo Eppendorff.
- Adicionar 1.25 mL de solución de lisis
- Agitar con vortex hasta que se visualicen pedazos más pequeños.
- Adicionar 7 μ L de enzima proteínasa k previamente concentrada a 20 mg/mL.
- Incubar los tubos a 50 °C en termoblok por 2 horas.
- Desactivar la enzima manteniendo la temperatura del termoblock a 60 °C por lo menos una hora.

Extracción de proteínas y polisacáridos:

- Adicionar al tubo que contiene la muestras, 0.25 mL de la mezcla de fenolcloroformo-alcohol-isoamílico.
- Mezclar el tubo varias veces suavemente.
- Centrifugar a 10 000 RPM por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Separar las fases, recuperar la fase acuosa superior que contiene el DNA. Evitar recuperar cualquiera de las otras fases.

- Trasladar las fases recuperadas a 2 tubos eppendorff nuevas.

Precipitación de DNA:

- Adicionar 1.5 mL de etanol frío a cada tubo.
- Mezclar suavemente (puede aparecer turbidez y luego desaparecer).
- Centrifugar a 10 000 RPM por 10 minutos.
- Decantar el etanol y dejar secar el DNA en incubadora a 31°C colocando los tubos en forma horizontal. El DNA debe visualizarse pegado al tubo como una mancha blanca.
- Una vez eliminado el etanol, se adiciona agua desionizada para recuperar DNA agitando suavemente el tubo hasta si completa la disolución.
- Cuando la solución presenta partículas insolubles, se reintenta la extracción de proteínas y polisacáridos con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se vuelve a lavar con etanol.

4.4.2 Cuantificación de DNA por medición de absorbancia a 260 nm

Este método es útil para detectar cualquier compuesto que absorbe la luz significativamente a 260 nm, ya que se presentan ácidos nucleicos altamente puros, lo cual incluye, DNA, RNA, EDTA y fenol. La relación de absorbancia a 260 nm se utiliza como prueba de contaminación de una preparación de DNA y RNA con proteínas, puesto que los aminoácidos aromáticos absorben la luz a 280 nm. En este caso, sólo un nivel significativo de proteína en la preparación puede causar un cambio significativo en la relación de absorbancia de ambas longitudes de onda.

Para cuantificar la cantidad de DNA, las lecturas se tomaron en una relación de 260/280; ya que la lectura de 260 nm permitió saber la concentración de ácidos nucleicos en la muestra; la relación entre 260/280 nm proporciona un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. Preparaciones puras de DNA tienen valores de 1.8, mientras que valores de 2, muestran la existencia de preparaciones puras de RNA. Si existe contaminación significativa con fenol o

proteínas, la relación 260/280 será menor a 1.8 entonces no puede cuantificar el DNA presente en la solución.

El protocolo utilizado se describe como sigue:

- Se tomó 2 μL de agua libre de nucleasas y se calibró el aparato (Nanodrop)
- Se tomó una muestra de 2 μL de DN, se colocó en el brazo del Nanodrop y se cerró el brazo, dando click en Measure.
- En la pantalla de la computadora se muestran los resultados obtenidos, tanto la gráfica como la relación 260/280 y la concentración a la cual se encuentra.

4.4.3 Ampliación de DNA

4.4.3.1 Preparación de la reacción

Para la preparación de la reacción ha sido fundamental la estandarización de las concentraciones de los componentes (Primers y DNA). Los primers deben ser solubilizados a una concentración de 250 mM, mientras que el DNA requiere una concentración baja puesto que una sólo copia de DNA es suficiente para una adecuada amplificación. La preparación de las muestras para la reacción se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo que precisa Promega de PCR. Los componentes se prepararon en tubos de 25 mL como se muestra en la Tabla 6

TABLA 6. Limites en cantidades necesarias para realizar una adecuada PCR.

COMPONENTE	VOLUMEN	CONCENTRACION FINAL
Mezcla Master Mix	12.5 μL	1X
Primer 1	0.25 – 2.5 μL	0.1 – 1.0 mM
Primer 2	0.25 – 2.5 μL	0.1 – 1.0 mM
DNA	1 – 5 μL	< 250 ng
Agua libre de nucleasas	La necesaria para completar 25 μL	N.A.

Cuando se ajustó la concentración de primer y DNA, el volumen aplicado para el adecuado cumplimiento de la relación fue de 0.5 μL de cada primer y 1 μL de DNA.

Se debe tomar en cuenta que los primers están concentrados, lo recomendable es diluirlos, primero se tomarón 10 μL de los que están concentrados y después se tomarón 2 μL y se disolvieron en 18 μL de agua libre de nucleasas, con estas diluciones se trabajó para la PCR. (Figura 15)

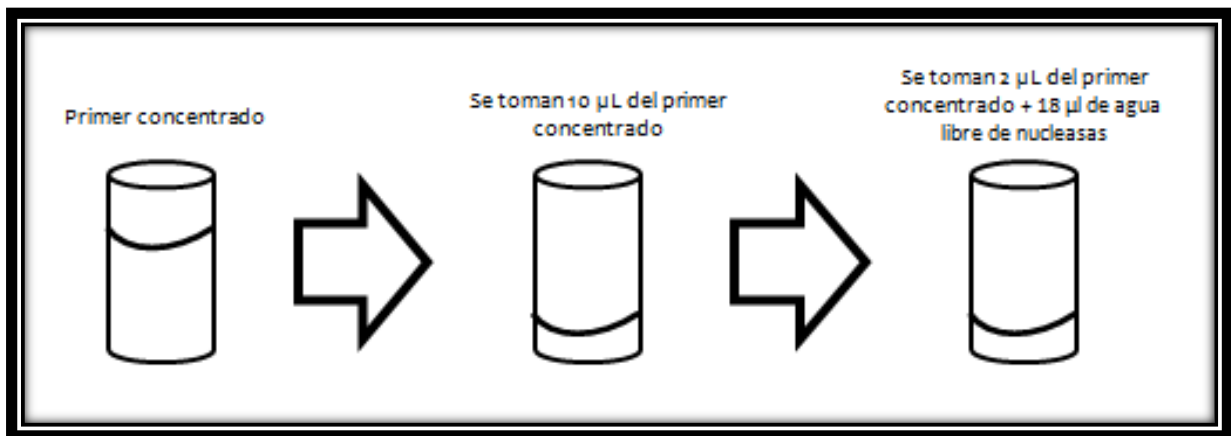


FIGURA 15. Procedimiento para la dilución de primers a utilizar en la reacción de PCR.

4.4.3.2 Etapas y ciclos de la reacción

La programación del termociclador se efectuó de acuerdo a la utilización de cada primer, en donde las condiciones dadas están confirmadas y revisadas para la utilización de la mezcla de Master Mix para PCR (37), (64).

Para la primera pareja de primers que detectó el maíz se realizó a 60 $^{\circ}\text{C}$, pues al calcular la temperatura media se tuvo una temperatura muy elevada, por lo que se decidió realizar la experimentación a una temperatura inferior ya que estos primers fueron diseñados y se tuvo la oportunidad de poder cambiar ciertas condiciones para que se adecuaran al modelo, en la Figura 16 se muestran las condiciones para esta prueba. Teniendo un programa de 30 ciclos con una duración de 1 hora 58 minutos.

$$T_m = (4 (\text{número de G} + \text{número de C})) + (2 (\text{número de A} + \text{número de T}))$$

Para el Primer F:

$$T_m = (4(10 + 4)) + (2(2+4)) = 4(14) + 2(6) = 56 + 12 = 68 \text{ } ^\circ\text{C} \dots\dots\dots (2)$$

Para el Primer R:

$$T_m = (4(11 + 3)) + (2(3+3)) = 4(14) + 2(6) = 56 + 12 = 68 \text{ } ^\circ\text{C} \dots\dots\dots (3)$$

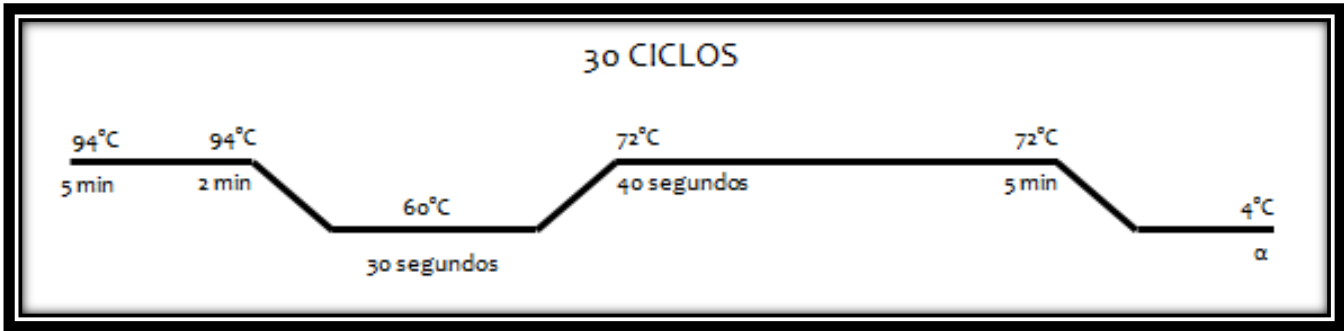


FIGURA 16. Programa de PCR, para maíz.

Para ambas parejas de primers para detectar maíz transgénico, se ocupó un programa de amplificación como lo muestra la Figura 17, ambos se trabajaron con una temperatura media de 60 °C debido a que en ambos casos se presentó una temperatura inferior y una superior por lo cual se adaptó a la temperatura óptima, a diferencia de la anterior este programa se lleva a cabo en un tiempo de 3 horas y 30 minutos, ya que se trabajó con 40 ciclos.

$$T_m = (4 (\text{número de G} + \text{número de C})) + (2 (\text{número de A} + \text{número de T}))$$

CaMV 35S

Para el Primer F:

$$T_m = (4(2 + 7)) + (2(6+4)) = 4(9) + 2(10) = 36 + 20 = 56 \text{ } ^\circ\text{C} \dots\dots\dots (4)$$

Para el Primer R:

$$T_m = (4(9 + 2)) + (2(3+6)) = 4(11) + 2(9) = 44 + 18 = 62 \text{ } ^\circ\text{C} \dots\dots\dots (5)$$

T-NOS

Para el Primer F:

$$T_m = (4(6 + 5)) + (2(2+7)) = 4(11) + 2(9) = 44 + 18 = 62 \text{ } ^\circ\text{C} \dots\dots\dots (6)$$

Para el Primer R:

$$T_m = (4(4 + 5)) + (2(3+8)) = 4(9) + 2(11) = 36 + 22 = 58 \text{ } ^\circ\text{C} \dots\dots\dots (7)$$

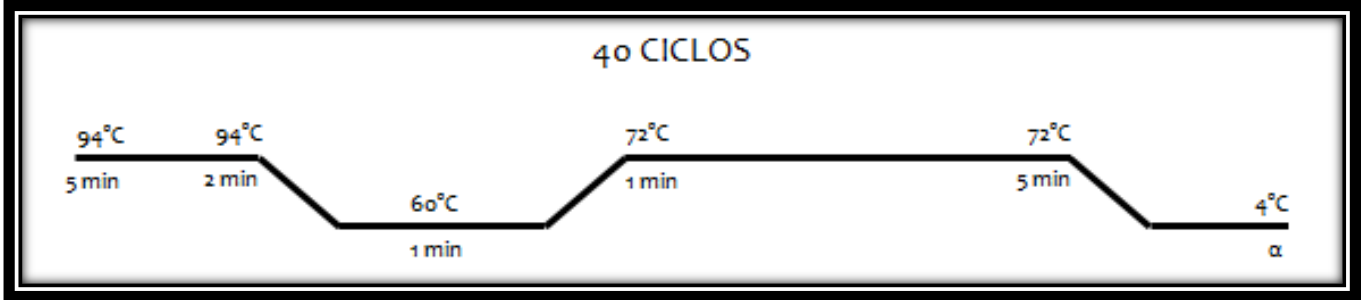


FIGURA 17. Programa de PCR, para maíz transgénico

4.4.4 Análisis de productos

4.4.4.1 Preparación del gel de agarosa

La preparación del gel de agarosa se realizó al 2% y se realizaron geles de 30 mL y 50 mL, para realizarlos se necesitaba la agarosa en polvo, solución TAE 1X y BrEt¹³ en concentración de 10 mg/mL.

El método de preparación del gel sigue el siguiente protocolo:

- Se cerró las aperturas laterales del soporte del gel.
- Se pesó la agarosa y se le adicionó TAE 1X, es preferible que la mezcla se realice en un vaso de precipitados de 200 mL. (Para 30 mL de TAE 1X son 600 µL de agarosa y para 50 mL de TAE 1X son 1000 µL de agarosa)
- En este momento fue preciso pesar la mezcla.
- La mezcla fue calentada en horno de microondas a potencia baja hasta que quedó bien disuelto. (se calentó en lapsos de 10 segundos aproximadamente)
- Se dejó enfriar la mezcla, evitando que se gelificara (aproximadamente 15 minutos).
- Se añadió BrEt¹³ y se mezcló bien (aproximadamente una gota).
- La mezcla se viertió en el soporte cuidando que no se formaran burbujas, si se forman es preciso removerlas. Inmediatamente después se colocaron los peines.

- Se dejó solidificar el gel en una zona nivelada y libre de corrientes de aire.
- Antes de cargar el gel con muestra, se retiró el peine y se colocó el soporte con el gel en la cámara de electroforesis.
- Por último fue indispensable adicionar TAE 1X a la cámara de modo que el gel quedó cubierto.

4.4.4.2 Electroforesis horizontal (carga y corrida del gel)

La técnica de electroforesis horizontal es capaz de separar fragmentos que no pueden ser separados por otros procedimientos. La utilización de agarosa para la separación de moléculas de DNA del tamaño esperado de este estudio, es fundamental, ya que mientras el gel de poliacrilamida puede diferenciar moléculas con un rango de desigualdad de tan sólo 1 pb, no es capaz de soportar moléculas mayores de 500 pb. La agarosa tiene un poder de resolución menor, sin embargo, tiene mayor rango de separación (50 a 20 000 pb).

La resolución y el grado de migración, de los fragmentos de DNA en el gel, dependen en cierto grado, del voltaje aplicado; por lo que la técnica se ha llevado a cabo a 90 V en un gel con una concentración de 2%. Los pocillos del gel se cargaron de acuerdo a los volúmenes que se especifican en la Tabla 7, siguiendo el protocolo:

TABLA 7. Componentes y cantidades necesarias para la preparación de una muestra al realizar una electroforesis.

COMPONENTE	VOLUMEN
BrEt 0.01/ml	3 µL
Blue Orange 6x Loading Dye	3 µL
Muestra o blanco o marcador de peso molecular	5 µL

- En el trozo de parafina se colocaron gotas de colorante (tinte cargador azul/naranja 6x) como número de muestras + blanco + marcador de peso molecular, evitando que se incorporaran burbujas de la gota.
- Posteriormente se añadieron las gotas de BrEt¹³ adjuntas a las gotas de colorante sin que se mezclaran.

- Finalmente se adicionan las gotas de muestra, o agua en el caso de blanco, o marcador de peso molecular. Una a una se mezclaron con los siguientes componentes, se recogió y depositó en el pocillo correspondiente.
- Cuando se ha terminado de cargar el gel, se cerró la cámara y se conectó a la fuente de poder (90V), el cátodo se conectó en el extremo cercano a los pocillos de modo que la molécula mirará hacia el ánodo.
- La corriente duró hasta que el colorante se visualizara cerca del extremo contrario.

4.4.4.3 Fotografías de los geles

Las fotografías de los geles se tomaron utilizando una cámara Kodak DC40 especial para fotografías de geles teñidos con bromuro de etidio e iluminados con luz UV. Estas condiciones son esenciales para el análisis y para la detección del bromuro de etidio intercalado en los fragmentos de DNA presentes en el gel, esto es debido a que la radiación UV es absorbida a 254 nm por el DNA y transmitida al colorante. El colorante unido por si mismo absorbe la luz a 302 nm y 2366 nm. En ambos casos, la energía es remitida a 590 nm en la región rojo-naranja del espectro visible. El gel se fotografía y la imagen se envía a un ordenador que la procesa en el software adecuado (Kodak Digital Science 1D Versión 2.0.2), (Figura 18).

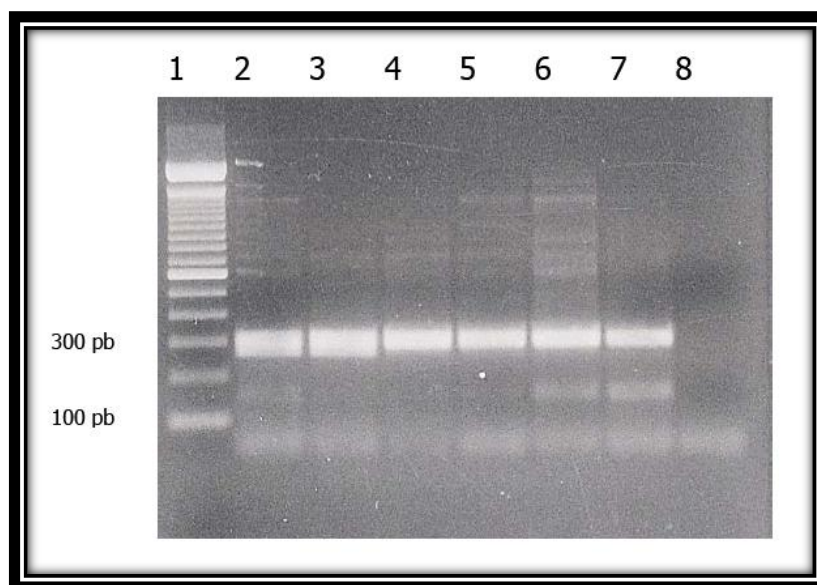


FIGURA 18. Ejemplo de una fotografía de un gel de agarosa, realizado por electroforesis. 1: marcador de peso molecular; 2: control positivo; 3-7: muestras identificando el gen que se busca; 8: control negativo.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Siguiendo los protocolos antes mencionados se obtuvieron los siguientes resultados durante la experimentación:

1. Se trabajó con siete tipos de maíz, a las cuales se les extrajo el DNA total, se les midió la absorbancia 260/280 en el espectrofotómetro Nanodrop, los resultados que se obtuvieron se muestran en la Tabla 8.

TABLA 8. Tipos de maíz, nomenclatura y concentración de DNA, al extraer el DNA total de la muestra.

TIPO DE MAIZ	NOMENCLATURA	RELACIÓN 260/280	CONCENTRACIÓN DE DNA (ng/μl)
Maíz criollo azul	AC	1.53	4 651.4
Maíz criollo blanco	BC	2.08	532.5
Maíz criollo pinto	PC	1.95	2 051.3
Maíz comercial azul	AD	1.99	2 162.8
Maíz palomero	PA	2.02	2 919.6
Maíz pozolero	PO	1.84	2 001.2
CPI	I	1.97	1 871.4

A cada tipo de maíz se le colocó una nomenclatura de dos letras para poder distinguirlas unas de otras, al purificar el DNA de cada muestra se puede observar que existe una posible contaminación de proteínas, aunque se podría haber trabajado con estos valores, se decidió diluir las muestras antes de utilizarlas para que la concentración disminuyera y no se viera afectada cuando se realizara la hibridación con los primers.

Por lo cual en la Tabla 9, se muestran los valores que se obtuvieron tanto de la relación 260/280 y su concentración, partiendo de las muestras anteriores se toman 2 μL y se les adiciona 50 μL de agua libre de nucleasas.

TABLA 9. Tipos de maíz, nomenclatura y concentración de DNA, al diluir 2 μL de DNA y adicionarle 50 μL de agua libre de nucleasas.

TIPO DE MAIZ	NOMENCLATURA	RELACIÓN 260/280	CONCENTRACIÓN DE DNA (ng/μL)
Maíz criollo azul	AC	2.07	1 434.3
Maíz criollo blanco	BC	2.10	325.5
Maíz criollo pinto	PC	2.01	1 450.2
Maíz comercial azul	AD	1.99	1 349.7
Maíz palomero	PA	2.03	1 804.2
Maíz pozolero	PO	1.75	2 309.0
CPI	I	2.02	1 192.7

La concentración se redujo casi a la mitad de lo que se tenía en un principio, a diferencia de la absorbancia ya que aumentaron sus valores, a pesar de esto se decidió trabajar con estas muestras, para que se pudieran manipular mejor, no estuvieran saturadas y se minimizaran posibles errores en la experimentación.

2. Con las concentraciones que se obtuvieron, nuevamente se diluyeron a 60 ng/ μL de DNA, se les vuelve a checar la relación 260/280 y la concentración que tienen finalmente, con esta dilución se trabajó posteriormente para realizar PCR, los resultados se muestran en la Tabla 10:

TABLA 10. Cantidad de muestra diluida en agua, teniendo una concentración aproximada a 60 ng/ μL de DNA.

MUESTRA	μL DE MUESTRA	μL DE AGUA	RELACIÓN 260/280	CONCENTRACIÓN DE DNA (ng/μL)
AC	4	96	1.96	60.9
BC	19	81	2.04	73.5
PC	5	95	2.18	80.6
AD	5	95	1.94	70.7
PA	4	96	2.11	49.1
PO	3	97	2.12	57.3
I	5	95	2.03	60.6

Este paso es elemental, ya que al realizar una PCR adecuada la concentración de DNA no debe presentarse saturada, ya que esto afectaría considerablemente y los amplificadores que se obtendrían no serían los correctos, porque puede que no hibriden con los primers por ser una cantidad mayor a la requerida, ya que como se comentó antes, teóricamente solo se necesita de una pequeña cantidad de DNA para replicar millones de copias del fragmento deseado. Por lo tanto estas muestras son las que se ocuparon para realizar PCR.

3. Para los productos comerciales hechos a base de maíz, también se les extrajo el DNA a cada una de ellas, los resultados se pueden observar en la Tabla 11.

A estas muestras también se les colocó nomenclatura para identificarlas unas de otras, como se puede observar se tomaron 18 muestras, estas fueron analizadas debido a que son productos que más se consumen y que además en su etiqueta declaran ser productos hechos a base de maíz y no se especifica si se utiliza maíz transgénico.

En la Tabla 11 se muestra los valores con los cuales se trabajó tanto de relación 260/280 y la concentración que posee cada uno, los valores se identifican por estar más remarcados; la columna 3 y 4 muestran los primeros resultados que se obtuvieron, las columnas 5 y 6 muestran los valores obtenidos a una concentración de 60 ng/ μ L de DNA, para las muestras F, C, K y A no fue necesario diluir las muestras por lo que las muestras se utilizan con los primeros valores, ya que su concentración es muy cercana a 60 ng/ μ L de DNA, una dilución disminuiría considerablemente su valor y afectaría la hibridación con los primers.

Para cambiar los valores de concentración a 60 ng/ μ L de DNA, se tienen nuevas concentraciones por lo cual se vuelve a revisar los valores de absorbancia, teniendo que en los valores no hay un cambio considerable pero las concentraciones son las requeridas para una buena hibridación con los primers.

TABLA 11. Productos comerciales, nomenclatura y valores de concentración aproximada a 60 ng/μL

MUESTRA	NOMENCLATURA	RELACIÓN 260/280	CONCENTRACIÓN DE DNA (ng/μl)	RELACIÓN 260/280 DILUCIÓN A 60 ng/μl	CONCENTRACIÓN DE DNA (ng/μl)
Fécula de maíz	F	1.67	47.8	-	-
Masa instantánea	M	2.01	349.0	2.03	76.0
Corn Flakes	C	1.76	88.8	-	-
Corn Flakes	K	1.58	77.1	-	-
Tostadas de maíz	H	1.91	256.7	1.90	65.5
Tostadas de maíz	T	2.00	199.3	2.04	62.8
Elotito cultivado	E	1.87	1 033.1	1.86	62.7
Maíz pozolero	P	2.07	1 111.6	2.08	55.6
Elote dorado	D	1.84	245.4	1.92	60.7
Fritos	S	1.99	364.2	1.98	61.0
Mexicanitas	G	1.86	418.2	1.85	90.2
Palomitas para microondas	A	2.13	93.0	-	-
Señor Maíz	J	2.07	1 691.4	2.06	69.9
Tostitos	Y	2.02	388.4	2.03	59.3
Tiritas fritas de maíz	O	1.87	795.1	1.94	62.1
Empanizador	L	1.83	980.3	1.86	55.8
Hojuelas de maíz	B	1.91	752.5	1.88	52.6
Crema de elote	N	2.05	512.8	1.99	66.0

De la tabla 11 se puede observar que algunos valores están más remarcados, esto es para que se identifiquen las muestras con las cuales se trabajó, ya que las ideales son aquellas que su concentración se asemeja a 60 ng/ μ L, por tal razón para la muestra F, C, K, A no fue necesario realizar diluciones por que las muestras al obtenerse el DNA resultaron ser muestras con concentración adecuada para trabajar con ellas. Para las demás muestras fue necesario realizar una dilución que aproximara la concentración a 60 ng/ μ L.

También es importante remarcar que las muestras se trabajaron en un rango de 1.5 a 2.13 de relación 260/280, esto quiere decir que en estos valores se trabajó con ácidos nucleicos, aunque para que esto sea más eficaz los valores deben quedar aproximadamente de 1.8; sin embargo se trabajó con esos datos debido a que si se purificaban más las muestras, por el simple hecho se repetir la metodología de extracción y purificación de DNA con fenol cloroformo alcohol isoamílico y etanol frío, el DNA se degradaba y los valores disminuían considerablemente.

4. Posteriormente se realizó PCR y electroforesis para obtener los geles que a continuación se presentan.

Teniendo en cuenta la metodología para realizar adecuadamente la PCR, las muestras se someten a los programas diseñados en el Termociclador; posteriormente se realizaron los geles de electroforesis tanto para detectar maíz tradicional como maíz transgénico.

ESPECIFICIDAD DE LOS PRIMERS

El primer resultado que se obtuvo fue comprobar que los primers que se diseñaron para la identificación de maíz, sólo amplificaran para esta especie y no para otra, ya que mediante el programa bioinformático se mostraba que tenía una identidad del 100%.

En la Figura 19 se puede apreciar que efectivamente los primers diseñados sólo amplifican para la especie de maíz, ya que se ve claramente una banda en el carril BC.

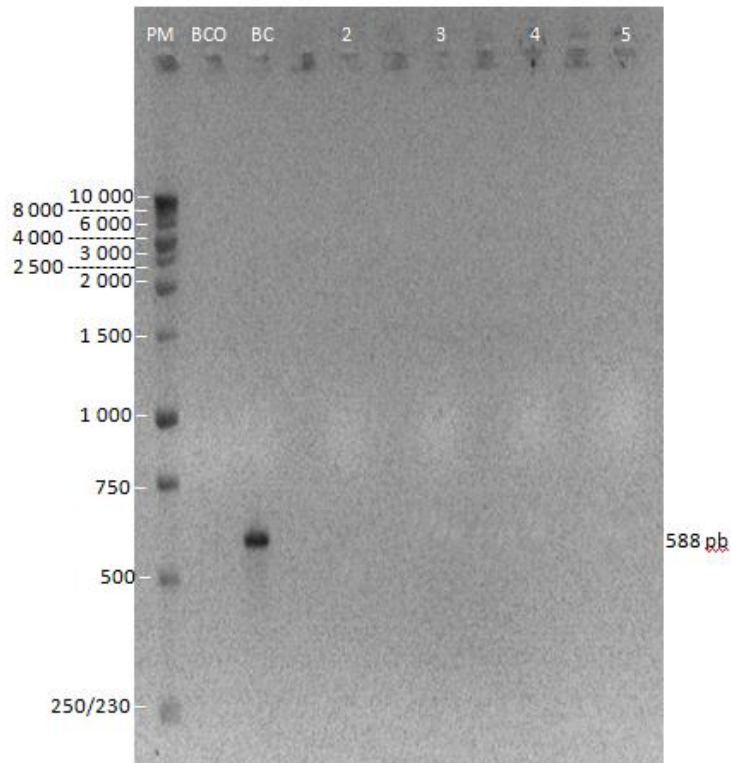


FIGURA 19. Detección de maíz a partir de primers diseñados en un programa bioinformático: MITOMAP, en un gel de agarosa al 2%. (PM) marcador de peso molecular 1 kb; (BCO) muestra que no contiene DNA, control negativo; (BC) maíz blanco criollo, control positivo; (2) vaca; (3) cabra; (4) mojarra; (5) trucha. Se cargaron con 5 μ L de cada muestra.

El gel no presenta contaminación por que el carril del blanco (segundo carril) no tiene ninguna banda visible, por tal motivo al no amplificar en los carriles 2, 3, 4 y 5 que pertenecen al DNA de especies lejanas a maíz, se puede concluir que los primers al ser sometidos a las condiciones de PCR antes descritas son adecuadas para realizar posteriores corridas de gel con diferentes muestras.

El resultado que se obtuvo es positivo porque la banda de amplificación esperada debe ser de 588 pb (Figura 19), se observa que la banda resultante está entre 500 – 750 pb, sin embargo no representa la mitad de estos valores, la banda se encuentra por debajo del valor de 600 pb y por encima de 550 pb. Por lo cual al tener el carril BC con una banda muy visible se toma como control positivo.

AUTENTIFICACIÓN DE MAÍZ TRADICIONAL

Se comprueba que el protocolo de autenticación de maíz tradicional sea verídico para cualquier variedad de maíz, por lo cual en la Figura 20 se sometieron 7 variedades de maíz diferentes para comprobar si se presentaba alguna diferencia entre ellos o si hibridan de la misma forma.

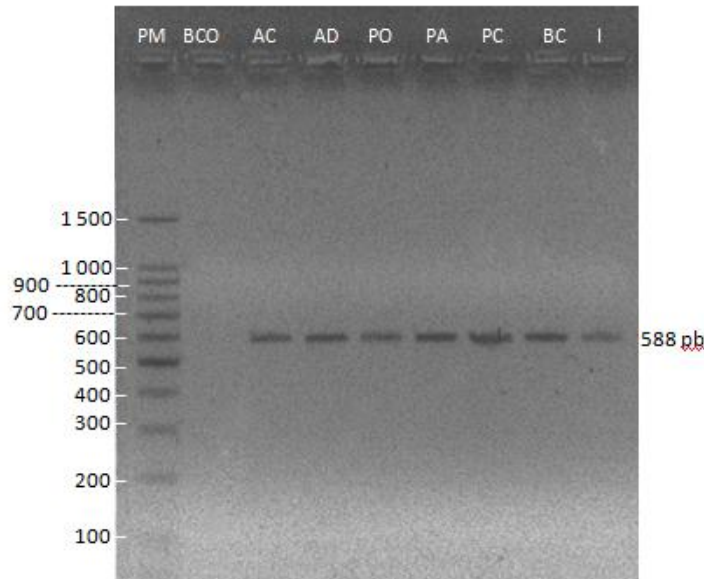


FIGURA 20. Identificación de siete variedades de maíz a partir de primers diseñados para autenticación específica de maíz, en un gel de agarosa al 2%. (PM) marcador de peso molecular 100 pb; (BCO) muestra que no contiene DNA, control negativo; (AC) maíz azul criollo; (AD) maíz azul comercial; (PO) maíz pozolero; (PA) maíz palomero; (PC) maíz pinto criollo; (BC) maíz blanco criollo, control positivo; (I) maíz transgénico. Se cargaron con 5 μ L de cada muestra.

Las 7 muestras se sometieron al mismo programa de PCR de identificación de maíz, al ponerlos en el termociclador se trabajó con 1.0 μ L de DNA para cada muestra. Teniendo como control positivo el carril BC, se observa que las otras 6 muestras también amplifican en la misma posición de 588 pb, para las siete muestras las bandas de amplificación se observan claramente, por tal motivo aunque la intensidad de la banda varía un poco entre ellas, queda comprobada la veracidad de los primers diseñados, ya que la banda de amplificación es la esperada con respecto al fragmento de amplificación del DNA del citocromo b del maíz.

Como el protocolo ya está comprobado con el gel de agarosa anterior, se analizaron las 18 muestras comerciales, para una mejor interpretación se dividen en tres presentaciones con 6 muestras cada uno.

En la Figura 21, se puede apreciar que de las seis muestras colocadas sólo dos de ellas amplificaron, el gel no presenta contaminación, por lo cual se puede decir que para las otras cuatro muestras que no amplificaron se debe a los tratamientos térmicos que han sufrido para su obtención como producto final ya que estos han sido sometidos a procesos con temperaturas superiores a 120 °C y que para obtener el sabor deseado se les han agregado aditivos, saborizantes y conservadores, por lo cual el conjunto de estos factores genera una difícil observación del DNA del producto.

También se le atribuye a que todos los productos comerciales poseen saborizantes y colorantes, los cuales afectan en su composición, en este caso afecta al DNA de cada producto. Aunque la PCR es muy precisa, en estos casos no se puede ver reflejada ninguna banda por que el DNA puede encontrarse dañado o desnaturalizado, ó porque para estos productos no hay presencia de maíz, aunque en su etiqueta este declarado.

Se le realizó una prueba para comprobar que la cantidad de DNA fuera la adecuada, esta constó de variarle la cantidad de DNA (0.5, 1.0 y 1.5 µL) al realizar PCR en el termociclador, sin embargo el resultado fue el mismo, sólo se notan dos bandas (M, P).

En la Figura 22, amplificaron 3 muestras, T y G amplificaron con 1.0 µL de DNA y H amplificó al trabajarla con 0.5 µL de DNA. Para la Figura 23, amplificaron 4 muestras (B, Y, O, N), aun variándoles la cantidad de DNA se visualizaban los mismos resultados.

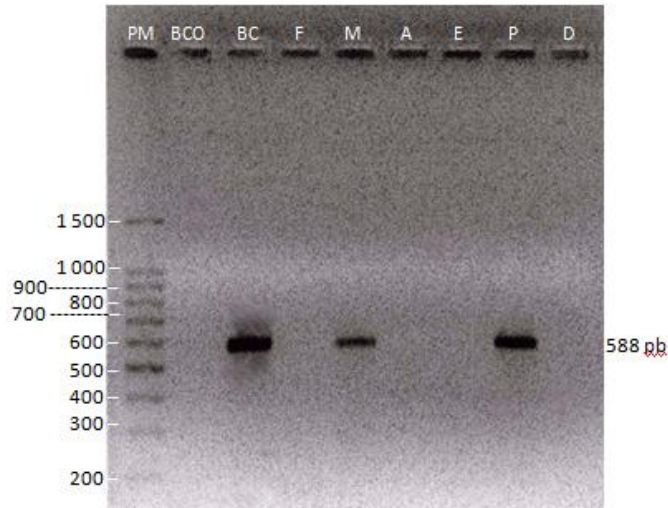


FIGURA 21. Identificación de un primer bloque de seis productos comerciales a partir de primers diseñados para autenticación específica de maíz, en un gel de agarosa al 2%. (PM) marcador de peso molecular 100 pb; (BCO) muestra que no contiene DNA, control negativo; (BC) maíz blanco criollo, control positivo; (F) fécula de maíz; (M) masa instantánea; (A) palomitas para microondas; (E) elotito cultivado; (P) maíz pozolero; (D) elote dorado. Se cargaron con 5 μ L de cada muestra.

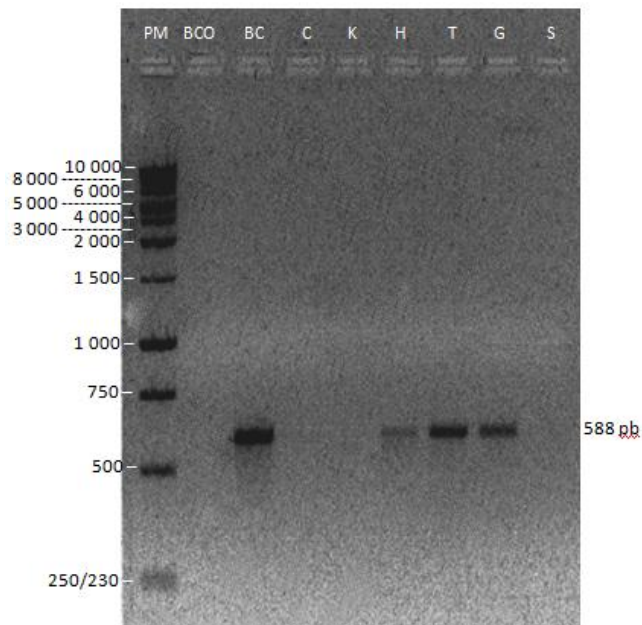


FIGURA 22. Identificación de un segundo bloque de seis productos comerciales a partir de primers diseñados para autenticación específica de maíz, en un gel de agarosa al 2%. (PM) marcador de peso molecular 1 kb; (BCO) muestra que no contiene DNA, control negativo; (BC) maíz blanco criollo, control positivo; (C) Corn Flakes; (K) Corn Flakes; (H) tostadas de maíz; (T) tostadas de maíz; (G) mexicanitas; (S) fritos. Se cargaron con 5 μ L de cada muestra.

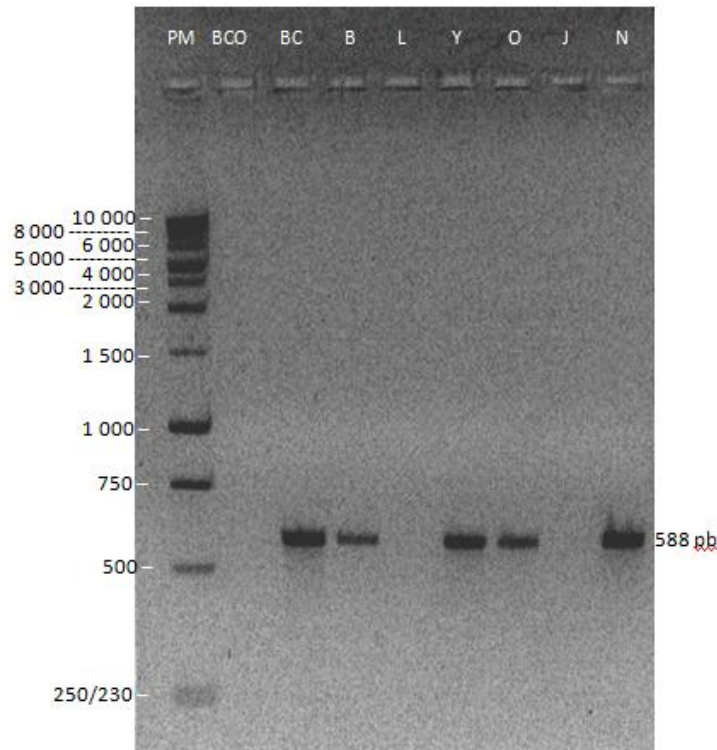


FIGURA 23. Identificación de un tercer bloque de seis productos comerciales a partir de primers diseñados para autenticación específica de maíz, en un gel de agarosa al 2%. (PM) marcador de peso molecular 1 kb; (BCO) muestra que no contiene DNA, control negativo; (BC) maíz blanco criollo, control positivo; (B) hojuelas de maíz; (L) empanizador; (Y) tostitos; (O) tiritas fritas de maíz; (J) señor maíz; (N) crema de elote. Se cargaron con 5 μ L de cada muestra.

Para las tres Figuras anteriores se tomó como control positivo BC, también se puede apreciar que las intensidades de las bandas varían, en algunos casos son más tenues y en otros son muy marcadas.

Como ya se mencionó se varió la cantidad de DNA (0.5, 1.0 y 1.5 μ L), lo ideal es trabajar con 1.0 μ L de DNA, sin embargo aún diluyendo la cantidad de DNA de cada muestra aún se encuentran saturadas, como es el caso de H, al trabajar con menor cantidad de DNA se logró una hibridación adecuada, Cuando se trabajó con 0.5 μ L de DNA a la cantidad de agua se le adicionó 0.5 μ L de agua, para compensar esta cantidad que faltaba. Y al contrario cuando se trabajó con 1.5 μ L de DNA se le quitó 0.5 μ L de la cantidad de agua.

Se pudo observar que al trabajar con concentraciones de 1.5 μL de DNA, los resultados no fueron muy favorables ya que varias de las muestras que ya habían amplificado ya no amplificaron. En total de las 18 muestras comerciales sólo amplificaron 9 muestras, por tal motivo solo se trabajara con estas, para ahora verificar cual posiblemente posee maíz transgénico, sin declarar en su etiqueta poseerlo (Figura 24).

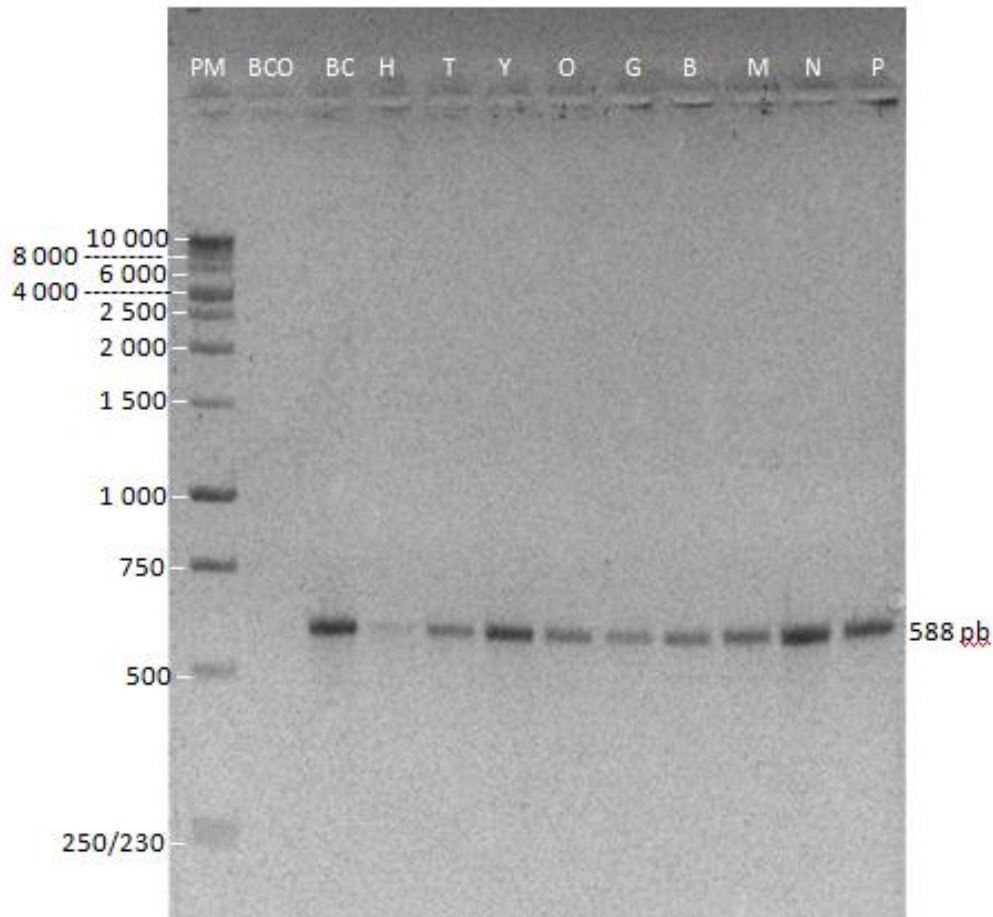


FIGURA 24. Representación de las nueve muestras comerciales que amplificaron con los primers diseñados para autenticación específica de maíz, en un gel de agarosa al 2%. (PM) marcador de peso molecular 1 kb; (BCO) muestra que no contiene DNA, control negativo; (BC) maíz blanco criollo, control positivo; (H) tostadas de maíz; (T) tostadas de maíz; (Y) tostitos; (O) tiritas fritas de maíz; (G) mexicanitas; (B) hojuelas de maíz; (M) masa instantánea; (N) crema de elote; (P) maíz pozolero. Se cargaron con 5 μL de cada muestra.

Teniendo las bandas de amplificación esperadas, el protocolo de autenticación de maíz queda aprobado para su utilización, tanto en este proyecto como en otros posibles proyectos.

AUTENTIFICACIÓN DE MAÍZ TRANSGÉNICO

A continuación se presentan los resultados del protocolo de autenticación de maíz transgénico. En la Figura 25 se muestran los dos controles positivos para ambos transgénicos, la muestra utilizada es la misma para ambos casos, las bandas son de diferente tonalidad ya que uno está en mayor cantidad que el otro. Las bandas obtenidas están en las posiciones esperadas: 195 pb para CaMV y 180 pb para T-NOS.

La muestra obtenida no se sabe específicamente a qué clase de transgénico corresponde, sólo se pudo saber que este tipo de maíz es genéticamente modificado porque se encuentran fragmentos del gene del Virus del Mosaico de la Coliflor y del terminador T-NOS, para ambos genes amplificó, esto quiere decir que posee un poco de los dos, y que la muestra sirve como control positivo y los primers obtenidos son útiles para detectar transgénicos.

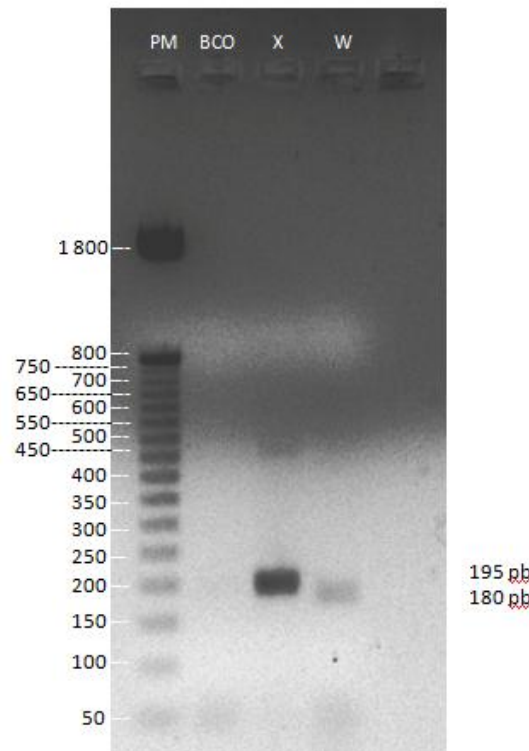


FIGURA 25. Amplificación de CaMV y T-NOS, dos transgénicos comunes en la actualidad experimentados en maíz, en un gel de agarosa al 2%. (PM) marcador de peso molecular 50 pb; (BCO) muestra que no contiene DNA, control negativo; (X) CaMV, control positivo; (W) T-NOS, control positivo. Se cargaron con 5 μ L de cada muestra.

Las Figuras 26 y 27 se pusieron en contacto con las 9 muestras comerciales con las dos parejas de primers de transgénicos, de los cuales se obtuvieron resultados positivos al hibridar con el Virus del Mosaico de la Coliflor, ya que de este se obtuvieron tres bandas visibles, esto quiere decir que el maíz transgénico es utilizado para la elaboración de productos sin hacer mención de esto en su etiqueta. Por el contrario ninguna muestra hibrido con el terminador T-NOS, esto quiere decir que se encuentra en menor proporción que el otro transgénico. Para comprobar que verdaderamente sólo estas tres muestras amplificaron, se realizó también pruebas con 0.5 µL, 1.0 µL y 1.5 µL; y los amplificados fueron los mismos.

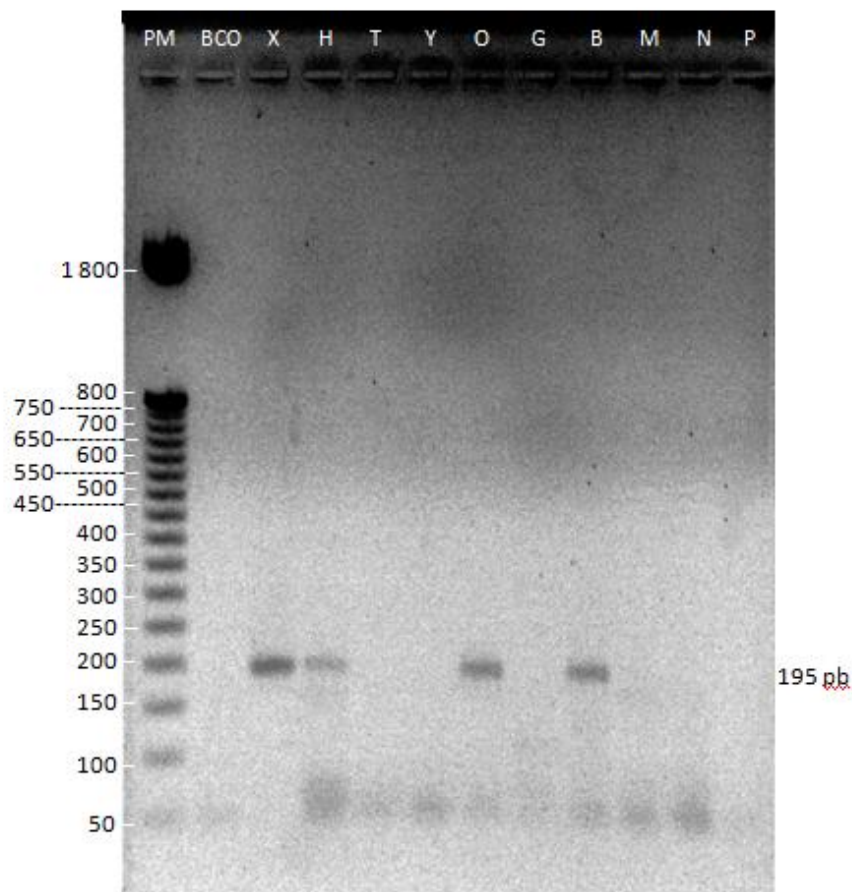


FIGURA 26. Representación de las nueve muestras comerciales hibridadas con los primers que amplifican al transgénico CaMV, en un gel de agarosa al 2%. (PM) marcador de peso molecular 50 pb; (BCO) muestra que no contiene DNA, control negativo; (X) CaMV, control positivo; (H) tostadas de maíz; (T) tostadas de maíz; (Y) tostitos; (O) tiritas fritas de maíz; (G) mexicanitas; (B) hojuelas de maíz; (M) masa instantánea; (N) crema de elote; (P) maíz pozolero. Se cargaron con 5 µL de cada muestra.

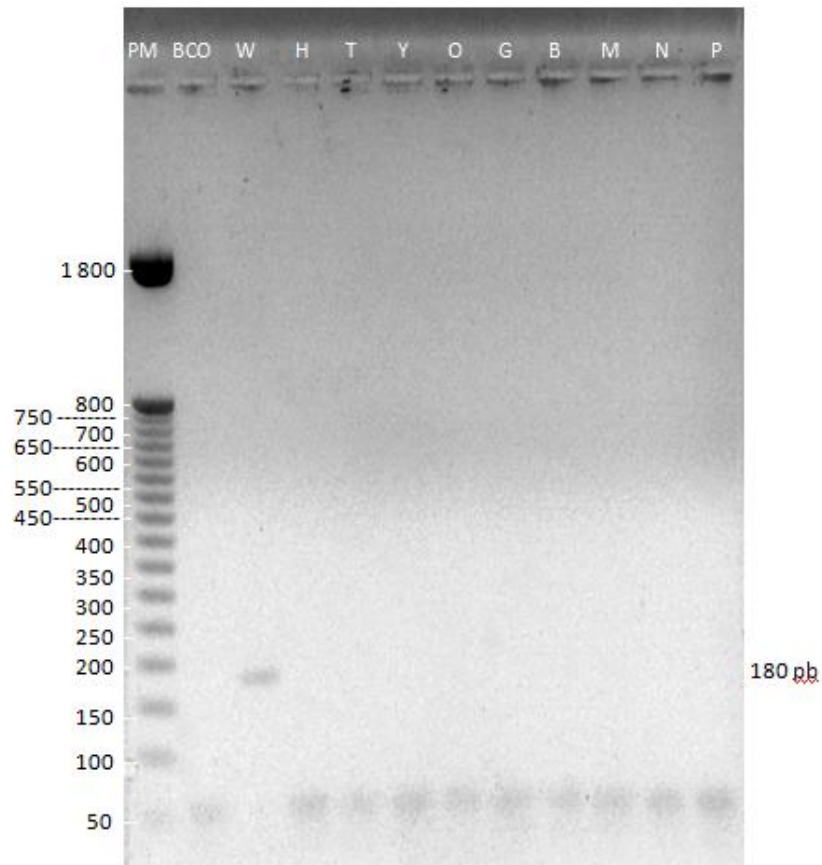


FIGURA 27. Representación de las nueve muestras comerciales hibridadas con los primers que amplifican al transgénico T-NOS, en un gel de agarosa al 2%. (PM) marcador de peso molecular 50 pb; (BCO) muestra que no contiene DNA, control negativo; (W) CaMV, control positivo; (H) tostadas de maíz; (T) tostadas de maíz; (Y) tostitos; (O) tiritas fritas de maíz; (G) mexicanitas; (B) hojuelas de maíz; (M) masa instantánea; (N) crema de elote; (P) maíz pozolero. Se cargaron con 5 μ L de cada muestra.

Variando la cantidad de DNA y realizando el procedimiento en el termociclador y posterior electroforesis, los resultados no fueron favorables ya que para ninguna muestra se observó alguna banda, por lo que se puede decir que el virus del mosaico de la coliflor se encuentra más fácilmente en varios productos, mientras que el terminador T-NOS no lo poseen todos los productos sólo es específico, o también se puede deber a que presenta una degradación debida al proceso del producto y por tal motivo no se visualiza con facilidad.

Teniendo esta parte se puede aprobar el protocolo de autenticación de maíz transgénico, ya que se visualizan las bandas en las posiciones esperadas. Por tal motivo también se verificó que las seis muestras de maíz utilizadas en un principio no presentaron maíz transgénico (Figura 28 y 29), ya que estas muestras fueron obtenidas de parcelas que hasta la actualidad se siguen sembrando y cuidando por campesinos. El objetivo es comprobar que estas parcelas no estén contaminadas genéticamente por alguno de estos transgénicos, teniendo como resultado que para ninguna de los seis muestras se presenta una banda visible que identifique la presencia de transgénico, por lo cual las muestras aún se siguen considerando como criollas.

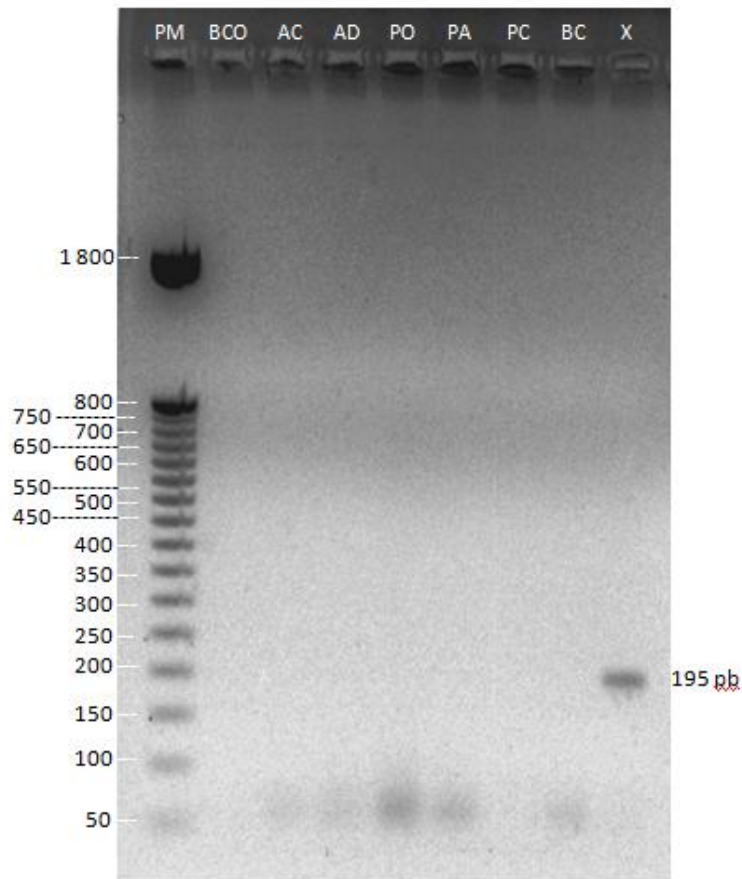


FIGURA 28. Identificación de CaMV en muestras criollas de maíz, en un gel de agarosa al 2%. (PM) marcador de peso molecular 100 pb; (BCO) muestra que no contiene DNA, control negativo; (AC) maíz azul criollo; (AD) maíz azul comercial; (PO) maíz pozolero; (PA) maíz palomero; (PC) maíz pinto criollo; (BC) maíz blanco criollo, control positivo; (X) maíz transgénico. Se cargaron con 5 μ L de cada muestra.

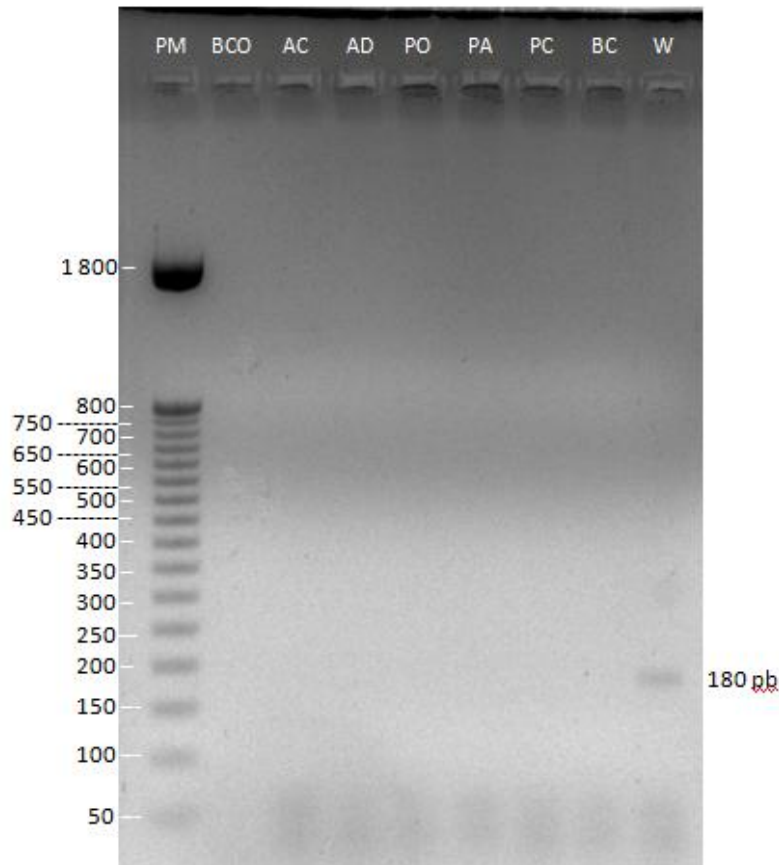


FIGURA 29. Identificación de T-NOS en muestras criollas de maíz, en un gel de agarosa al 2%. (PM) marcador de peso molecular 100 pb; (BCO) muestra que no contiene DNA, control negativo; (AC) maíz azul criollo; (AD) maíz azul comercial; (PO) maíz pozolero; (PA) maíz palomero; (PC) maíz pinto criollo; (BC) maíz blanco criollo, control positivo; (W) maíz transgénico. Se cargaron con 5 μ L de cada muestra.

VERIFICACIÓN DEL PROTOCOLO DE AUTENTIFICACIÓN DE MAÍZ TRADICIONAL Y MAÍZ TRANSGÉNICO

Por último se comprobó que efectivamente los dos protocolos propuestos sean verídicos, así que se trabajó con muestras de maíz del Estado de Chiapas y de Nayarit. Teniendo cuatro muestras para comprobar si existe una posible contaminación genética. Del estado de Chiapas, se tienen 3 muestras debido a que son tres municipios diferentes de donde se obtuvieron las muestras.

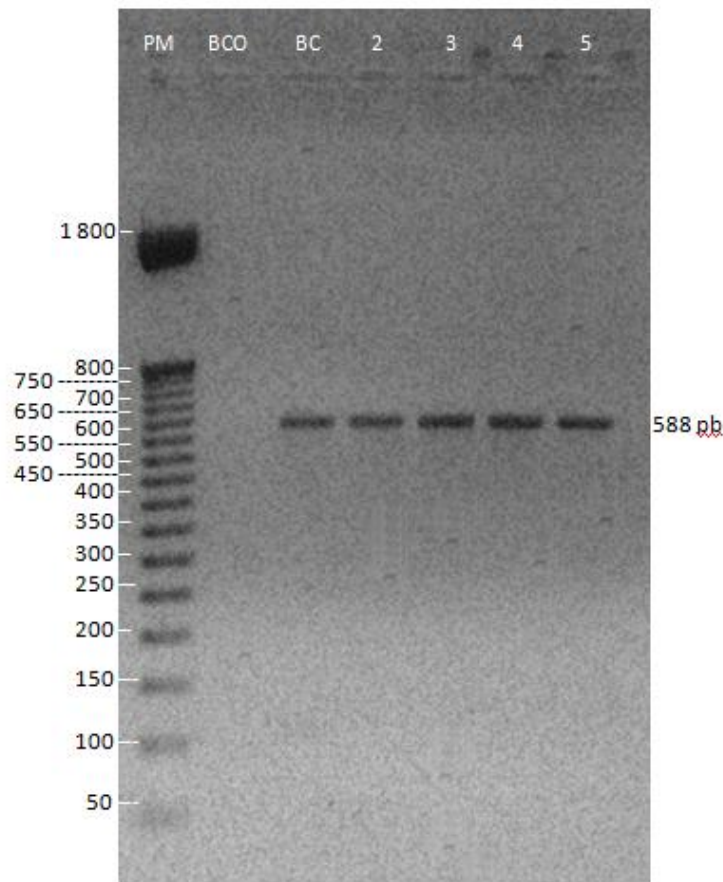


FIGURA 30. Identificación del protocolo de autenticación de maíz para cuatro muestras obtenidas del Estado de Chiapas y de Nayarit, en un gel de agarosa al 2%. (PM) marcador de peso molecular 100 pb; (BCO) muestra que no contiene DNA, control negativo; (BC) maíz blanco criollo, control positivo; (2) maíz de Chiapas: Venustiano Carranza; (3) maíz de Chiapas: Villa Flores; (4) maíz de Chiapas: Chiapa de Corzo; (5) maíz de Nayarit. Se cargaron con 5 μ L de cada muestra.

Como se puede apreciar, las cuatro muestras sólo amplificaron para el gel de la Figura 30, ya que son muestras de maíz, las bandas son muy visibles, claras y amplifican en 588 pb; por otro lado ninguna de las muestras posee alguno de los dos transgénicos, esto es una buena señal de que en México están presentes variedades de transgénicos, pero hasta la fecha se han controlado de alguna manera y aun se siguen conservando las variedades mexicanas intactas.

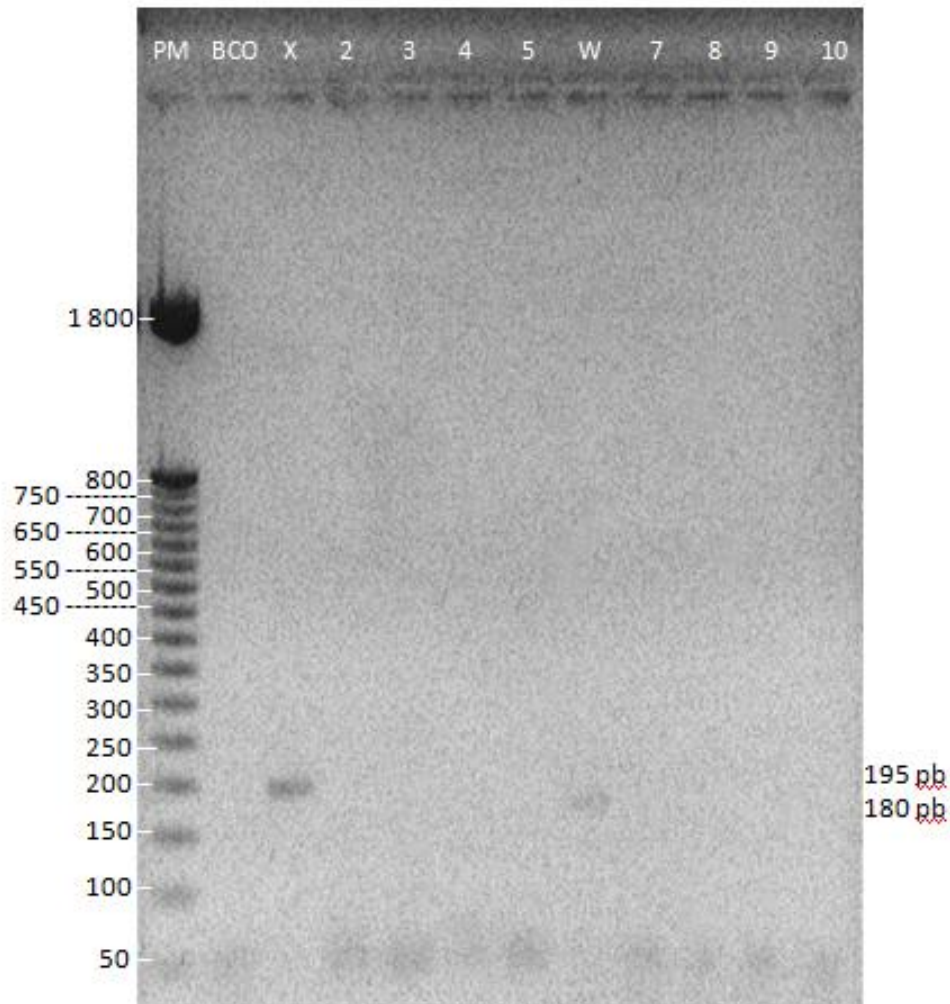


FIGURA 31. Identificación del protocolo de autenticación de maíz transgénico para cuatro muestras obtenidas del Estado de Chiapas y de Nayarit, en un gel de agarosa al 2%. (PM) marcador de peso molecular 100 pb; (BCO) muestra que no contiene DNA, control negativo; (X) CaMV, control positivo; (2) maíz de Chiapas: Venustiano Carranza; (3) maíz de Chiapas: Villa Flores; (4) maíz de Chiapas: Chiapa de Corzo; (5) maíz de Nayarit; (W) T-NOS, control postivo; (7) maíz de Chiapas: Venustiano Carranza; (8) maíz de Chiapas: Villa Flores; (9) maíz de Chiapas: Chiapa de Corzo; (10) maíz de Nayarit Se cargaron con 5 μ L de cada muestra.

En la Figura 31, sólo se observan los controles positivos, cabe mencionar que se hicieron pruebas variando la cantidad de DNA (0.5 μ L, 1.0 μ L y 1.5 μ L) y para ninguna concentración se obtuvo una banda visible, por lo cual se llega a la conclusión de que los protocolos propuestos son capaces de reproducirse mostrando datos verídicos.

CONCLUSIONES

- Para la autenticación de maíz fue necesario la utilización de programas bioinformáticos los cuales fueron de gran ayuda para la elección de las parejas de primers.
- Para extraer la cantidad de DNA de las semillas de maíz es necesario remojarlas, para desprender los embriones, ya que trabajar con el color de cada grano genera varios problemas al obtener la cantidad de DNA, así se evita realizar varias extracciones con fenol-cloroformo.
- Las tres parejas de primers seleccionadas fueron efectivas, ya que fue posible amplificar las bandas deseadas en cada caso.
- Se pudo demostrar que las parejas de primers para la autenticación de maíz transgénico fueron apropiadas, ya que identificaron un fragmento del gen del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) y un fragmento del gen de Agrobacterium Tumefaciens T-NOS, lo que confirma que se trata de un organismo genéticamente modificado. Aunque el gen del virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV), es el que más se utiliza para introducir transgénicos a diferencia del cassette terminador T-NOS.
- En México efectivamente se consumen productos de maíz con presencia de transgénicos y sin embargo en ninguna etiqueta de estos productos mencionan contenerlos, además son productos que se consumen con más frecuencia ya que su precio es económico a diferencia de otros de la misma clase.
- Es posible que en los nueve productos comerciales donde no se obtuvo amplificación, ni del control del gene mitocondrial del citocromo b, ni del fragmento del gene del virus del mosaico de la coliflor, ni del terminador T-NOS, el DNA podría estar afectado a consecuencia de los procesos termicos realizados en este producto.

- De los 18 productos comerciales que se analizaron, sólo 9 de ellos amplificaron con el gen mitocondrial del gen cit-b, donde las bandas se observaban claramente, de las cuales sólo 3 muestras comerciales (tostadas de maíz, tiritas fritas de maíz y hojuelas de maíz) amplificaron con el fragmento del gen del virus del mosaico de la coliflor. Para el caso del terminator T-NOS no se presentaron bandas positivas ya que aun teniendo el control positivo la banda no es muy visible, debido a que se encuentra en menor proporción.
- Se pudo confirmar la utilidad de la técnica de PCR, ya que permite el diseño de una técnica rápida, confiable y específica para detectar la presencia de OGM en productos comerciales. Esta técnica se ha mejorado con el uso de PCR tiempo real que permite realizar cuantificaciones y ahora con el uso de kit de PCR directo que no requiere extracción de DNA previa.
- El hecho de haber detectado la presencia de un fragmento de DNA que no corresponde al maíz, permite concluir que se trata de maíz transgénico, y de acuerdo a la Ley de Bioseguridad de OGMs, que se encarga de llevar a cabo la vigilancia y monitoreo que involucran su detección, todo producto debe declarar en su etiqueta la presencia de transgénicos; sin embargo mediante este estudio nos damos cuenta que en México se consumen productos que en otros países no están permitidos.

ANEXO 1. Diseño de primers a partir de un programa bioinformático: MITOMAP.

Los primers para detectar maíz fueron diseñados, los cuales para su obtención se realizó de la siguiente manera:

- Se accedió a la base de datos de MITOMAP en el genoma de maíz, seleccionándose sólo el fragmento del citocromo B, mediante las siguientes direcciones de internet

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastDescAd

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq

GenBank: AY506529.1: **Zea mays strain NB mitochondrion, complete genome (Zea mays subsp. mays mitochondrion)**

```

gene          310906..312072
              /gene="cob"
CDS           310906..312072
              /gene="cob"
              /codon_start=1
              /product="apocytochrome b"
              /protein_id="AAR91052.1"
              /db_xref="GI:40795008"
              /translation="MTIRNQRFSLKQPIYSTLNQHLIDYPTPSNLSYWWGFGSLAGI
CLVIQIVTGVFLAMHYTPHVDLAFNSVEHIMRDVEGGWLLRYMHANGASMFLIVVHLH
IFRGLYHASYSYPREFVWCLGVVIFLLMIVTAFIGYVPPWQMSFWGATVITSLASAI
PVVGDITVTWLWGGFSVDNATLNRFFSLHLLPLILAGASLLHLAALHQYGSNNPLGV
HSEMDKIASYPYFYVKDLVGRVASAIFFSIWIFFAPNVLGHPDNYIPANPMPTPPHIV
PEWYFLPIHALRSIPDKAGGVAAIAPVFISLLALPFFKEMYVRSSEFRPIHQGIFWL
LLADCLLLGWIGCQPVEAPFVTIGQISSFFFFLFFAITPIGRVGRGIPKYYTE"

310801 aatcttctca tgcagctttt ttcttattca gggcgctgcg aagcatcaag gcaagggggt
310861 aaataaaata agggggaaga ggagttgtca cgatagaaaa gagaatgac tataaggaac
310921 caacgattct ctcttcttaa acaacctata tactccacac ttaaccagca ttaaatagat
310981 tatccaacc cgagcaatct tagttattgg tgggggttcg gttcgttagc tggatattgt
311041 ttagtcatc agatagtgac tggcgttttt ttagctatgc attacacacc tcatgtggat
311101 ctagctttca acagcgtaga acacattatg agagatgttg aagggggctg gttgctccgt
311161 tatatgcatg ctaatggggc aagtatgttt ctcattgtgg ttcaccttca tatttttcgt
311221 ggtctataat atgogagtta tagcagtoct agggaaattg tttggtgtct cggagttgtc
311281 atattcctat taatgattgt gacagctttt ataggatacg taccaccttg gggtcagatg
311341 agcttttggg gagcaacagt aattacaagc ttagctagcg ccataccagt agtaggagat
311401 accatagtgca ctggcctttg ggggtggttc tccgtggaca atgccacctt aaatcgtttt
311461 tttagtctcc atcatttaact ccccttatt ttagcaggcg ccagtcttct tcatotggct
311521 gcattgcac aatatggatc aaataatcca ttgggtgtac attctgagat ggataaaatt
311581 gcttcttacc cttattttta tgtaaaggat cttgtaggtc gggtagcttc tgctatcttt
311641 ttttccattt ggattttttt tgctccaaat gttttggggc atcccagaca ttatatacct
311701 gctaatccga tgcccacccc gcctcatatt gtgccggaat ggtatttccat accgatccat
311761 gccattcttc gcagtatacc tgacaaagcg gggggtgtag ccgcaatagc accagttttt
311821 atatctctct tggctttacc tttttttaa gaaatgtat tgcgtagttc aagttttcga
311881 ccgattcacc aaggaatatt ttggttgctt ttggcggatt gcttactact aggttgatc

```

```

311941 ggatgtcaac ctgtggaggc accatttgtt actattggac aaatttcttc tttctttttc
312001 ttcttgttct ttgccataac gccattocg ggacgagttg gaagaggaat tccaaaatat
312061 tacacggaat agactcatcg caccggatca gtctcttaga cggatgagac tgatcacacc
312121 tgatcagtga tcaattctgg cacaatgaat ttacgagtta ttttacacaa tgaatttaca
312181 agcagatgag gtagacctat ctocctgaaa gagttcagta aacaagggaa cgaagcgacc
312241 gataacgtcc cctcggggag gagaaggat tgacttcggc tcctattatc tttgtttacc
312301 aatcttcaaa ttggtgaatt ggtaaatagg aagtgcgcgc tagcacgctt catatttcta
    
```

- Teniendo el fragmento del citocromo B, se seleccionan alrededor de 771 nucleótidos:

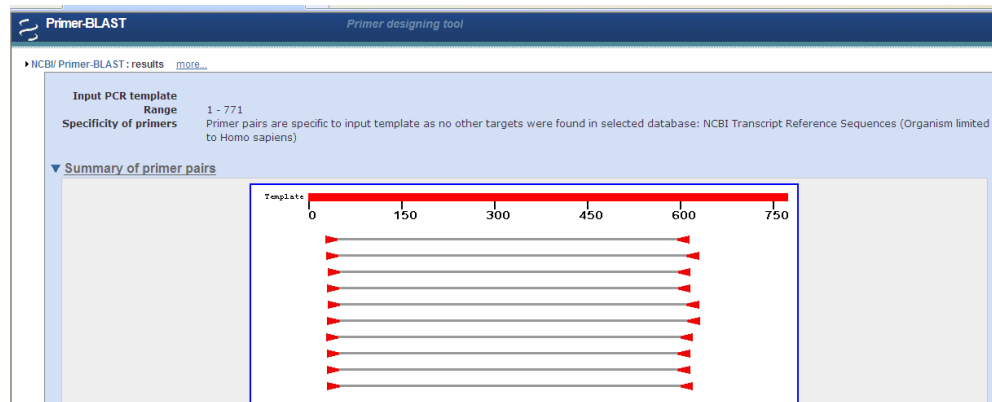
```

acagcgtagaacacattatgagagatgtgaagggggctggttgcctcgttatatgcatgctaatggggcaagtatgtttctcattg
tggttcacctcatattttctggtctatcatcgagttatagcagtcctagggaaattgtttggtgtctcggagttgtcatattcct
attaatgattgtgacagctttataggatacgtaccaccttggggtcagatgagcttttggggagcaacagtaattacaagcttagct
agcgccataccagtagtaggagataccatagtgacttggctttgggggtggtttctcgtggacaatgccacctaaatcgtttttta
gtctccatcatttactccccctatttttagcaggcgccagtccttctcatctggctgcatgcatcaatggatcaaataaccattgg
gtgtacattctgagatggataaaattgcttcttaccctttttatgtaaaggatctttaggtcgggtagcttctgctatctttttcc
atgttgatttttttctccaaatgttttggggcatcccacaattatacctgctaaccgatcccacccgcctcatattgtgccg
gaatggatcttctaccgatccatgccattcttcgagatacctgacaaagcgggggggtgtagccgcaatagcaccagttttat
ctcttggctttaccttttttaaagaatgtatgtgcgtagttcaagttttcgac
    
```

Estos nucleótidos se metieron a un programa bioinformático BLAST



En el cual se obtiene diferentes posibilidades de parejas de primers, aproximadamente son 10 posibilidades, que complenden la región señalada y que son las mejores posiciones de hibridación:



Para este caso se seleccionó la pareja número 7, ya que a diferencia de las otras posibilidades presenta una longitud de 20 aminoácidos para ambos casos y la temperatura media es aproximada a 60°C.

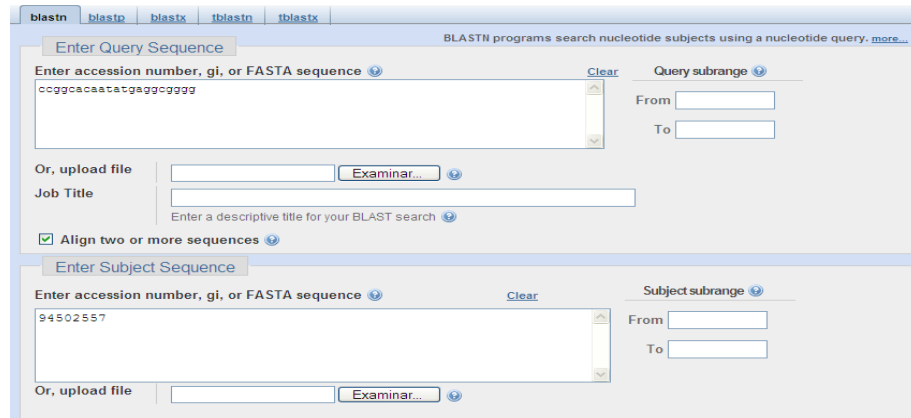
Primer pair 7

	Sequence (5'→3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	GAAGGGGGCTGGTTGCTCCG	Plus	20	30	49	59.69	70.00%
Reverse primer	ATGAGCGGGGTGGGCATCG	Minus	20	617	598	61.30	70.00%
Product length	588						

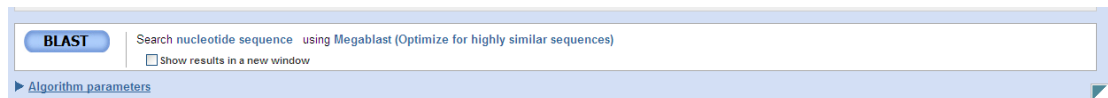
- Teniendo la pareja de primers seleccionados, se procede a su comprobación, para esto es necesario tener como dato el GI, el cual es el número de acceso de cualquier especie, este se obtiene cuando se accesa al genoma de la especie. Para la comprobación se accesa en el siguiente rubro:

Nucleotide BLAST: Align two or more sequences using BLAST

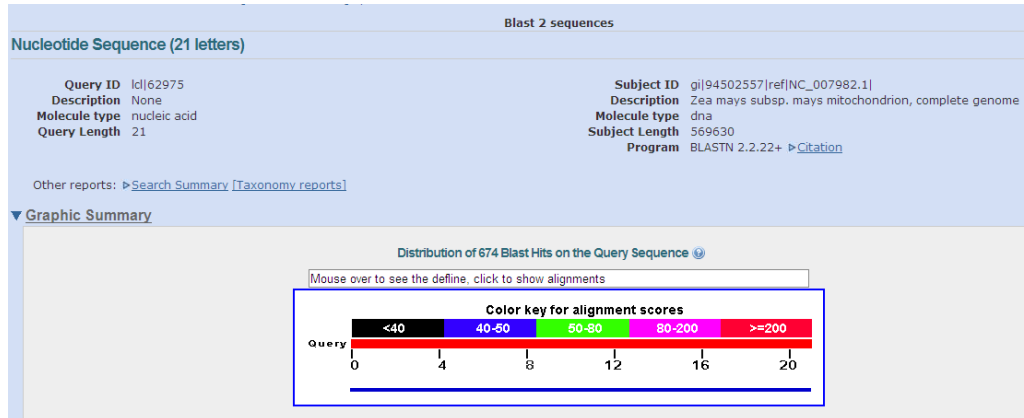
Aparece la siguiente ventana, en el primer recuadro se coloca uno de los primers (forward o reverse), en el segundo recuadro se coloca el GI



Se oprime el recuadro de BLAST, para analizar ambos recuadros



A continuación aparece la siguiente información, en donde debe mostrar los datos de la especie a la cual deben corresponder los primers



Por último debe aparecer la siguiente información, la cual nos indica el porcentaje de identidad de los primers con la especie, para este caso se tiene que corresponden al 100% de identidad, por lo cual los primers son los adecuados, y se mandan a secuenciar a un laboratorio: INVITROGEN.

Sequences producing significant alignments:
 (Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	links
NC_007982.1	Zea mays subsp. mays mitochondrion, complete genome	42.1	1.012e+04	100%	1e-06	100%	

- Una vez que se mandan a secuencias los primers se tiene que resuspender, ya que llegan liofilizados, para esto mediante la hoja de la ficha técnica que manda el laboratorio de elaboración se toma el dato de los nmoles para poder adicionarle el agua necesaria y resuspender adecuadamente. Las operaciones que se realizan son las siguientes:

$$\mu m = \frac{n \text{ moles}}{1000}$$

$$U = \frac{\mu m}{250} = \text{litros} / 10^{-6} = \mu l \text{ de agua libre de nucleasa}$$

Para F: se adicionaron 130.8 μ l de agua libre de nucleasas.

Para R: se adicionaron 129.2 μ l de agua libre de nucleasas

REFERENCIAS

1. Acquaah, G. (2007). *Principles of plant genetic and breeding*. Blackwell Publishing. P.p. 45-65
2. AgroPanorama. (2010). Panorama Global: Producción mundial de maíz 2007/08 (en línea). Consultado 24 octubre, 2010. Disponible en http://www.agropanorama.com/news/001_enero2008/05_28a100/01_global_ProduccionMundialMaiz.htm
3. Álvarez-Baylla, E.R., (2004). Aspectos ecológicos, biológicos y de agrobiodiversidad de los impactos del maíz transgénico. Informe UNAM: Laboratorio de genética molecular, desarrollo y evolución de plantas, Instituto de Ecología. Septiembre; P.p. 1–24.
4. Angonesi, B.F., Ferrari, C., Lehmkuhl, V.L., Maisonnave, A.A., (2005). Nested PCR detection of genetically modified soybean in soybean flour, infant formula and soymilk. *LWT-Food Science and Technology*, 1 – 4.
5. Aréchaga-Ocampo, E., Saenz-Rivera, J., Sarath, G., Klucas, R., Arredondo-Peter, R., (2001). Cloning and expression analysis of hemoglobin genes from maize (*Zea mays ssp. mays*) and teosintle (*Zea mays ssp. parglumis*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1522, 1-8.
6. Appel, M., (2010). Siembra de problemas: Cultivos experimentales en México; Amenaza transgénica. PROCESO, semanario de información y análisis, 1738, 44-46.
7. Bains, W., (2004). *Biotechnology from A to Z*. 3^{ra} ed. Oxford University Press INC. United States of America. P.p. 73-74, 200-2001.
8. Barahona, E.A., Herrera, E.L., Martínez, T.M., Covarrubias, R., Ribeiro, S., López, M.A, Muñoz, R.J., Padilla, A.J., Olivé, M.L, Solleiro, R.J.L., Toledo, M.V.M., Alvarez-Buylla, R.E., Gálvez, M.A., Covantes, T.L., De Ita, R.A., Bolívar, Z.F.G., Fuentes, M.J., Levidow, L., (2004). *Alimentos transgénicos: ciencia, ambiente y mercado (un debate abierto)*. Siglo XXI Editores. Argentina. P.p. 54-70

9. Batista, R., Nunes, B., Carmo, M., Cardoso, C., Sao, J.H., Bulgalho de Almeida, A., Manique, A., Bento, L., Pinto, R.C., Margarida, O.M., (2005). Lack of detectable allergenicity of transgenic maize and soya samples. *J Allergy Clin Immunol.* VOLUME 116, NUMBER 2, 403 – 410.
10. Cankar, K., Chauvensky-Ancel, V., Fortabat, M., Gruden, K., Kobilinsky, A., Zel, J., Bertheau, Y., (2008). Detection of nanounauthorized genetically modified organisms using differential quantitative polymerase chain reaction: application to 35S in maize. *Analytical Biochemistry*, 376, 189-199.
11. Centro Tecnológico AINIA. (2009). Boletín Principios bioquímicos: alimentos transgénicos, principios básicos y métodos de detección. Centro Tecnológico AINIA, 1-24.
12. Colectivo Peninsular “Ko’one’ex T’aan”. (2010). Derecho Constitucional a la Alimentación: una decisión inaplazable (en línea). Consultado 20 febrero, 2011. Disponible en http://colectivopeninsular.blogspot.com/2010_03_01_archive.html
13. Conocimientos Web. (2010). Northern blot (en línea). Consultado 2 junio, 2010. Disponible en <http://www.conocimientosweb.net/portal/term1542.html>
14. Deng, P., Zhou, X., Zhou, P., Du, Z., Hou, H., Yang, D., Tan, J., Wu, X., Zhang, J., Yang, Y., Liu, J., Liu, G., Li, Y., Liu, J., Yu, L., Fang, S., Yang, X. (2008). Edible safety requirements and assessment standards for agricultural genetically modified organisms. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1414 - 1436.
15. EFE Verde. (2010). Desarrollo sostenible (Internacional/Ciencia-Maíz). Nuevo método para medir la resistencia del maíz a las sequías (en línea). Consultado 1 mayo, 2011. Disponible en <http://www.efeverde.com/esl/contenidos/noticias/09-julio-2010-09-27-00-nuevo-metodo-para-medir-la-resistencia-del-maiz-a-las-sequias>

16. El-Sanhoty, R., Shahwan, T., Fawzy, R.M., (2006). Application of artificial neural networks to develop a classification model between genetically modified maize (BT-176) and conventional maize by applying lipid analysis data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 628-636.

17. Engels, J.M., Ramanatina, R.V., Brown, A.H., Jackson, M.T., (2002). *Managing plant genetic diversity*. 1^{ra} ed. CABI Publishin. United States of America. P.p. 380-384.

18. Evenson, R.E., Santaniello, V., (2004). *Consumer acceptance of genetically modified food*. 1^{ra} ed. CABI Publishin. United States of America. P.p. XI-XIV.

19. García-Cañas, V., Cifuentes, A., (2008). Simultaneous confirmatory analysis of different transgenic maize (*Zea mays*) lines using multiplex polymerase chain reaction-restriction analysis and capillary gel electrophoresis with laser induces fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 820-8285.

20. Garduño, F.G. (2010) Revista Virtual Gastronómica. El origen del maíz (en línea). Consultado 8 mayo, 2011. Disponible en http://www.uaemex.mx/Culinaria/primer_numero/maiz.html

21. González, R.V., Ruiz, G.O., García, I.E., Vega, G.M., (2005). Aplicaciones de la biotecnología en seguridad alimentaria. Informe Sector Agroalimentario, Genoma España (Agencia Española de Seguridad Alimentaria / Fundación española para el desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica); Abril; P.p. 7-93. Madrid, España.

22. Gonzalo, C.M., Ávila C., Gallardo, F., Cánovas, F., (2001). *Bioquímica aplicada: manual para el diseño experimental y el análisis de datos en bioquímica y biología molecular*. Septem Ediciones, S.L. España. P.p. 34-46

23. Guárico: Portal Oficial, Noticias de todo el estado Guárico. (2006). Se iniciaron controversias para la compra del maíz almacenado (en línea). Consultado 2 febrero, 2010. Disponible en <http://guarico.com.ve/?p=478>

24. Gutiérrez-Rosati, A., (2008). Obtención e Identificación de Organismos Vivos Modificados – OVM's (transgénicos). Memorias del curso uso sustentable de la biotecnología; septiembre 11-12; P.p. 1-79. Huánuco, Perú.

25. Gutiérrez-Rosati, A., Poggi, P.D., Gálvez, G.M., Cacere, R.R., (2009). Investigaciones sobre la presencia de transgénesis en Perú. Caso Maíz (*Zea mays L.*). Universidad Nacional Agraria La Volina, *Departamentos de Biología*, 1-18.

26. Hernández, M., Esteve, T., Prat, S., Pla, M., (2004). Development of real-time PCR systems based on SYBR^R Green I, AmpliflourTM and TaqMan^R technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21. *Journal of Cereal Science*, 39, 99-107.

27. Johnson-Green, P., (2002). *Introduction to food Biotechnology*. 1^{ra} ed. CRS Press LLC. United States of America. P.p. 103-115.

28. Karamollaoglu, I., Avni, O.H., Mutlu, M., (2009). QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs). *Biochemical Engineering Journal*, 44, 142 – 150.

29. Kenedy, W.V., (2004). Maíz y diversidad: efectos del maíz transgénico en México. Informe del Secretariado conforme al Artículo 13 del ACAAN (Acuerdo de Cooperación Ambiental de América del Norte). Agosto 31. P.p. 3-43. Ottawa, Canadá.

30. Khachatourians, G.G., Mc Hughen, A., Scorza, R., Nip, W-K., Hui, Y.A., (2002). *Transgenics plantas and crops*. 1^{ra} ed. Marcel Dekker, INC. United States of America. P.p. 637-654.

31. Landavazo, G.D., Calvillo, A.K., Espinoza, H.E., Gonzales, M.L., Aragón, C.F., Torres, P.I., Guzmán, M.S., Montero. T.V., Mora, A.M., (2006). Caracterización molecular y biológica de genes recombinantes en maíz criollo de Oaxaca. *Agricultura Técnica en México*, 32, 267-279.

32. Lee, B.H., (1996). *Fundamentos de biotecnología de los alimentos*. 1^{ra} ed. Acribia, España. P.p. 132-135.

33. López, M., Malloquín, P., Vega, M., (2003). Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria. Informe de Vigilancia Tecnológica (Fundación Española para el desarrollo de la investigación en genómica y proteómica / Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid); Abril; P.p. 7-78. Madrid, España.

34. Llácer, G., Diez, M.J., Carrillo, J.M., Badenes, M.L., (2006). *Mejora genética de la calidad en plantas*. 1^{ra} ed. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. España. P.p. 223-243.

35. Llanos, C.M. (1984). *El maíz, su cultivo y aprovechamiento*. Ediciones Mundi-Prensa. España. P.p. 23-35

36. Margarit, E., Reggiardo, M.I., Vallejos, R.H., Permingeat, H.R., (2006). Detection of BT transgenic maize in foodstuffs. *Food Research International*, 39, 250-255.

37. Mendoza, A., Fernandez, S., Cruz, M.A., Rodriguez, P.M., Resendez, P.D., Banera, S.H., (2006). Detection of genetically modified maize in products by the polymerase chain reaction. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5, 175-181.

38. Monografías. (2010). Métodos y aplicaciones de la biología molecular en Biomedicina (en línea). Consultado en 4 julio, 2010. Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos20/biologia-molecular/biologia-molecular.shtml>

39. Morales, R. (2011). El economista: Reto, aumentar producción de maíz (en línea). Consultado 15 mayo, 2011. Disponible en <http://eleconomista.com.mx/industrias/2011/02/02/reto-aumentar-produccion-maiz>

40. Neri, R. L. (2001) Regulación Jurídica de Áreas Naturales Protegidas: Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, Tesis de Licenciatura, Facultad de Derecho, UNAM.

41. Ortega, R.R., (2010). Maíz transgénico: riesgos y beneficios. *Revista Universidad de Sonora, Ruta Crítica*, 41-43.

42. Ortiz, G.S., (2005). Experiencia de monitoreo en Oaxaca para la detección de maíz genéticamente modificado. *Memorias del Intituto Nacional de Ecología – SEMARNAT*; P.p. 1-46. Distrito Federal. México.

43. Ortiz, S., (2002). Los organismos genéticamente modificados y el análisis de riesgos. NAPPO PARA Symposium; marzo; Puerto Vallarta México. Disponible en <http://www.nappo.org/PRA-Symposium/PDF-Final/Ortiz.pdf>

44. Partridge, M., Murphy, D., (2004). Detection of genetically modified soja a range of organic and health food products. *British Food Journal*, 106, 166-180.

45. Patent Lens, (2010). The CaMV 35S promoter (en línea). Consultado 2 junio, 2010. Disponible en <http://www.patentlens.net/daisy/promoters/242/g1/250.html>

46. Pere, A.J., (2000). Detección de organismos modificados genéticamente. *Boletín: Tecnología Agroalimentaria, La Industria del Invernadero*. P.p. 58-61.

47. Perera, J., Tormo, A., García, J., (2002). *Ingeniería genética: expresión de DNA en sistemas heterólogos*. Volumen II. Editorial Síntesis. España. P.p. 41-55

48. Perera, J., Tormo, A., García, J., (2002). *Ingeniería genética: preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA*. Volumen I. Editorial Síntesis. España. P.p. 40-48

49. Piñeyro-Nelson, A., Heerwaarden, J.V., Perales, H.R., Serratos-Hernandez, J.A., Rangel, A., Hufford, M.B., Gepts, P., Garay-Arroyo, A., Riviera-Bustamante, R., Alvarez-Buylla, R., (2009). Transgenesis in Mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Molecular Ecology*, 18, 750–761.

50. Renneberg, R., (2008). *Biotecnología para principiantes*. Reverté. España. P.p. 13-26

51. Reyes, C.P. (1990). *El maíz y su cultivo*. A.G.T. Editor. México. P.p. 25-58
52. Sadava, D.E., Chrispeels, M.J., (2003). *Plants, genes and crop biotechnology*. 2^{da} ed. Jones and Bartlett Publishers, Inc. United States of America. P.p. 528-538.
53. Sagarpa. (2009). Anuario estadístico de la producción agrícola (en línea). Ciclo: cíclicos y Perennes 2009. Consultado 20 noviembre, 2009. Disponible en http://reportes.siap.gob.mx/aagricola_siap/ientidad/index.jsp
54. Sambrook, J. y Russel, D. (2001). *Molecular cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. United States of America.
55. Scholdberg, T.A., Norden, T., Nelson, D., Ronald, J.G., (2009). Evaluating precision and accuracy when quantifying different endogenous control reference genes in maize using real-time PCR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2903-2911.
56. Sector Agroalimentario, Genoma España. (2003). Informe de Vigilancia Tecnológica. Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria. Agenda Española de Seguridad Alimentaria. 1 – 78.
57. Smith, J.E., (2004). *Bioteconología*. Acribia. España. P.p. 14-26
58. Stefanov, J., Fekete, S., Bögre, L., Pack, J., Febér, A., Dudiths, D., (1994). Differential activity of the mannopine synthase and the CAMV 35S promoters during development of transgenic rapessed plants. *Plant Science*, 95, 175-186.
59. Tagu, D., Moussard, C., (2006). *Techniques for Molecular Biology*. Science Publishers. United States of America. P.p. 25-37
60. Teijón, R.J., Garrido, P.A., Villaverde, G.C., Blanco, G.M., Mendoza, O.C., Ramírez, R.J., (2005). *Fundamentos de bioquímica estructural*. Editorial Tébar. México. P.p. 34-51

61. Valdez, M.N., Rodríguez, H.R., Reyes, V.M., Aguilar, G.C., (2010). Detección de residuos de maíz genéticamente modificados en alimentos tradicionales mexicanos. Informe CONACYT: 34 Premio nacional en ciencia y tecnología de alimentos; un impulso al desarrollo alimentario. Diciembre; P.p. 1-5. Saltillo, Coahuila.
62. Vijayakumar, K.R., Martin, A., Gowda, R.L., Prakash, V. (2009). Detection of genetically modified soya and maize: impact of heat processing. *Food Chemistry*, 117, 514 – 521.
63. Watson, J. (2003). *ADN, el secreto de la vida*. 1ª ed. Taurus. España. P.p. 22-49
64. Wilson, I.G., (1997). Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3741-3751.
65. Wisniewski, J.P., Frangne, N., Massonneau, A., Dumas, C. (2002). Between myth and reality: genetically modified maize, an example of a sizeable scientific controversy. *Biochimie*, 84, 1095 – 1103.
66. Yang, M., Djukanovic, V., Stagg, J., Lenderts, B., Bidney, D., Falco, S., Lyznik, L., (2009). Target mutagenesis in the progeny of maize transgenic plants. *Plant Mol Biol*, 70, 669-679.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **Aditivo:** Sustancia añadida intencionalmente a los alimentos con fines tecnológicos en cualquier etapa del proceso de elaboración.
- **DNA (ácido desoxirribonucleico):** El material genético básico que contienen todas las células vivas (y algunos virus), y a partir del cual se construyen las proteínas. Cuando no se está replicando (regenerando) en la célula, el DNA presenta la forma de la llamada “doble hélice”: cadena de doble hebra formada por nucleótidos, a su vez compuestos por pares de bases nitrogenadas (las portadoras específicas de la información genética). Las moléculas de DNA se condensan en estructuras compactas a las que se denominan cromosomas.
- **DNA recombinante (DNAr):** Producto del empalme de genes mediante técnicas de ingeniería genética por las que se unen genes de distintas fuentes y, comúnmente, de distintas especies.
- **Alérgeno:** Sustancia capaz de desencadenar una respuesta inmune en el organismo.
- **Amplificación:** Producción de copias adicionales de una secuencia de DNA.
- **Biodiversidad:** Variabilidad total en y entre las especies de organismos vivos y sus hábitats. El término, utilizado por primera vez en 1986 para designar la diversidad biológica, se refiere usualmente a la totalidad de la variedad heredable en todos los niveles y suele dividirse en tres niveles: genética (genes en una población local o especie), taxonómica (las especies que conforman toda o parte de una comunidad local) y ecológica (las comunidades que integran las partes vivas de los ecosistemas).
- **Bioseguridad:** El propósito de garantizar que el desarrollo y uso de plantas transgénicas y otros organismos genéticamente modificados (y productos de la biotecnología, en general) no afecten negativamente la salud de plantas, animales y seres humanos, ni tampoco los recursos genéticos o el medio ambiente.

- **Biotecnología:** manipulación científica o industrial de las formas vivas (organismos) para generar nuevos productos o mejorar los organismos (plantas, animales o microbios). El término se acuñó inicialmente para hacer referencia a la interacción entre la biología y la tecnología humana. En su uso reciente alude a todas las partes de la industria que crea, desarrolla y comercializa una variedad de productos deliberadamente manipulados en nivel molecular o celular.
- **Desnaturalización:** Destrucción irreversible de una macromolécula, por ejemplo la destrucción de una proteína por efecto del calor.
- **Electroforesis:** Método empleado para separar una mezcla de moléculas grandes, tales como fragmentos de DNA o proteínas, haciendo pasar una corriente eléctrica a través de un gel que contiene las muestras que se desea separar.
- **Erosión genética:** En relación con los cultivos agrícolas, proceso por el que disminuye la diversidad de la dotación genética (conjunto de todos los genes de una población) de una planta de cultivo particular.
- **Especie:** Categoría taxonómica de las formas vivas que comprende a organismos sexualmente compatibles que, en condiciones naturales, se cruzan libremente entre sí o pueden hacerlos. El nombre científico (en latín) de una especie incluye el nombre del género y la designación de la propia especie, en ese orden. (por ejemplo, *Bacillus thuringiensis*).
- **Evaluación de riesgos:** en relación con los organismos manipulados mediante ingeniería genética, proceso por el que se predice el comportamiento del organismo modificado. Con respecto de las plantas transgénicas, el término se refiere a determinar la probabilidad global de que su introducción deliberada en el medio ambiente provoque daños ambientales, incluidos efectos adversos en los ecosistemas naturales y agrícolas o introduzca nuevos riesgos para la salud pública.

- **Flujo de genes (o flujo génico):** intercambio de genes (en una o ambas direcciones) a baja velocidad entre poblaciones de organismos relacionadas y sexualmente compatibles, pero distintas (por lo general). En las plantas, el flujo de genes suele darse a través de la transferencia de polen (gametos masculino), proceso mismo que subyace a la transferencia natural de genes de plantas genéticamente modificadas a sus parientes silvestres.
- **Gen:** Unidad funcional de la herencia (es decir, la base física para la transmisión de caracteres de los progenitores a sus descendientes), y unidad básica de la diversidad biológica.
- **Gen marcador (o marcador genético):** Todo segmento de DNA que pueda identificarse o cuya localización en el cromosoma sea conocida, de manera que resulte posible usarlo como punto de referencia para ubicar otros genes.
- **Genoma:** Todo el material hereditario de una célula o virus, incluida la dotación completa de genes funcionales y no funcionales. En los organismos superiores el genoma abarca el conjunto entero de cromosomas contenidos en el núcleo celular.
- **Hibridación:** Formación natural o construcción artificial de una molécula de ácido nucleico dúplex por apareamiento de bases complementarias entre dos cadenas de ácido nucleico procedentes de distintas fuentes.
- **Ingeniería genética (modificación genética):** Alteración selectiva y deliberada del genoma de un organismo al introducir, modificar o eliminar genes específicos mediante técnicas de biología molecular.
- **Investigación genómica:** Campo de estudio científico que busca conocer la naturaleza (es decir, secuencias de DNA) y funciones específicas de los genes en los organismos vivos. En combinación con la bioinformática, puede aplicarse al desarrollo de cultivos transgénicos y otras biotecnologías; incluye la integración de mapas de genes y la identificación de combinaciones genéticas.

- **Organismo Modificados Genéticamente o transgénicos (OMG):** Organismo que se caracteriza por contener una fracción de DNA de otro organismo integrado en su propio DNA. Como resultado, el organismo transgénico adquiere una nueva función generalmente de interés comercial.
- **Organismo Vivo Modificado (OVM):** De conformidad con la definición de Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología (Protocolo sobre Bioseguridad), del Convenio sobre la Diversidad Biológica, cualquier organismos que posea una combinación nueva de material genética obtenida mediante el uso de la biotecnología moderna (es decir, técnicas de manipulación in vitro de ácidos nucleicos, incluidos métodos de DNA recombinante, y técnicas de manipulación in vitro permiten trascender las barreras naturales de la reproducción).
- **Primer o cebador:** Pequeña cadena de nucleótidos a partir de la cual la DNA polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de DNA.
- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Método empleado para amplificar una secuencia específica de DNA in vitro mediante ciclos repetidos de síntesis, usando cebadores específicos y DNA polimerasa.
- **Recombinación:** Unión de genes (es decir, segmentos de DNA), conjuntos de genes o partes de genes para dar lugar a nuevas combinaciones, ya sea biológicamente o por medio de la manipulación en laboratorio.
- **Recursos genéticos:** Material genético que sirve como fuente para el aprovechamiento humano actual y futuro.
- **Secuenciación de DNA:** Determinación del orden de nucleótidos o bases en una muestra pura de moléculas de DNA.
- **Teocintle:** *Zea mexicana*, planta forrajera tropical americana, en la que las semillas no están unidas a una mazorca, sino que más bien la inflorescencia femenina (la espiga)

consiste en una sola fila de seis o más semillas, cada una de las cuales contiene un endospermo compacto, rígido, de forma parecida a la de las rosetas o palomitas de maíz, cubierto con una cáscara dura (la cúpula). El teocintle es uno de los antecesores que contribuyó genéticamente al desarrollo del maíz moderno.

- **Transformación genética:** Proceso por el que se transfiere directamente DNA libre (es decir, no cromosómico y asociado a un vector) de un organismo donador a una célula receptora capaz de producir un organismo transgénico.
- **Transgén:** “Paquete” de material genético (DNA) que se inserta en el genoma de una célula mediante técnicas de empalme de genes, incluida la transferencia de genes de especies distintas en el genoma de un organismo huésped. Un transgén puede consistir en un gen (o genes) de un organismo distinto (es decir, DNA extraño) o bien genes creados artificialmente.
- **Transgénico:** Organismo que contiene material genético (DNA) nuevo, derivado de un organismo distinto de sus progenitores o añadido al material genético progenitor, el término incluye a la prole de un organismo genéticamente modificado.
- **Trazabilidad o rastreabilidad:** Habilidad utilizada para identificar el origen de un alimento o de sus productos, tan lejos en la secuencia de producción como sea necesario, y realizar un seguimiento del mismo a lo largo de toda o parte de su vida útil.
- **Variedad:** Categoría empleada en la clasificación de plantas y animales, inmediata inferior a la de especie. Una variedad consiste en un grupo de individuos con características distintivas genéticamente heredadas que los hacen diferir de otros ejemplares de la misma especie.
- **Variedad criolla:** Variedad de cultivo con una amplia base genética (marcadamente heterocigótica, en términos genéticos), que ha sido resultado de siglos de desarrollo y adaptación a tipos de suelo y microclimas particulares.