



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“Detección de organismos genéticamente modificados
en productos derivados de maíz o soya utilizando la
reacción en cadena de la polimerasa (PCR)”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

BRENDA PAREDES DELGADO

ASESORES:

Dr. José Francisco Montiel Sosa

M. en C. Josefina Moreno Lara



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



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

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**

Detección de organismos genéticamente modificados en productos derivados de maíz o soya utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Que presenta el pasante: **Brenda Paredes Delgado**

Con número de cuenta: **40806732-6** 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 ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Enero de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|---------------------|-------------------------------------|--------------|
| PRESIDENTE | Dr. José Francisco Montiel Sosa | |
| VOCAL | Dra. Susana Patricia Miranda Castro | |
| SECRETARIO | Dra. Carolina Moreno Ramos | |
| 1er SUPLENTE | IA. Miriam Alvarez Velasco | |
| 2do SUPLENTE | M. en C. Tais Nopal Guerrero | |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad...”

(Albert Einstein)

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto, dándome salud y fortaleza para lograr mis objetivos.

A mi mamá Martha Delgado por brindarme su apoyo incondicional y desinteresado. Por ser uno de mis grandes pilares para el cumplimiento de esta meta.

A mi familia por creer en mí y por no dejarme vencer a pesar de las adversidades.

A mis Profesores principalmente a mi Asesor el Dr. Francisco Montiel Sosa por compartirme sus conocimientos y por la confianza que depósito en mí para la realización de este proyecto. A la M. en C. Josefina Moreno Lara por su dedicación, paciencia, e incondicional apoyo.

A mis amigos Rubén Raúl, D. Alberto, Joce, Maara, Fabiola, Sandra, Josue, Itzel, Manuel, Oscar, Alejandro, Ceci, Pedro, Carol... simplemente por ser mis amigos y compartir conmigo momentos de estrés, diversión, tristeza y alegrías.

A la UNAM por brindarme la oportunidad de formar parte de ella, por proporcionarme los conocimientos, la sabiduría y los valores necesarios para mi formación profesional.

A los proyectos PAPIME PE203211, PAPIME PE202513, PAPIIT IN21413, por el apoyo recibido durante la realización del presente trabajo.

“Por mi raza hablara el espíritu”.



INDICE

| | Página |
|--|--------|
| ÍNDICE DE CUADROS | v |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vi |
| RESUMEN | iviii |
| INTRODUCCIÓN | ix |
| CAPÍTULO I. ANTECEDENTES | |
| 1.1 Generalidades del maíz | 1 |
| 1.1.1 Definición y características del maíz (<i>Zea mays</i> L.) | 1 |
| 1.1.2 Taxonomía..... | 3 |
| 1.1.3 Morfología..... | 3 |
| 1.1.4 Composición química del maíz | 5 |
| 1.1.5 Importancia del maíz en alimentos | 6 |
| 1.1.6 Producción de maíz | 6 |
| 1.2 Generalidades de la soya | 7 |
| 1.2.1 Definición y características de la soya (<i>Glycine max</i>)..... | 7 |
| 1.2.2 Taxonomía..... | 9 |
| 1.2.3 Morfología..... | 9 |
| 1.2.4 Composición química | 10 |
| 1.2.5 Importancia de la soya en alimentos | 11 |
| 1.2.6 Producción de Soya | 12 |
| 1.3 Mejoramiento genético..... | 13 |
| 1.3.1 Mejoramiento Genético del maíz | 13 |
| 1.3.2 Mejoramiento genético de la soya | 14 |
| 1.4 Perspectivas y evaluación del maíz y soya genéticamente modificados..... | 15 |
| 1.5 Biotecnología e ingeniería genética en plantas | 16 |
| 1.5.1 Biotecnología..... | 16 |
| 1.5.2 Tecnología del DNA recombinante..... | 17 |
| 1.5.2.1 Enzimas de restricción y plásmidos o vectores de DNA..... | 17 |
| 1.5.3 Métodos y técnicas de transformación de plantas | 25 |
| 1.5.4 Cultivo de células y tejidos vegetales..... | 29 |



| | |
|---|----|
| 1.5.5 Acuerdos internacionales y regulación en México sobre el uso de Transgénicos..... | 32 |
| 1.6 Métodos para la autenticación de alimentos | 33 |
| 1.6.1 Métodos de análisis basados en la detección de proteínas | 34 |
| 1.6.2 Métodos de análisis basados en la detección de DNA | 34 |
| 1.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 35 |
| 1.6.3.1 Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 35 |
| 1.6.3.2 Etapas de la PCR | 37 |
| 1.6.3.3 Condiciones de la reacción | 38 |
| 1.6.3.4 Componentes de la reacción | 39 |
| 1.6.3.5 Limitaciones de la técnica | 41 |
| 1.6.3.6 Aplicaciones de la PCR | 41 |
| CAPITULO II. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL | |
| 2.1 Cuadro metodológico | 43 |
| 2.2 Descripción del cuadro metodológico..... | 43 |
| 2.2.1 Objetivo general | 43 |
| 2.2.2 Objetivo particular 1 | 43 |
| 2.2.3 Objetivo particular 2..... | 43 |
| 2.2.4 Objetivo particular 3..... | 43 |
| 2.2.5 Objetivo particular 4..... | 44 |
| 2.3 Materiales | 46 |
| 2.3.1 Material biológico | 46 |
| 2.3.2 Reactivos y productos biológicos | 49 |
| 2.3.3 Equipo utilizado..... | 50 |
| 2.4 Métodos..... | 51 |
| 2.4.1 Extracción de DNA | 51 |
| 2.4.2 Cuantificación de DNA por medio de absorbancia a 260 nm | 52 |
| 2.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 53 |
| 2.4.4 Electroforesis..... | 58 |
| 2.4.5 Visualización de los geles de electroforesis | 60 |



| | |
|--|-----|
| CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 61 |
| CONCLUSIONES | 88 |
| GLOSARIO | 90 |
| BIBLIOGRAFÍA | 94 |
| ANEXO A..... | 101 |

**ÍNDICE DE CUADROS**

| | Página |
|--|--------|
| Cuadro 1. Taxonomía del maíz | 3 |
| Cuadro 2. Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz (%)..... | 5 |
| Cuadro 3. Composición promedio de la materia seco del grano de maíz | 6 |
| Cuadro 4. Composición de la soya y sus partes (%) | 11 |
| Cuadro 5. Generalidades de las muestras de productos derivados de maíz | 46 |
| Cuadro 6. Generalidades de las muestras de productos derivados de soya..... | 47 |
| Cuadro 7. Secuencia de primers utilizados para la detección de Cox 2 de soya, Citocromo b del maíz Promotor CaMV y Terminador T-NOS..... | 50 |
| Cuadro 8. Cantidad de componentes necesarios para realizar la PCR | 53 |
| Cuadro 9. Cantidad de componentes necesarios para realizar la PCR directo..... | 57 |
| Cuadro 10. Condiciones de PCR directo utilizadas para la detección de maíz..... | 57 |
| Cuadro 11. Condiciones de PCR directo para detección de soya. | 57 |
| Cuadro 12. Componentes y cantidades necesarias para la preparación de una muestra al realizar una electroforesis. | 59 |
| Cuadro 13. Nomenclatura y concentración de DNA, al extraer el DNA total de los controles internos y positivos. | 61 |
| Cuadro 14. Concentración de DNA próxima a los 60 ng/μl de los controles internos y positivos..... | 62 |
| Cuadro 15. Resultados de la concentración de DNA obtenida de los diferentes productos comerciales derivados del maíz. | 63 |
| Cuadro 16. Resultados de la concentración de DNA obtenido de los diferentes productos comerciales derivados de soya..... | 64 |



ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Colores que presentan las diferentes variedades de maíz | 2 |
| Figura 2. Morfología del grano de maíz..... | 4 |
| Figura 3. Hojas trifoliadas y pubescentes de la Soya Glycine Max (L.) | 8 |
| Figura 4. Morfología del grano de soya | 9 |
| Figura 5. Corte transversal del grano de soya | 10 |
| Figura 6. Plásmido recombinante | 20 |
| Figura 7. Esquema general del procedimiento de clonación..... | 22 |
| Figura 8. Vector de expresión al cual se le puede insertar un gen extraño para garantizar la transcripción y traducción | 23 |
| Figura 9. Secuenciación del Promotor 35S del Virus del Mosaico de Coliflor (CaMV). | 24 |
| Figura 10. Tumores en plantas. | 26 |
| Figura 11. Micropartículas de oro (1) y tungsteno (2) | 28 |
| Figura 12. Tipos de manipulación y cultivos <i>in vitro</i> de sistemas vegetales | 30 |
| Figura 13. Esquema de la amplificación de una molécula de DNA molde en los ciclos de la PCR. | 36 |
| Figura 14. Condiciones de temperatura en un ciclo estándar de PCR..... | 39 |
| Figura 15. Cuadro metodológico..... | 45 |
| Figura 16. Productos comerciales utilizados para analizar la presencia de maíz transgénico. | 48 |
| Figura 17. Productos comerciales utilizados para analizar la presencia de soya transgénica. | 48 |
| Figura 18. Programa de PCR utilizado para la detección de maíz | 54 |
| Figura 19. Programa de PCR utilizado para la detección de soya. | 55 |
| Figura 20. Programa de PCR para la detección de maíz y soya transgénicos..... | 56 |
| Figura 21. Marcador de peso molecular | 60 |
| Figura 22. Especificidad de los primers de maíz en un gel de agarosa al 2% a 90v. | 65 |
| Figura 23. Especificidad de los primers de soya en un gel de agarosa al 2% a 90v. ... | 67 |
| Figura 24. Amplificación del gen CAMV presente en maíz y soya transgénicos en un gel de agarosa al 3% con una potencia de 60v..... | 68 |



| | |
|--|----|
| Figura 25. Amplificación del gen T-NOS presente en maíz y soya transgénicos en un gel de agarosa al 3% a 60v..... | 69 |
| Figura 26. Detección de maíz en las primeras cinco muestras de productos comerciales en un gel de agarosa al 2% a 90v..... | 71 |
| Figura 27. Detección de maíz de las siguientes seis muestras de productos comerciales en un gel de agarosa al 2% a 90v..... | 72 |
| Figura 28. Detección de soya en las primeras cinco muestras de maíz en un gel de agarosa al 2% a 90v. | 74 |
| Figura 29. Detección de soya en las tres muestras restantes de maíz en un gel de agarosa al 2% a 90v. | 74 |
| Figura 30. Detección de soya en los primeros cinco productos comerciales en un gel de agarosa al 2% y 90v..... | 76 |
| Figura 31. Detección de soya en las siguientes seis muestras de productos comerciales con un gel de agarosa al 2% y 90v..... | 77 |
| Figura 32. Detección de maíz en productos comerciales derivados de soya con un gel de agarosa al 2% y 90v..... | 79 |
| Figura 33. Detección del gen CAMV en las primeras cinco muestras de productos comerciales en un gel de agarosa al 3% a 90v..... | 81 |
| Figura 34. Detección del gen T-NOS en las primeras cinco muestras de productos comerciales en un gel de agarosa al 3% a 90v..... | 82 |
| Figura 35. Detección del gen CAMV en las siguientes muestras de productos comerciales en un gel de agarosa al 3% a 90v..... | 83 |
| Figura 36. Detección del gen T-NOS en las siguientes muestras de productos comerciales en un gel de agarosa al 3% a 90v..... | 84 |
| Figura 37. Detección del gen CAMV en las primeras cinco muestras de productos comerciales en un gel de agarosa al 3% a 90v..... | 85 |
| Figura 38. Detección del gen T-NOS en las primeras cinco muestras de productos comerciales en un gel de agarosa al 3% a 90v..... | 86 |
| Figura 39. Detección del gen CAMV en una muestra comercial de soya con un gel de agarosa al 3% a 90v..... | 87 |
| Figura 40. Detección del gen T-NOS en una muestra comercial de soya con un gel de agarosa al 3% a 90v..... | 87 |



RESUMEN

En la actualidad en México hay un alto porcentaje de alimentos comerciales con residuos transgénicos que carecen de etiquetas que informen acerca de esos residuos y el origen. Algunas regulaciones internacionales se han preocupado por demandar su detección ya que se han utilizado como materia prima de una gran variedad de productos.

A nivel mundial la soya, seguida del maíz, son los cultivos transgénicos más importantes, de acuerdo a la superficie cultivada. México es un país importador de ambos cultivos, los cuales son utilizados en la elaboración de diferentes alimentos, desde el chocolate hasta las papas fritas, pasando por la margarina y los platillos preparados. Por ello en el presente proyecto se realizó un estudio de algunos productos comerciales a base de maíz y de soya con el objetivo de detectar la presencia del Virus del Mosaico de la Coliflor y el Terminador de la Nopaline Sintetasa los cuales son generalmente utilizados por la ingeniería genética para introducir genes, que en el caso del maíz o la soya les confieren características que originalmente no poseen como resistencia a insectos, a climas adversos, entre otras. Primero el ADN de los diferentes productos fue extraído con el método de Sambrook para posteriormente llevar a cabo la amplificación de los fragmentos del material genético en la PCR, y así mediante electroforesis poder visualizar y analizar los resultados. En términos generales el proyecto aborda temas como las generalidades tanto del maíz como de la soya, así como el mejoramiento genético y las técnicas o métodos más comunes para la obtención de transgénicos.

Asimismo se presentan los resultados obtenidos de los cuales se pudo confirmar la presencia de organismos genéticamente modificados en productos derivados tanto de maíz como de soya con lo que se comprueba que en México se están consumiendo alimentos transgénicos sin que el consumidor decida si prefiere o no consumirlos ya que no está declarado en la etiqueta. Este resultado fue posible gracias al uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ya que mediante la amplificación de un fragmento de DNA específico se pudo hacer la detección de los genes de interés.



INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha desatado una fuerte polémica sobre la utilización de los productos transgénicos, que implica consideraciones éticas, económicas y políticas, por lo que ha sido de gran importancia la necesidad de regular y etiquetar los productos alimenticios que contengan OGMs (Organismos Genéticamente Modificados) o que sean integralmente OGMs por su naturaleza.

Un transgénico u organismo genéticamente modificado puede definirse como organismos en los cuales el material genético, formado por el ácido desoxirribonucleico (DNA), ha sido alterado de un modo artificial mediante el uso de la denominada tecnología del DNA recombinante o ingeniería genética (Centro Tecnológico AINIA, 2009). Esta técnica permite aislar genes de cualquier organismo vivo donador, seleccionarlos y transferirlos a otro organismo de una especie receptora que en la escala filogenética puede estar relacionada o distante de la donadora (Gil, 2010).

La introducción en el mercado de los alimentos genéticamente modificados son sujeto de evaluación extensiva debido a los efectos potenciales en la salud del ser humano, incluyendo toxicidad y alergias (Batista y col., 2005). La actitud del consumidor hacia los OGMs está determinada por el riesgo y beneficios percibidos, los que se encuentran determinados en general por el conocimiento que se tiene sobre los OGMs (Verdume y Viaene, 2003; Hossain y col., 2003). Beneficios sustanciales, como un menor precio (Lusk y col., 2002; Noussair y col., 2002) o un mayor valor nutritivo (Frewer y col., 1999) compensarían el riesgo percibido resultando en una actitud positiva hacia los transgénicos. 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 (Margarit y col., 2006).

La obtención de los alimentos genéticamente modificados 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 (Lee, 1996). Existen métodos basados en el análisis a nivel molecular del DNA que han sido empleados en la industria de alimentos para monitorear adulteraciones en distintos productos alimentarios entre los cuales el más utilizado es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que implica



un conjunto de tratamientos desarrollados in vitro sobre una región de DNA para su amplificación selectiva. El proceso requiere el conocimiento previo de la secuencia de dos regiones cortas que flanqueen a la que se pretende amplificar; estas regiones son utilizadas como cebadores o primers en la reacción de elongación catalizada por la polimerasa, para lo cual es necesario previamente conseguir su asociación al DNA molde desnaturalizado (Perera y col., 2003).

Los alimentos elaborados con base en cultivos transgénicos o procesados con ayuda de componentes de otros organismos modificados genéticamente han aparecido en los anaqueles y en las notas periodísticas cada vez con mayor frecuencia provocando un gran debate social y científico sobre los beneficios y perjuicios que aportan, sin embargo se tiene poco conocimiento en este aspecto como para evaluar objetivamente este tipo de alimentos, por ello, el presente proyecto surgió con la intención de aclarar las afirmaciones que se han venido presentando a través de divulgaciones no gubernamentales que declaran que la mayoría de los productos alimentarios que contienen maíz o soya en su composición son transgénicos.



CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades del maíz

1.1.1 Definición y características del maíz (*Zea mays* L.)

La palabra Maíz es de origen indio caribeño, y literalmente significa «lo que sustenta la vida». Botánicamente, el maíz (*Zea mays*) pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta anual alta dotada de un amplio sistema radicular fibroso (Garduño, 2010). 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 (Llanos, 1984).

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 (Garduño, 2010).

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; una de sus principales ventajas es la amplia plasticidad de adaptación, apenas igualada por el frijol para formar el “Taco Mexicano” (Reyes, 1990).

El grano posee diversas intensidades de colores: blanco, amarillo, rojo, azul, morado, púrpura, negro, variegado y pinto, los cuales se pueden observar en la Figura 1. Los múltiples colores en las diferentes variedades de maíz son de gran interés y estudio debido a la información genética que presenta cada una ante los problemas de sequía y consumo humano (EFE Verde, 2010).

Zea mays, es una especie monoica, que se caracteriza por tener la inflorescencia femenina (mazorca) y la masculina (espiga) separadas pero 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. 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. Por su gran masa de raíces superficiales, es susceptible a sequías, intolerancia a suelos deficientes en nutrientes, y a caídas por severos vientos (Llanos, 1984). El maíz es una especie de polinización abierta (alógama), la polinización ocurre con la transferencia del polen, por el viento, desde la espiga a los estigmas (cabellos) de la mazorca. Cerca del 95% de los óvulos son fecundados con polen de otra planta y un 5% con el mismo polen, aunque las plantas son completamente autocompatibles (Silva, 2005).



Figura 1. Colores que presentan las diferentes variedades de maíz

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 cariósipide y agrícolamente se le conoce como semilla (Reyes, 1990).



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, debido a la deficiencia de 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 (Reyes, 1990).

1.1.2 Taxonomía

La taxonomía es la forma más elemental de agrupar a los individuos, partiendo de sus propiedades más generales a las más específicas, en el Cuadro 1 se observa la forma taxonómica del maíz (Acquaah, 2007).

Cuadro 1 Taxonomía del maíz

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

FUENTE: Acquaah, 2007

1.1.3 Morfología

Las partes fundamentales del maíz constan principalmente del Pericarpio, Endospermo, el Germen y el Fenículo (Llanos, 1984). En la Figura 2 se puede observar el corte transversal de un grano de maíz, indicando las partes que lo componen.

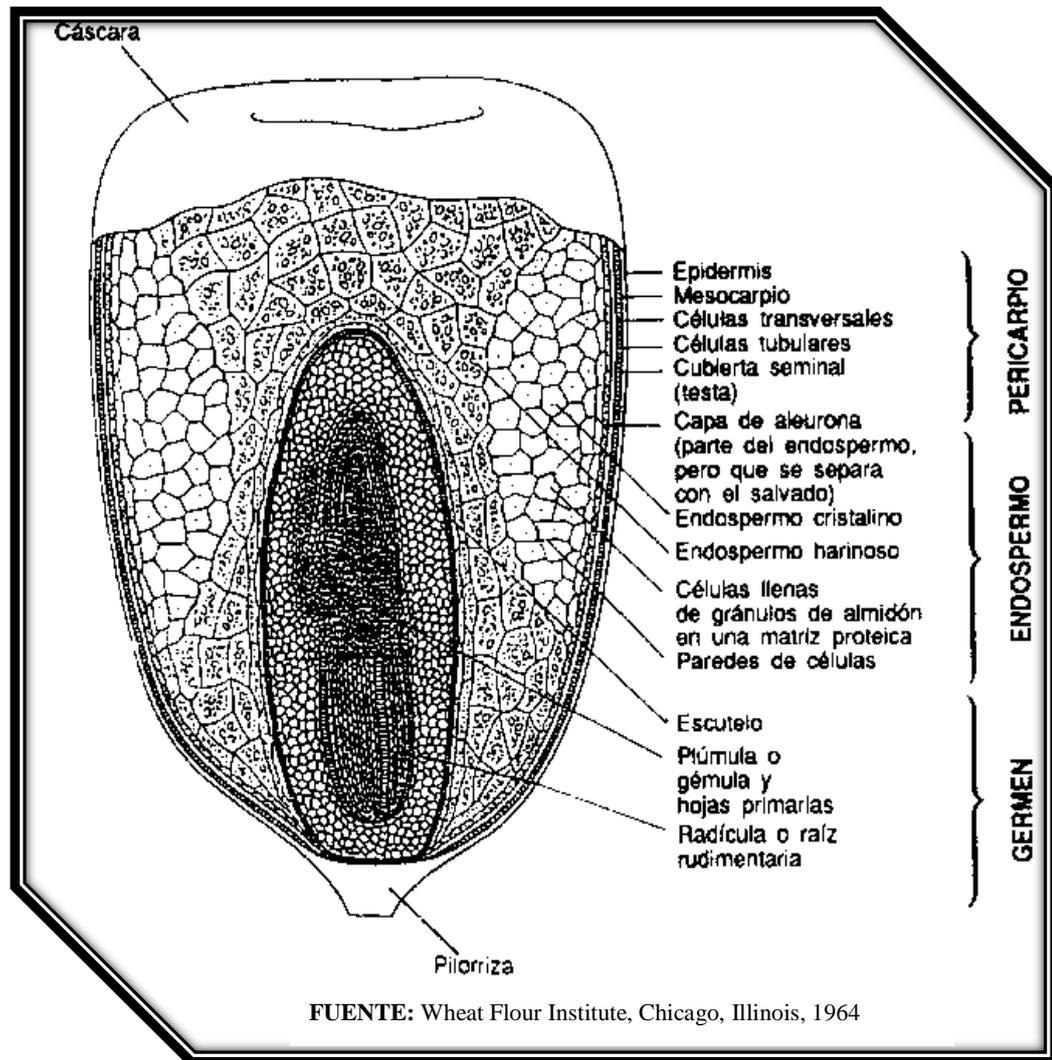


Figura 2. Morfología del grano de maíz

Pericarpio

Constituye la parte externa del grano, siendo del 5-6% del total del peso del grano; está dividido en cuatro capas delgadas:

- Epicarpio. Capa externa que cubre el grano; está conformado por células de paredes gruesas.
- Mesocarpio. Capas constituidas por pocas células siendo la capa externa la más gruesa similar a la del epicarpio, mientras las células de las capas internas son planas, de paredes delgadas.
- Células cruzadas. Son capas de células de paredes delgadas, con muchos espacios intercelulares.
- Células tubulares. Son capas de células largas paralelas, sin ramificaciones.



Endospermo

En la mayoría de las variedades del maíz representa aproximadamente el 80% del total del peso del grano. El endospermo está compuesto por tres tipos de células.

- Capa de Aleurona. De una sola célula, contiene proteína, aceite, minerales y vitaminas.
- El Endospermo Córneo. Formado por células de forma irregular y alargadas.
- El Endospermo Harinoso. Se localiza en la parte central del grano; está constituido por células grandes en relación a las otras células que componen el endospermo.

Embrión o Germen

Representa el 8 y el 12% del peso del grano. Está conformado por:

- Escutelo. Órgano encargado de la alimentación del embrión en el momento de su germinación.
- Eje embrionario. Conformado por una plúmula, que posee de cinco a seis hojas y una radícula

En general, el endospermo incluye aproximadamente el 82% del grano; también aproximadamente el pericarpio abarca el 6% y el embrión el 12%.

1.1.4 Composición química del maíz

La composición química del grano de maíz difiere debido a las principales partes que lo conforman (Reyes, 1990). En el Cuadro 2 se puede observar la composición química proximal de las principales partes de los granos de maíz y en el Cuadro 3 la composición promedio de la materia seca del grano entero.

Cuadro 2. Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz (%)

| Componente químico | Pericarpio | Endospermo | Germen |
|--------------------|------------|------------|--------|
| Proteínas | 3,7 | 8,0 | 18,4 |
| Extracto etéreo | 1,0 | 0,8 | 33,2 |
| Fibra cruda | 86,7 | 2,7 | 8,8 |
| Cenizas | 0,8 | 0,3 | 10,5 |
| Almidón | 7,3 | 87,6 | 8,3 |
| Azúcar | 0,34 | 0,62 | 10,8 |

FUENTE: Watson, 1987

**Cuadro 3.** Composición promedio de la materia seco del grano de maíz

| Componente | % |
|-----------------|-------|
| Almidón | 72.40 |
| Grasas (aceite) | 4.70 |
| Proteína | 9.60 |
| Cenizas | 1.43 |
| Azúcares | 1.94 |
| Fibra | 9.93 |

FUENTE: Reyes, 1990

1.1.5 Importancia del maíz en alimentos

La relevancia que tiene este cereal se debe a que suministra elementos nutritivos al hombre y a los animales, y es materia prima básica para la industria, ya que con él se produce almidón, aceites, proteínas, bebidas alcohólicas y edulcorantes alimentarios, entre otros productos. Su falta de gluten lo hace un alimento ideal para celíacos y bebés es por ello que suele agregarse como endulzante o espesante sobre todo en leches o comidas infantiles. Es alto en fibras lo que es bueno para personas con estreñimiento y tiene altos valores de vitaminas A y B₁ (Llanos, 1984).

Como alimento puede utilizarse el grano, maduro o no; también procesarse con técnicas de molienda en seco para obtener un número relativamente grande de productos intermedios, entre los que se mencionan la sémola con partículas de diferente tamaño y la sémola en escamas y harinas, que a su vez tienen muchos usos en una amplia variedad de alimentos (Llanos, 1984).

1.1.6 Producción de maíz

Se estima que mundialmente la producción de maíz para el año 2011/2012 será de 868,06 millones de toneladas, cerca de 500.000 toneladas superior a lo estimado el mes pasado y continúa siendo más de 40 millones de toneladas superior a lo cosechado en la campaña 2010/11 (AgroPanorama, 2010). Entre los principales productores de Maíz se encuentran:

- Estados Unidos 313,91 millones de toneladas
- China 191,75 millones de toneladas
- Unión Europea (27 Estados) 64,31 millones de toneladas



- Brasil 61,0 millones de toneladas
- Argentina 26,0 millones de toneladas
- Ucrania 22,5 millones de toneladas
- India 21,0 millones de toneladas
- México 20,5 millones de toneladas
- Sudáfrica 12,5 millones de toneladas
- Canadá 10,7 millones de toneladas
- Nigeria 8,7 millones de toneladas
- Indonesia 8,1 millones de toneladas
- Filipinas 7,0 millones de toneladas
- Rusia 6,68 millones de toneladas
- Serbia 6,26 millones de toneladas
- Vietnam 5,4 millones de toneladas
- Otros países 81,73 millones de toneladas

El maíz puede utilizarse como Planta (Forraje verde, Ensilado, Rastrojo, Materia orgánica al suelo), Mazorca (Elote, Forraje tosco, Olote) y Grano (Alimentación humana, del ganado y como materia prima en la industria de la semilla). Así mismo el maíz se aprovecha más como alimento humano sobre todo para hacer tortillas, bollos, arepa o como materia prima en la industria alimentaria (harina, maicena, aceite, mieles, etc.) (Reyes, 1990).

1.2 Generalidades de la soya

1.2.1 Definición y características de la soya (*Glycine max*)

La soya es una legumbre de ciclo anual, de porte erguido, que alcanza entre 0,50 y 1,5 metros de altura. Posee hojas grandes, trifoliadas y pubescentes (Figura 3). Su nombre científico es *Glycine Max* (L.). El nombre de *Glycine* deriva del griego *glykys* que significa “dulce” y fue originalmente introducido por Linnaeus. En otros países se le conoce popularmente como soya (Portugal y Francia e Inglaterra), soia (Italia) y sojabohne (Alemania) (Ridner, 2006).



Figura 3. Hojas trifoliadas y pubescentes de la Soya *Glycine Max* (L.)

Sus flores se ubican en las axilas de las hojas, son pequeñas, de color blanco-amarillento o azul-violáceo y se encuentran agrupadas en inflorescencias (Ridner, 2006). Cada flor cuenta con un ovario (2 a 5 óvulos), diez estambres (nueve soldados y uno libre) y un pistilo. Por ser una flor completa y dada su estructura, la soya se autofecunda, aunque puede existir un 0.5% de polinización cruzada (COPROICA, 2006).

La semilla se desarrolla rápidamente después de la fecundación. A los 7 días se inician los cotileidones, transcurridos 12 días se definen los sistemas tisulares del hipocótilo, posteriormente a los 14 días se forman los primordios de las hojas primarias y finalmente a los 30 días se diferencia el primordio de la primera hoja trifoliada.

Esta planta herbácea posee vainas cortas, que contienen en su interior entre uno y cuatro granos oleaginosos (con un 20% de aceite), con distintas variaciones de color: amarillo o negro, aunque existen otras especies con semillas de color verde o castaño.

Las vainas maduras pueden tener de 1 a 5 semillas, aunque normalmente se dan con 2 a 3 semillas (COPROICA, 2006; Ridner, 2006).

Al igual que las leguminosas, la soya puede capturar del suelo todo el nitrógeno que necesita porque posee nódulos en los que se desarrollan bacterias fijadoras del nitrógeno atmosférico (*Rhizobium japonicum*) (Ridner, 2006).

En muchos países occidentales, esta semilla se utiliza para la extracción de aceite y el residuo o pasta, rico en proteína, asimismo se emplea para la alimentación animal: por otra parte, en el Oriente, la soya es fundamental en la dieta de un gran sector de la



población. Debido a sus propiedades nutritivas, principalmente por su proteína, en los últimos años ha habido un gran desarrollo científico y tecnológico para su aprovechamiento integral. La producción de proteínas de soya representa una alternativa muy importante para la gran deficiencia que existe de las proteínas convencionales, como las de la leche y la carne (Badui, 2006).

1.2.2 Taxonomía

El género *Glycine* Willd es un miembro de la familia leguminosae, subfamilia Papilionoideae y tribu Phaseoleae. La tribu Phaseoleae contiene géneros y especies de considerable importancia en la alimentación humana y animal. Entre ellas: *Glycine max* (L) Merr-soya; *Cajanus Cajan* (L) Millsp-Guandul; *Phaseolus* spp. -fríjol común; *Vigna* spp.-Caupí, etc. El género de *Glycine*, actualmente está dividido en subgéneros *Glycine* y *Soya* (Moench.). El subgénero *Soya* incluye a *Glycine max* (L) Merrill, *Glycine soja* Sieb.-Zucc. y *Glycine gracilis*. Existen evidencias de que *Glycine soja* es el ancestro de la especie *Glycine max* (COPROICA, 2006).

1.2.3 Morfología

El grano de Soya consiste en un embrión protegido por una cobertura seminal o tegumento. El embrión está compuesto por dos cotiledones y un eje embrionario (epicótilo, hipocótilo y radícula). La testa del grano forma la mayor parte externa del mismo, contiene un área fácilmente identificable, conocida como hilum que tiene un color distinto al resto de la cobertura del grano (Figura 4) (Caisini, 2012).

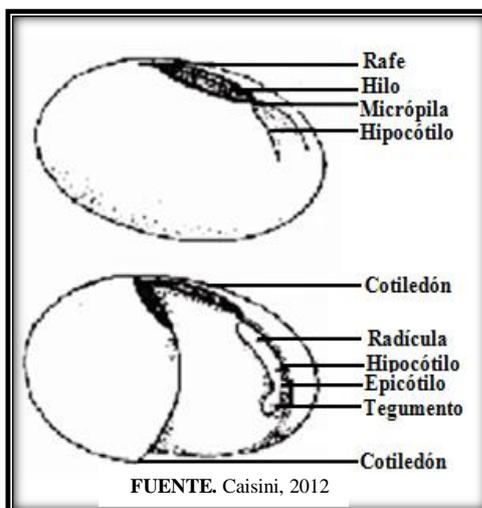


Figura 4. Morfología del grano de soya



Debido a la morfología del grano, la Soya posee el eje hipocótilo-radícula muy expuesto debajo del tegumento, por lo que un daño mecánico puede determinar la imposibilidad futura de germinar y la merma de peso por su desprendimiento. Este problema es de menor relevancia en aquellos granos que son morfológicamente frutos (Maíz, Girasol, Sorgo), ya que la menor exposición del embrión como resultado de la presencia de mayor cantidad de tejido materno, determina un mejor comportamiento. A causa de la estructura del grano de soya, su tegumento se desprende fácilmente, siendo ésta una causa de pérdida de peso, ya que los tegumentos desprendidos en general se pierden y los cotiledones se vuelven más frágiles. (Figura 5) (Caisini, 2012).

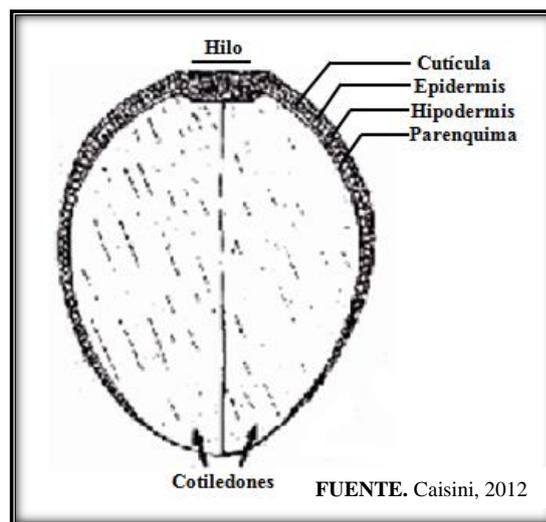


Figura 5. Corte transversal del grano de soya

Normalmente, los granos más grandes son los más susceptibles al deterioro. Esto se debe a que la cantidad de tegumento está predeterminada genéticamente, independientemente del tamaño que tendrá el grano. Además de una condición genética, este tamaño depende de las condiciones climáticas durante el desarrollo del cultivo. Años secos, dan granos comparativamente más pequeños, y tienen tegumento más grueso dentro de una misma variedad (Caisini, 2012).

1.2.4 Composición química

Como sucede con la mayoría de los alimentos provenientes del campo, la composición química de la soya depende de muchos factores, tales como el tipo de suelo, la irrigación, la fertilización, la temperatura ambiental, etc.; en el Cuadro 4 Se muestra la composición promedio de esta leguminosa.

**Cuadro 4.** Composición de la soya y sus partes (%)

| | Proteína (N X 6.25) | Grasa | Hidratos de carbono | Cenizas | Constituyente de la semilla |
|-------------------|--------------------------------|--------------|--------------------------------|----------------|--|
| Soya total | 40 | 21 | 34 | 4.9 | - |
| Cotiledón | 43 | 23 | 29 | 5.0 | 90 |
| Cascarilla | 9 | 1 | 86 | 4.4 | 8 |
| Hipocotilo | 41 | 11 | 43 | 4.3 | 2 |

FUENTE: Badui, 2006

1.2.5 Importancia de la soya en alimentos

La soya es uno de los cultivos más importantes, cuya producción aumenta a grandes pasos en el mundo, ya que contribuye significativamente a la nutrición humana en general, tanto por las calorías como por las proteínas que aporta (Ridner, 2006).

La proteína de soya es excepcional con respecto a otras de origen vegetal porque su calidad es igual o equivalente a la de origen animal (Rand y col., 2003) lo cual ha sido de suma importancia tanto para los países desarrollados como para aquellos en vías de serlo. Para estos últimos, los alimentos de soya representan una fuente económica de energía ya que proporcionan proteína sin el porte de grasa saturada y colesterol, muy común cuando se consumen las fuentes tradicionales de origen animal. Además los alimentos a base de soya, que conservan su contenido de grasa son valiosas fuentes de ácidos grasos esenciales: el Ω -6 (ácido graso linoleico), y el Ω -3 (ácido graso α -linolénico). El ácido linoleico reduce los niveles sanguíneos de colesterol, y el α -linolénico puede tener beneficios coronarios independientes (Brouwer y col., 2004; Hayes, 2000).

Los excelentes atributos nutricionales de los alimentos de soya, sin embargo, no son el principal responsable del reciente aumento del consumo que ha ocurrido en muchos países. Más bien, este incremento se debe a que la soya se asocia con beneficios de la salud en una variedad de áreas que incluyen la enfermedad de osteoporosis y el cáncer. Sin embargo, recientemente ha habido algunos cuestionamientos a la imagen saludable de estos alimentos: se han formulado preguntas acerca de la eficacia de los mismos en la reducción del riesgo de enfermedades crónicas y sobre su seguridad. Por lo tanto, se ha



generado confusión en torno al papel de los productos de soya en una dieta saludable (Ridner, 2006).

1.2.6 Producción de Soya

México es considerado el cuarto importador de soya a nivel mundial, después de China, la Unión Europea y Japón. Las importaciones de México equivalen a 4.5% de la soya que se comercializa a nivel mundial y en el 2009, se estima que México importó 3.5 millones de toneladas (mdt), destinando 98% al sector pecuario, debido a que la producción es menor a su consumo (SAGARPA, 2010).

El cultivo de soya en México tiene posibilidades de crecimiento en regiones con limitantes de agua para riego, a través de variedades tolerantes a la sequía mediante la integración de productores con industriales, asociaciones de porcicultores y avicultores, así como el uso de esquemas de agricultura por contrato, incluyendo la utilización de coberturas de precios put y call, acompañada de tecnología y el uso de fertilización adecuada (SAGARPA, 2010).

La producción mundial de soya para el año agrícola 2010 y 2011 fue de 251.3 millones de toneladas, 8.4 millones de toneladas menos que el año anterior, representando una disminución de 3.3%; lo anterior se debe a la disminución de superficie sembrada y a la reducción de la productividad en países como Brasil y Argentina (SAGARPA, 2010).

Por otra parte, la cosecha de soya de Argentina fue de 50 millones de toneladas, 4.5 millones de toneladas menos que el año 2009 y 2010, debido a la disminución de la superficie de siembra, que fue desplazada por otros cultivos competidores de esta oleaginosa, como los granos o el girasol (SAGARPA, 2010).

Para Brasil la producción fue de 65 millones de toneladas; 4 millones menos que la cosechada el año anterior, ya que a pesar de haber aumentado la superficie de siembra, esta fue contrarrestada por un menor rendimiento (SAGARPA, 2010).



1.3 Mejoramiento genético

En esencia, todas las propiedades de los organismos dependen de la suma de sus genes; los primeros estudios de Watson y Crick, 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 (Smith, 2004).

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 (Bains, 2004; Smith, 2004).

La genética clásica fue, hasta hace 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 (Batista y col., 2005; Smith, 2004)

1.3.1 Mejoramiento Genético del maíz

En México, el mejoramiento genético del maíz se inicia en 1937, comienza a apoyarse y a ser institucional de manera continua desde 1943, formándose en términos globales la misma cantidad de híbridos que de variedades de polinización libre. Se considera que un 25% de los incrementos obtenidos en las cuatro primeras décadas se puede atribuir al mejoramiento genético que en la actualidad es el 50%. Las condiciones montañosas de



México obligan a un enfoque por nichos ecológicos requiriéndose en un esquema radical para impactar en un mayor número de productores (López, 2003). Un elemento adicional a considerar es la disponibilidad de capital y la capacidad de inversión del productor agrícola; lo anterior implica prácticamente diseñar maíces diversos en su uso y el destino de la producción; desde sus inicios, se ha realizado para las regiones con mayor potencial de producción en el país, aunque a partir de 1966 se inició un programa de mejoramiento genético en la región temporalera Norte-Centro de México (Castillo, 2002).

La importancia del uso de semillas mejoradas es un elemento clave en todos los países para alcanzar niveles competitivos en la producción. En México y Centro América, el uso de la semilla mejorada de maíz es aún muy bajo. A excepción del Salvador, donde el uso de la semilla híbrida supera el 50% de la superficie total sembrada, el resto de países de la región registran un bajo uso de semilla mejorada, sembrándose una proporción importante de esta superficie con variedades de polinización libre (VPL), y muy poco con semilla híbrida. En México cada año se siembran de 7 a 8.4 millones de hectáreas de maíz (Sánchez y col., 1998)

1.3.2 Mejoramiento genético de la soya

Los avances de la biotecnología y de la ingeniería genética han sido enormes en los últimos años, y muchos de estos conocimientos se han aplicado a la soya, tanto en su producción básica de grano, como en la modificación de su composición química. La primera acción se tomó en la década de 1990 al lanzar al mercado una semilla resistente a herbicidas, de tal forma que estos agentes químicos actúan y controlan las hierbas, sin afectar a la planta. Otros avances incluyen la resistencia a los ataques por virus e insectos, la adaptación a condiciones específicas de cultivo, incremento en los rendimientos por hectárea, etcétera (Badui, 2006).

Por otra parte, también se han desarrollado algunas semillas modificadas cuyo patrón de ácidos grasos de aceite ha sido cambiado; así se pueden producir aceites con bajo ácido linolénico y una mayor estabilidad a la oxidación; aceites con mayor contenido de ácido oleico; aceites altos en ácido esteárico; etcétera (Badui, 2006).



1.4 Perspectivas y evaluación del maíz y soya genéticamente modificados

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 mismos¹. 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 (Barahona y col., 2004).

En principio, algunas experiencias de divulgación y el análisis somero de la cobertura de prensa sobre este tema sugieren que existe un considerable grado de desconocimiento, tanto en el público general como en los grupos empresariales (Barahona y col., 2004). 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 (Sadava y col., 2003).

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

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.



mayoritariamente de cultivos intensos de temporal; almacenamiento rústico y empaque en zonas industriales (Angonesi y col., 2005).

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 (Appel, 2010).

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 cultivadas como silvestres para las cuales dichas transformaciones genéticas no fueron diseñadas. En el caso de los cultivos de maíz o soya 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 locales o criollas y hacia los parientes silvestres que se encuentren en México, y 2) las consecuencias biológicas de esta introgresión (Aréchaga-Ocampo y col., 2001).

1.5 Biotecnología e ingeniería genética en plantas

1.5.1 Biotecnología

La **Biotecnología** incluye cualquier técnica que utilice organismos vivos o partes de ellos para fabricar o modificar productos, *mejorar plantas o animales*, desarrollar microorganismos para usos específicos, entre otros (Lacadena y col., 2001). Así mismo, tiene la capacidad de cambiar a la comunidad industrial del siglo XXI debido a su potencial para producir cantidades prácticamente ilimitadas de:

- Sustancias a las que nunca se había dispuesto antes;
- Productos que se obtienen en cantidades pequeñas;
- Productos con coste de producción mucho menor que el de los fabricados por medios convencionales;
- Productos que ofrecen mayor seguridad que los hasta ahora disponibles;
- Productos obtenidos a partir de nuevas materias primas más abundantes y baratas que las utilizadas anteriormente (Lacadena y col., 2001).

La Ingeniería Genética es parte de la Biotecnología Moderna y es el mejoramiento de los organismos a nivel molecular, la cual, como conjunto de técnicas para modificar el



material genético de un organismo vivo, nace a principios de los setenta con la manipulación de la información genética en el laboratorio, aplicándose inicialmente a la medicina humana y a los microorganismos como modelos de estudio, posteriormente se fue empleando en otros organismos vivos como las plantas y animales para la agricultura y la alimentación, donde ha tenido un impacto trascendental. No obstante, los orígenes de la Ingeniería Genética y la Biología Molecular no son eventos aislados de reciente creación, sino parte de un pasado remoto (Castañeda-Zavala, 2004).

1.5.2 Tecnología del DNA recombinante

La tecnología del DNA recombinante es un conjunto de técnicas moleculares para localizar, aislar, alterar y estudiar segmentos de DNA (Pierce, 2010; Thieman y Palladino, 2010). El término *recombinante* se utiliza porque a menudo el objetivo es combinar DNA de fuentes distintas. La tecnología de DNA recombinante también es denominada con frecuencia como ingeniería genética ó clonación de genes. Estas técnicas son metodologías ligeramente diferentes que están interrelacionadas. La tecnología de DNA recombinante se utiliza normalmente para hacer posible la clonación de genes, mientras que la ingeniería genética a menudo se basa en la tecnología del DNA recombinante y en la clonación de genes para modificar el genoma de un organismo (Pierce, 2010).

1.5.2.1 Enzimas de restricción y plásmidos o vectores de DNA

El desarrollo fundamental que posibilitó la tecnología de DNA recombinante fue el descubrimiento, a fines de la década de 1960, del plásmido de DNA y las enzimas de restricción (endonucleasas de restricción). El plásmido de DNA es una forma circular de DNA autorreplicante que los científicos pueden manipular para transportar y clonar otros trozos de DNA. Las enzimas de restricción, por su parte, reconocen y establecen cortes en las cadenas dobles del DNA en secuencias de nucleótidos específicas. Estas enzimas son producidas en forma natural por las bacterias, que las utilizan en la defensa contra los virus. Una bacteria protege su DNA propio de una enzima de restricción mediante la modificación de la secuencia de reconocimiento de manera habitual por el agregado de grupos metilo (Pierce, 2010; Thieman y Palladino, 2010).

Se aislaron tres tipos de enzimas de restricción de las bacterias. Las enzimas de restricción del tipo I y de tipo III cortan el DNA en sitios que están fuera de sus



secuencias de reconocimiento. Las de tipo II reconocen secuencias específicas y cortan el DNA dentro de ellas. Prácticamente todo el trabajo de la genética molecular se hace con enzimas de restricción de tipo II (Pierce, 2010).

Las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción suelen tener de 4 a 8 pb de longitud; la mayoría de las enzimas reconocen una secuencia de 4 a 6 pb. La mayor parte de las secuencias de reconocimiento son palíndromos, es decir, secuencias que se leen igual hacia adelante o hacia atrás. Todas las enzimas de restricción de tipo II reconocen secuencias palindrómicas. Algunas enzimas de restricción cortan el DNA para construir fragmentos de DNA con extremos sobresalientes de una sola hebra denominados extremos cohesivos o pegajosos; las otras enzimas construyen fragmentos con extremos no sobresalientes de doble hélice denominados extremos romos. Las enzimas que producen extremos cohesivos a menudo se prefieren a las cortadoras de extremos romos en muchos experimentos de clonación porque los fragmentos de DNA con extremos cohesivos se pueden unir más fácilmente entre sí. Así el DNA de cualquier fuente, como bacterias, humanos, perros, gatos, plantas, ranas o antiguos restos humanos se pueden digerir por una enzima de restricción en particular siempre que el DNA tenga una posición de restricción para esta enzima (Pierce, 2010; Thieman y Palladino, 2010).

Vectores de clonación

Un vector de clonación es una molécula de DNA replicante y estable a la cual puede adherirse un fragmento de DNA ajeno para introducirlo en una célula. Un vector de clonación eficaz tiene tres características importantes: 1) Un origen de replicación, que asegura que el vector se reproduzca dentro de la célula, 2) marcadores de selección, que permiten seleccionar o identificar todas las células que contiene el vector, y 3) uno o más sitios de restricción únicos dentro de los cuales puede insertarse un fragmento de DNA. Los sitios de restricción utilizados para la clonación deben ser únicos; si un vector se corta en múltiples sitios de reconocimiento y genera varias piezas de DNA, no habrá manera de que estas piezas vuelvan a reunirse después en el orden correcto (Pierce, 2010).

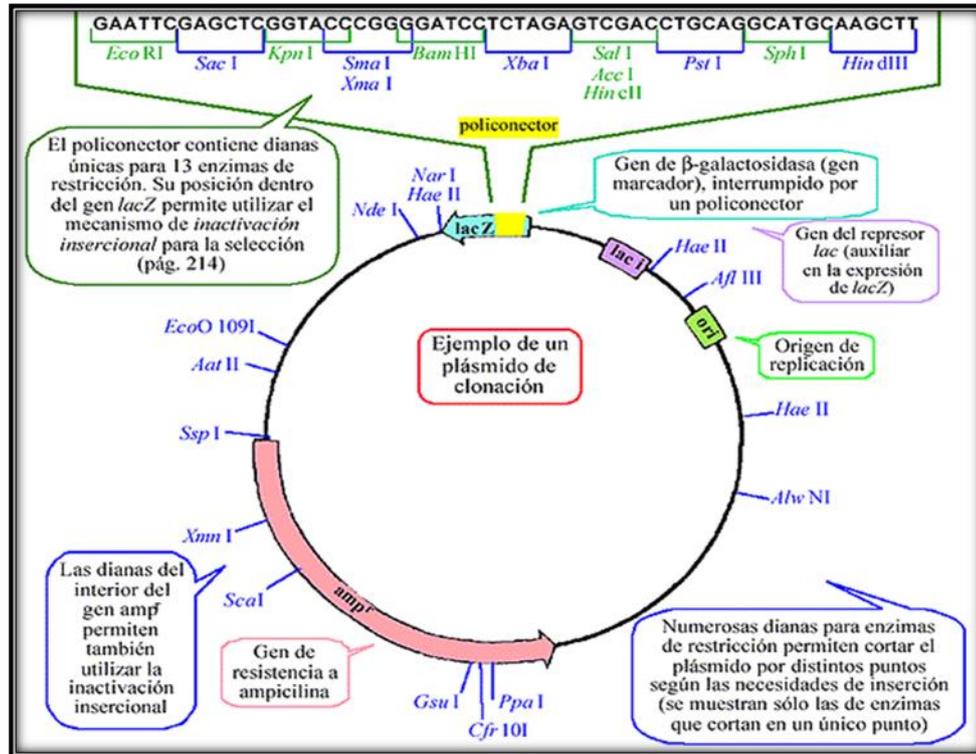
Vectores plasmídicos. Los plásmidos, se suelen utilizar como vectores para la clonación de fragmentos de DNA en estos microorganismos. Contienen orígenes de



replicación y por eso pueden replicarse de manera independiente del cromosoma bacteriano. El método más simple para insertar un gen en un plásmido vector es cortar el DNA extraño (que contiene el gen) y el plásmido con la misma enzima de restricción. Si la enzima de restricción produce cortes escalonados en el DNA, se generan extremos cohesivos complementarios en el DNA ajeno y el plásmido. El DNA y el plásmido se mezclan juntos; algunos de los fragmentos de DNA extraño aparearán sus extremos con los del plásmido. Se utiliza entonces la DNA ligasa para sellar las uniones en el esqueleto de azúcares fosfatados, por lo que se genera un plásmido recombinante que contiene al fragmento de DNA ajeno (Pierce, 2010).

Uso de marcadores de selección. Las células que portan plásmidos recombinantes pueden detectarse mediante el empleo de marcadores de selección en el plásmido (Pierce, 2010). Un tipo de marcador de selección utilizado con frecuencia es una copia del gen *lacZ* (Figura 6). Este gen contiene una serie de sitios de restricción únicos en los cuales puede insertarse un fragmento de DNA para ser clonado. En ausencia de un fragmento insertado, el gen *lacZ* es activo y produce β -galactosidasa. Cuando se inserta DNA extraño en el sitio de restricción, se altera el gen *lacZ* y la β -galactosidasa no se produce. El plásmido también suele contener un segundo marcador de selección, que puede ser un gen que confiere resistencia a un antibiótico como por ejemplo la ampicilina (Pierce, 2010; Thieman y Palladino, 2010).

Se induce la transformación de bacterias que son *lacZ* y se las cultiva en placas con un medio que contiene ampicilina. Solo las células que se transformaron con éxito y contienen el plásmido con el gen de resistencia a la ampicilina sobrevivirán y crecerán. Algunas de estas células contendrán el plásmido intacto, mientras que otras contendrán el plásmido recombinante. El medio también incluye la sustancia X-gal, que produce una sustancia de color azul cuando es degradada. Las células bacterianas con un plásmido original intacto (sin el fragmento insertado) tienen el gen *lacZ* funcional y pueden sintetizar β -galactosidasa, la que corta a la X-gal y torna azules a las bacterias. Sin embargo, las células bacterianas con el plásmido recombinante tienen interrumpido el gen para β -galactosidasa por el DNA insertado; por lo tanto no sintetizan β -galactosidasa y permanecen blancas. Así, el color de la colonia permite la determinación rápida de la presencia o no de un plásmido recombinante o intacto en la célula (Pierce, 2010; Thieman y Palladino, 2010; Luque y Herráez, 2001).



FUENTE. Luque y Herráez, 2001

Figura 6. Plásmido recombinante

Los plásmidos constituyen vectores de clonación ideales, pero pueden contener sólo DNA con un tamaño menor de alrededor de 15kb. Cuando se insertan fragmentos mayores de DNA en un vector plásmido, éste se torna inestable (Pierce, 2010).

Vectores bacteriófagos. Se han desarrollado otros vectores para clonar porciones grandes de DNA en bacterias y otros que permiten la inserción de genes en las células eucariontes. La bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, que invade las plantas a través de heridas e induce la formación de tumores (*crown galls*), se ha empleado para transferir genes a las plantas. Esta bacteria contiene un plásmido grande denominado plásmido Ti, parte del cual se transfiere a la célula vegetal cuando *A. tumefaciens* infecta a la planta. En ésta parte del plásmido Ti se integra en uno de los cromosomas de la planta, donde se transcribe y traduce para producir varias enzimas que ayudan a mantener la bacteria (Pierce, 2010).

1.5.2.2 Clonación de genes

Para poder llevar a cabo los métodos de DNA recombinante hacen falta numerosas copias de un fragmento específico de DNA. Una manera de obtener estas copias es colocar el fragmento en una célula bacteriana y permitir que la célula replique el DNA



(Pierce, 2010). Este procedimiento se denomina clonación génica porque se producen copias idénticas (clones) de la pieza original de DNA y generalmente se lleva a cabo en siete etapas (Figura 7); la primera es la preparación del DNA donde el gen, fragmento de gen o fragmento de DNA que se quiere clonar es aislado de la muestra, el corte del DNA específico se lleva a cabo con enzimas de restricción; en la segunda etapa se prepara el vector de clonación que puede ser un plásmido, un cósmido o un virus. Su propiedad esencial es que sean autoreplicativos; la tercera etapa es la unión del DNA al vector. Habiendo cortado el DNA y el vector con una misma endonucleasa de restricción, ambos pueden unirse gracias a una ligasa. Al conjunto vector + inserto se le llama DNA recombinante; en la cuarta etapa se lleva a cabo la transformación de las bacterias donde el rDNA (DNA recombinante) se les introduce empleando métodos diversos, los más comunes son microinyección, lipofección y electroporación. Una vez que se llevó a cabo la transformación se prepara un cultivo en placas de agar para formar las colonias (clones). El vector se replica al dividirse la bacteria y también de forma autónoma. Con ello aumenta el número de copias. Cada bacteria haya incorporado o no un vector y un DNA recombinante, se multiplica para dar lugar a un “clon”, población de bacterias con idéntico material genético; la quinta y sexta etapa son simultáneas donde ocurre la propagación celular y selección (de las células que han incorporado el gen de interés) (Luque y Herráez, 2001).

No todas las bacterias incorporan el gen de interés formando parte del vector recombinante. Se seleccionan las que si lo hayan hecho, normalmente cultivándolas en un medio con antibiótico, si en el vector se incluyó el gen de resistencia a ese antibiótico; la séptima etapa es cuando el DNA clonado se expresa (Luque y Herráez, 2001).

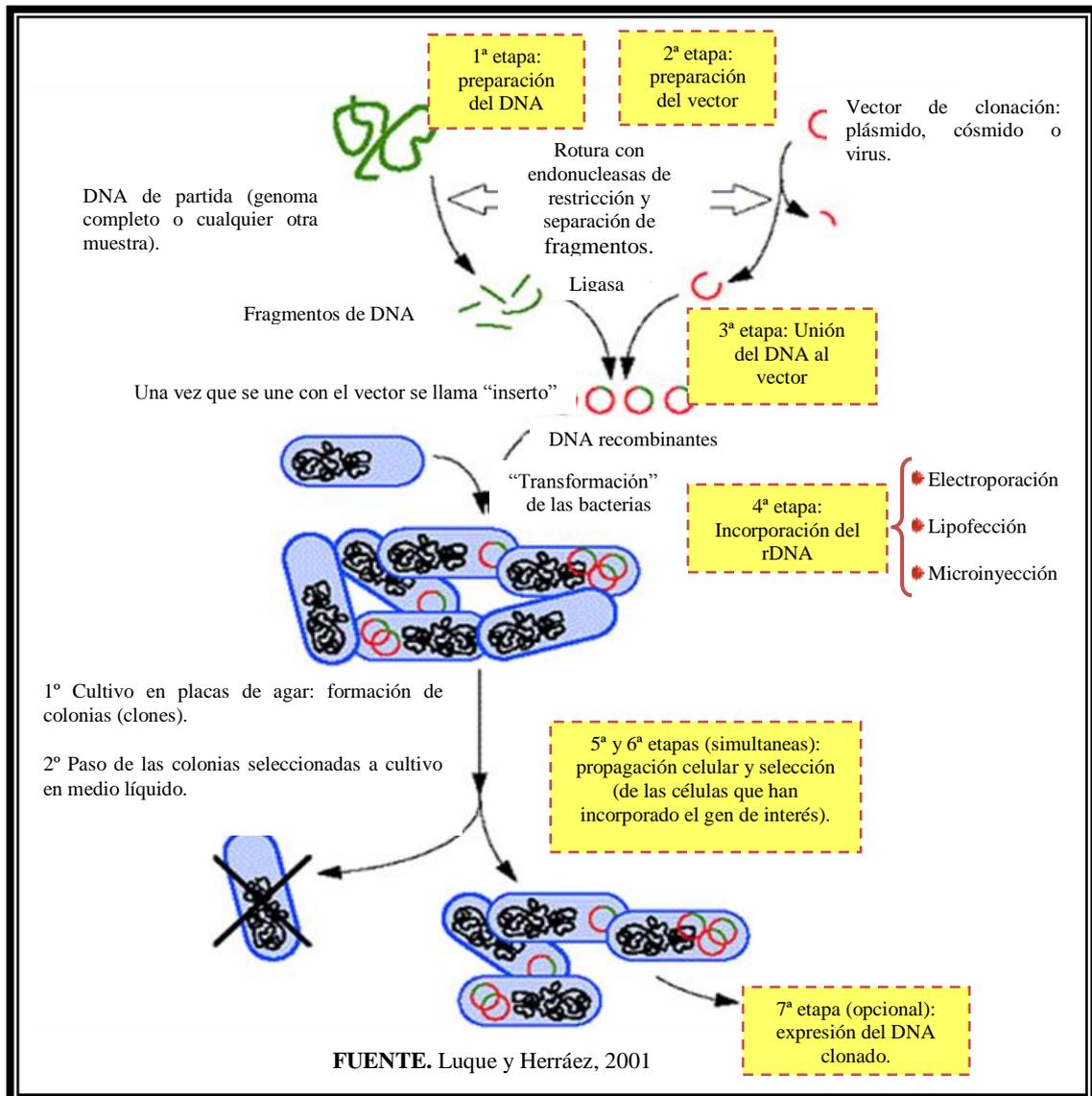


Figura 7. Esquema general del procedimiento de clonación

A veces el objetivo en la clonación genética no es sólo replicar el gen, sino también producir la proteína que codifica. Para garantizar la transcripción y la traducción suele insertarse el gen extraño en un vector de expresión que, además del habitual origen de replicación, los sitios de restricción y los marcadores de selección, contiene secuencias necesarias para la transcripción y la traducción en las células bacterianas (figura 8) (Pierce, 2010).

Aunque la manipulación de los genes en las bacterias es simple y eficiente, el objetivo puede ser transferir un gen a una célula eucarionte. Por ejemplo, puede desearse transferir a un cultivo un gen que confiera resistencia frente a insectos o a herbicidas (Pierce, 2010).

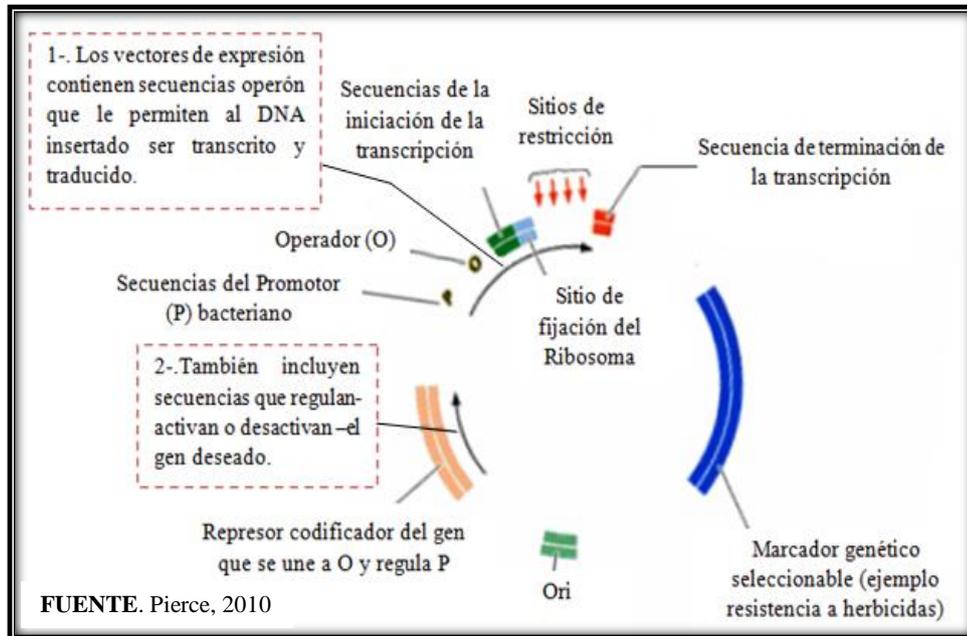


Figura 8. Vector de expresión al cual se le puede insertar un gen extraño para garantizar la transcripción y traducción

Uso del promotor CaMV y el terminador T-NOS en la ingeniería genética de plantas

Los Promotores que la ingeniería genética ha empleado con mayor frecuencia son, el promotor iniciador conocido como Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) y el terminador de la Nopaline Synthase de *Agrobacterium Tumefaciens* (T-NOS), ambos elementos son secuencias de DNA natural en hortalizas y microorganismos que han permitido la detección cualitativa de los eventos transgénicos basada en la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa que utiliza primers que reorganizan regulatoriamente la región que se deriva de los promotores (Cankar y col., 2008; Khachatourians y col., 2002; Vijayakumar y col., 2009)

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 (Tagu y col., 2006). 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 (Stefanov y col., 1994).

El promotor 35S es un promotor constitutivo muy fuerte, que provoca altos niveles de expresión de genes en las plantas dicotiledóneas. 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 (Figura 9) (Patent Lens, 2010).

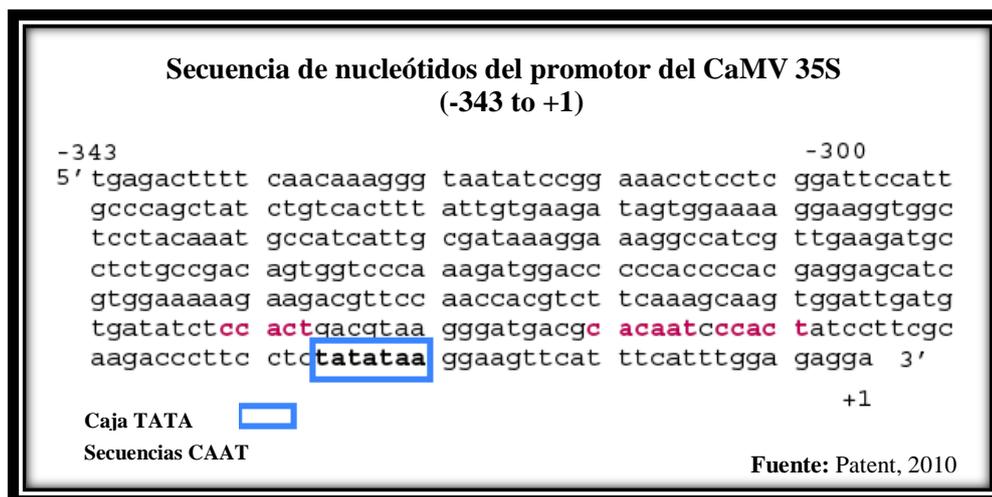


Figura 9. Secuenciación del Promotor 35S del Virus del Mosaico de Coliflor (CaMV).

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 (Patent, 2010).

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 (Ortiz, 2002).



1.5.3 Métodos y técnicas de transformación de 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 (Gutiérrez-Rosati, 2008). 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 (Perera y col., 2002).

El proceso de transformación genética comprende varias etapas bien definidas: inserción, Integración, expresión y herencia del nuevo ADN. Los métodos de inserción de genes pueden requerir el uso de vectores bacterianos o virales y de transferencia directa de genes. Estas técnicas utilizan construcciones similares de genes, que comprenden promotores bacterianos o víricos ligados con genes apropiados. Tanto la transferencia mediante vectores como la transferencia directa de genes tienen un papel que desempeñar en la transformación de especies monocotiledóneas y dicotiledóneas, y el método elegido depende generalmente de la especie vegetal y de su respuesta a la regeneración del cultivo del tejido (Miles y col., 1998).

A continuación se resumen los pasos más importantes de estos métodos.

- **Transformación de discos de hojas**

Esta técnica es una excelente alternativa para 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 (Perera y col., 2002).



- **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 (Perera y col., 2002).

- **Infección con *Agrobacterium tumefaciens***

A. tumefaciens es una bacteria que suele estar en el suelo, infecta a las plantas e introduce genes foráneos en sus células. En el lugar de la infección de la planta se desarrolla una protuberancia de tejido canceroso denominado agalla de corona (Figura 10). En estas agallas, las bacterias invasoras metabolizan opinas, un grupo derivado de aminoácidos. En esencia, el metabolismo de la célula vegetal se desvía para satisfacer al intruso.

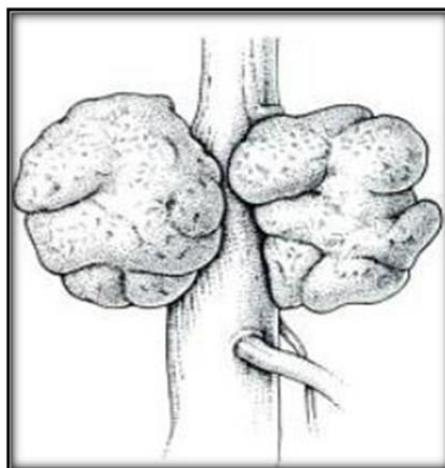


Figura 10. Tumores en plantas. La bacteria *A. tumefaciens*, portadora de un plásmido inductor de tumores (plásmido Ti), provoca la agalla de corona, un tumor vegetal.



Los plásmidos inductores de tumores (plásmidos Ti, del inglés “*tumor-inducing plasmids*”) que alberga a *A. tumefaciens* contiene las instrucciones para la transición al estado tumoral y la síntesis de opinas. Una pequeña fracción del plásmido Ti se integra en el genoma de las células vegetales infectadas: este fragmento de 20kb se denomina T-DNA (DNA transferido) (Jeremy y col., 2008).

Es posible utilizar derivados del plásmido Ti como vectores para la introducción de genes foráneos en células vegetales. En primer lugar, mediante enzimas de restricción y ligasas, se inserta un fragmento de DNA foráneo en la región T-DNA de un plásmido pequeño. Este plásmido sintético se añade a colonias de *A. tumefaciens* que albergan los plásmidos Ti que se encuentran normalmente en la naturaleza. La transferencia del plásmido Ti es efectiva en las dicotiledóneas (plantas de hoja ancha) y en unas pocas monocotiledóneas, pero no en los cereales, monocotiledóneas de importante valor comercial (Jeremy y col., 2008).

- **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 (Perera y col., 2002).

- **Transformación con microproyectiles (biobalística)**

El término biobalística deriva de la conjunción de “biología y balística” o “balística biológica” y es una técnica especial que utiliza minúsculas esferas de metal como balas que, disparadas por un mecanismo adecuado, pueden penetrar en una célula intacta sin destruirla. Para que las micropartículas puedan atravesar las membranas celulares y



llegar al núcleo de las células blanco, son impulsadas a gran velocidad por explosión de pólvora seca, liberación de gas comprimido a alta presión (aire, helio, CO₂ o N₂), o por una descarga eléctrica de una gota de agua. Una vez dentro del tejido vegetal el ADN se desprende de las micropartículas debido a las modificaciones del entorno iónico. Las balas, de entre 0.4 y 4 µm de diámetro, suelen ser de tungsteno de oro (Figura 11) y el DNA que se desea introducir es precipitado sobre ellas con cloruro de calcio. 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 (Perera y col., 2002).

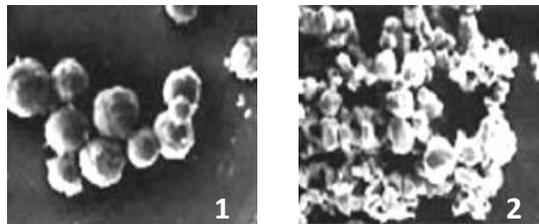


Figura 11. Micropartículas de oro (1) y tungsteno (2)

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 (Perera y col., 2002).

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" (Conocimientos Web, 2010). 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) (Sector Agroalimentario, 2003).



- **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 (Perera y col., 2002).

Una vez realizada la transformación genética en plantas por cualquiera de los métodos antes mencionados, se debe realizar el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, con el fin de regenerar plántulas a partir del explanto inicial transformado, proceso que se sustenta en el principio de “totipotencialidad celular”.

1.5.4 Cultivo de células y tejidos vegetales

El cultivo de células y tejidos vegetales se refiere al conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos (Calva y Ríos 1999). Estas técnicas pueden ser utilizadas como herramientas para micropropagación, propagación rápida de clones, eliminación de virus y enfermedades, producción de haploides, aislamiento y utilización de protoplastos, cultivo de embriones, producción de fitoquímicos, ingeniería genética, mutación y selección celular, producción de semillas sintéticas, estudios básicos de anatomía, desarrollo, fisiología y nutrición vegetal. Se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Ferl y Paul, 2000).

Pasos para generar plantas a partir de explantos aislados

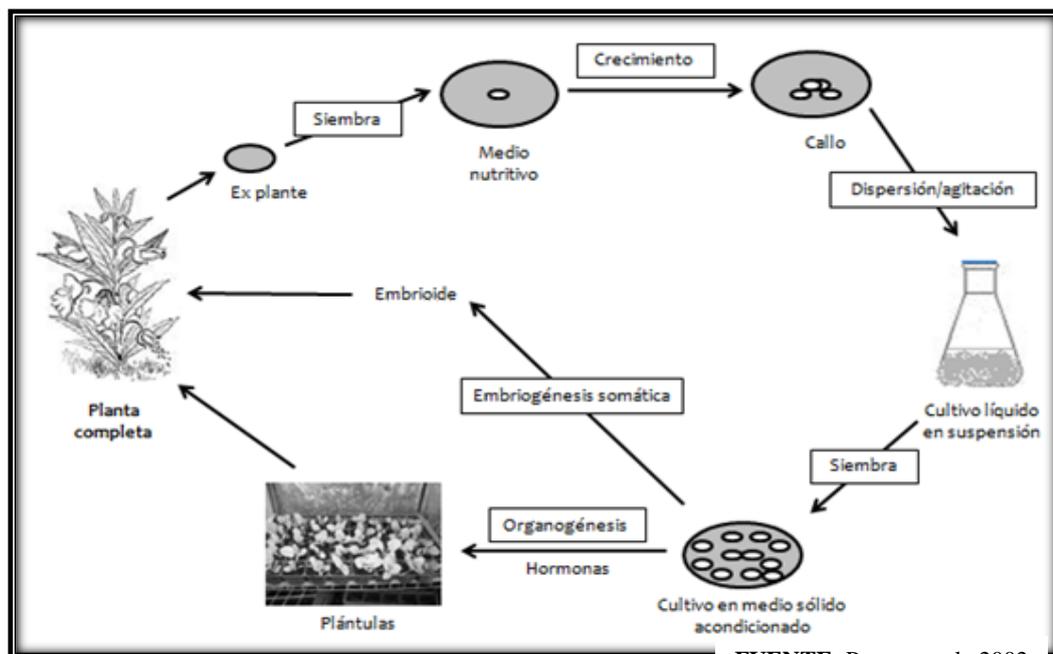
En los protocolos utilizados durante el cultivo *in vitro*, se pueden distinguir las siguientes etapas (Calva y Ríos 1999; Ferl y Paul 2000):

- 1) Elección de la planta y/o tejido donante de explantos.
- 2) Establecimiento: desinfección de los explantos (generalmente con hipoclorito de sodio) y su posterior adaptación al medio artificial a modo de inducir callo, brote, raíz o embrión somático, según se desee.



- 3) Multiplicación: generar una masa vegetal suficiente para la regeneración del número de plantas necesarias.
- 4) Enraizamiento: formación de raíces con el fin de convertir los brotes o embriones somáticos en plántulas completas.
- 5) Rusticación: aclimatación de la plántulas obtenidas in vitro a las condiciones medioambientales ex vitro (suelo o algún sustrato inerte).

El cultivo de tejidos vegetales se lleva a cabo por diversos métodos (Figura 12) los cuales se describen a continuación:



FUENTE: Perera y col., 2002

Figura 12. Tipos de manipulación y cultivos *in vitro* de sistemas vegetales

- 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 (Perera y col., 2002).



- 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 (Perera y col., 2002).
- 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* (Perera y col., 2002).
- 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 (Perera y col., 2002).



- 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 (Perera y col., 2002).

1.5.5 Acuerdos internacionales y regulación en México sobre el uso de Transgénicos

La utilización y liberación al ambiente de los OGM, ha despertado cuestionamientos y generado conciencia mundial sobre la importancia de analizar y evaluar responsable y exhaustivamente tomando en cuenta los diferentes factores y los posibles riesgos de la liberación de los OGM al medio ambiente. Lo anterior ha permitido a través de discusiones y procesos de revisión por expertos, la creación de acuerdos internacionales y legislaciones nacionales para el manejo responsable de los OGM (Bolívar, 2011).

Uno de los acuerdos internacionales es el convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) firmado por México, el cual entro en vigor en 1993. En este convenio se encuentra el compromiso de establecer un acuerdo sobre la seguridad de la biotecnología o bioseguridad. Por lo anterior, en el año 2000 se estableció el Protocolo de Cartagena sobre la Seguridad de la Biotecnología (PCSB) del CDB, que fue ratificado por México y que entro en vigor en septiembre de 2004 (Bolívar, 2011)..

Mediante el protocolo de Cartagena, los países firmantes se comprometen a establecer las regulaciones y medidas necesarias para evaluar los movimientos transfronterizos de los transgénicos que pudieran tener efectos adversos sobre la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica o sobre la salud humana (Bolívar, 2011).

Los organismos internacionales más importantes que realizan trabajos de análisis y participan en la discusión y establecimiento de mecanismos de cooperación relacionados con la bioseguridad son, entre otros:



- La organización para la Cooperación y el desarrollo económico (OCDE), que cuenta con un área dedicada a la biotecnología.
- La OMS (Organización Mundial de Salud) que coincide con el proceso de evaluación del riesgo de la liberación de OGM y considera que los diferentes organismos genéticamente modificados (GM) incluyen genes insertados en formas distintas. Esto significa que cada alimento GM y su inocuidad deben ser evaluados individualmente, caso por caso, y que no es posible hacer afirmaciones generales sobre la inocuidad de todos los alimentos GM.
- El Codex Alimentarius quien realiza continuamente evaluaciones de riesgo incluyendo el monitoreo post comercialización.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) en conjunto con la OMS han avalado los protocolos de las organizaciones para las pruebas de alimentos GM (Bolívar, 2011).

Es relevante señalar que a la fecha, 27 países tienen cultivares transgénicos y que el área cultivada aumenta cada año (Bolívar, 2011).

1.6 Métodos para la autenticación de alimentos

La autenticación consiste en la identificación de los componentes de un producto y la confirmación de su procedencia (López y col., 2003). Diversas técnicas electroforéticas y cromatográficas tales como la de ELISA, Western Blot, Electroforesis capilar y HPLC han sido utilizadas para la identificación de especies específicas en diferentes productos (Hurley y col., 2004; López-Calleja y col., 2007). Estas técnicas enfocadas al análisis de proteínas o ácidos grasos son efectivas pero tienen lugar algunas limitantes. Los métodos electroforéticos e inmunológicos al basarse en el análisis de proteínas disminuyen su sensibilidad con productos tratados térmicamente, además de no ser tan efectivos ya que dichos productos presentan matrices complejas. Las técnicas cromatográficas presentan una alta sensibilidad para diferenciar el perfil de ácidos grasos de especies específicas pero son muy costosas y requieren de un mayor tiempo y trabajo (Sachinandan y col., 2011).

Entre los métodos que se han utilizado con mayor frecuencia para la autenticación de alimentos se encuentran los siguientes:



1.6.1 Métodos de análisis basados en la detección de proteínas

La detección de proteínas puede realizarse en muestras de alimentos frescos o procesados, siempre y cuando el procesamiento no haya afectado a las proteínas de la muestra. Por este motivo, las técnicas moleculares que suponen el manejo de proteínas pueden aplicarse en aquellos casos en los cuales se dispone de muestras con alto contenido proteico y en cantidad suficiente (López y col., 2003).

Las técnicas basadas en el análisis de proteínas actualmente utilizadas son:

-  Elisa
-  Electroforesis
-  Cromatografía líquida
-  Isoelectroenfoque
-  Western Blot

Los métodos de identificación de proteínas (técnicas electroforéticas, cromatografía líquida, inmunoensayos), algunos de ellos incluso de reciente desarrollo, están siendo reemplazados por técnicas basadas en el análisis de DNA, principalmente debido a la degradación que sufren las proteínas al desnaturalizarse durante el procesamiento. Los análisis basados en el DNA parecen ser los más adecuados para la identificación de especies en alimentos, así lo muestran tanto los trabajos publicados como las recientes patentes. En el caso de la detección de organismos transgénicos, esta se lleva a cabo mediante el análisis de proteínas o de marcadores de DNA dependiendo del costo del ensayo, sensibilidad requerida, y tipo de identificación (Lockley y Bardsley, 2000; López y col., 2003).

1.6.2 Métodos de análisis basados en la detección de DNA

Los métodos analíticos basados en la detección de DNA suelen emplearse cuando el alimento ha sido procesado o tratado fisicoquímicamente (calor, presión, etc.), ya que la proteína puede haberse desnaturalizado o degradado en el proceso, y los métodos analíticos de proteína se ven afectados por estos cambios. El DNA, en cambio, puede haberse fragmentado durante el procesado en trozos pequeños pero esto no implica que no puedan ser detectados. Aunque el DNA también se degrada durante la esterilización



por calor en el proceso de enlatado de alimentos, todavía es posible obtener pequeños fragmentos con suficientes diferencias de secuencias como para hacer posible la diferencia entre especies cercanas. El DNA utilizado en la identificación de especies es generalmente DNA mitocondrial, aunque también se utilizan secuencias de DNA procedentes de genes de la familia lactina. Ambos tipos de secuencias cumplen con las características necesarias para ser utilizados como indicativos de especie, al estar presentes en todas las especies y presentar una gran variabilidad entre las mismas (López y col., 2003).

1.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (polimerase chain reaction, PCR) es una técnica que ha revolucionado el trabajo en Biología molecular. Descrita a mediados de los años ochenta, por el Premio Nobel Kary Mullis, como en el caso de los métodos de secuenciación rápida de ácidos nucleicos, ha impulsado de forma extraordinaria el avance en las investigaciones en Genética Molecular (Perera y col., 2002). El método de Reacción en cadena de la polimerasa sirve para aumentar la cantidad de DNA que se pretende detectar, por lo cual, la disposición de una cantidad suficiente de DNA es imprescindible para la obtención de resultados fiables. Cabe mencionar que esta técnica puede ser aplicada solamente cuando la secuencia o al menos una pequeña secuencia de DNA es conocida (Sambamurty, 2008).

1.6.3.1 Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El método de PCR consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de DNA de la especie de interés, que muestre diferencia de nucleótidos, incluso en especies relacionadas para que de esta forma pueda ser analizado (Sambrook y Russel, 2001). El proceso requiere el conocimiento previo de la secuencia de dos regiones cortas que flaqueen a la que se pretende amplificar; estas regiones son utilizadas como cebadores o primers en la reacción de elongación catalizada por la polimerasa, para lo cual es necesario previamente conseguir su asociación al DNA molde desnaturalizado (Perera y col., 2002).

La replicación de una molécula ocurre mediante una reacción en la que el par de primers (secuencias de nucleótidos sintéticos elegidos con secuencias complementarias a los finales opuestos de las cadenas simples del fragmento de DNA seleccionado)



dirigen la síntesis de millones de copias del fragmento de interés (Sambrook y Russel, 2001).

La PCR es una reacción en cadena de la polimerasa porque las cadenas de DNA nuevas sintetizadas actúan como molde para la posterior síntesis de DNA en los ciclos subsecuentes. Cada ciclo duplica la cadena de DNA amplificado, de tal manera que se tienen 2^n moléculas de DNA después de n ciclos. En la Figura 13 se ejemplifica la descripción anterior. El número de copias al terminar la PCR se puede estimar como:

$$N = N_0 \times (1 + R)^c$$

Donde:

c = es el número de ciclos.

N = es el número de copias obtenidas,

N_0 = 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)

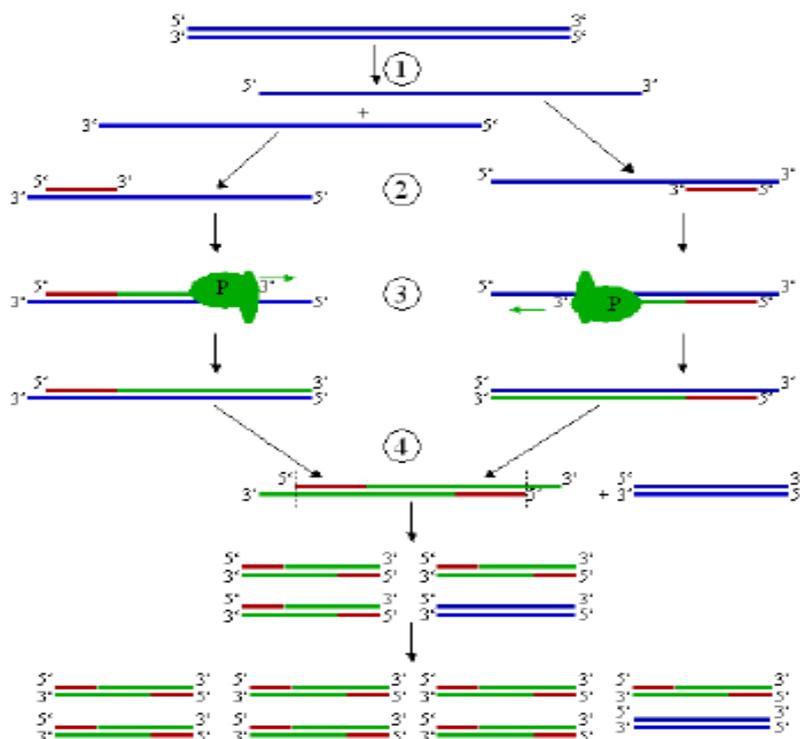


Figura 13. Esquema de la amplificación de una molécula de DNA molde en los ciclos de la PCR. (1) Desnaturalización 94-96°C, (2) Hibridación 68°C, (3) Elongación a 72°C (P= Polimerización), (4) Primer ciclo completado.



1.6.3.2 Etapas de la PCR

El proceso de PCR consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele pasar de 2-3 pasos de temperaturas. La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico (llamado “hold”) a alta temperatura ($>90^{\circ}\text{C}$), y seguido por otro hold al final del proceso para la extensión de producto final o el breve almacenaje (Sambrook y Russell, 2001).

Cada ciclo, que involucre tres reacciones rigurosamente controladas en tiempo y temperatura en los termocicladores automáticos, lleva alrededor de 1-5 min. Los tres pasos en cada ciclo son:

1) La desnaturalización de la doble cadena de DNA la cual debe llevarse a cabo a una temperatura por encima de su punto de fusión ($93-95^{\circ}\text{C}$) para obtener dos cadenas simples de DNA (Passarge, 2004). En esta etapa el calor aumenta la energía cinética de la molécula de DNA, dicha energía es mayor a la necesaria para mantener los enlaces entre los átomos de hidrógeno y las pares de bases lo cual conlleva a la separación de la doble cadena de DNA (Micklos y col., 2003).

2) Hibridación. Durante esta etapa el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello se requiere bajar la temperatura entre 50°C y 70°C dependiendo de la temperatura de fusión esperada del dúplex de DNA, pero esta temperatura debe ser aun lo suficientemente alta para prevenir la hibridación errónea de los cebadores con otras secuencias de gran similitud que se encuentren en otras partes del genoma (Passarge, 2004). El uso de altas concentraciones de cebadores favorecen que esta reacción transcurra con mayor eficiencia que la de re-alineamiento de las hebras de DNA molde (Walker y col., 2006). La temperatura óptima de hibridación varía dependiendo de la proporción de AT y GC (Micklos y col., 2003).

3) Elongación. En esta etapa actúa la DNA polimerasa, tomando el DNA molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis del nuevo DNA. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de DNA complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP's complementarios en dirección $5'-3'$, uniendo el grupo $5'$ fosfato de los dNTP's con el grupo $3'$ -hidroxilo del final de la hebra de DNA creciente (la cual se extiende). La temperatura para esta etapa



depende de la DNA polimerasa que se use. Para la Taq polimerasa (proveniente de microorganismos que viven en regiones calientes como la *Thermophilus aquaticus*) la temperatura de máxima actividad está entre 75-80°C (comúnmente 72°C). El tiempo de extensión depende tanto de la DNA polimerasa usada como de la longitud del fragmento de DNA que se va a amplificar (Sambrook y Russell, 2001; Passarge, 2004).

Una vez que se ha realizado la técnica de PCR, consiguiendo por tanto una cantidad suficiente de DNA procedente de la muestra, se procede a la identificación de secuencias mediante geles de agarosa, hibridación con sondas complementarias (reconocimiento), o técnicas de análisis de poliformismos (comparación de secuencias), también llamadas RFLPS. Éstas últimas se utilizan exclusivamente en la identificación de especies (López y col., 2003).

1.6.3.3 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* (Perera y col., 2002)

Las condiciones típicas para la reacción de amplificación se pueden observar en la Figura 14, en la cual se identifican también 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 (Perera y col., 2002).

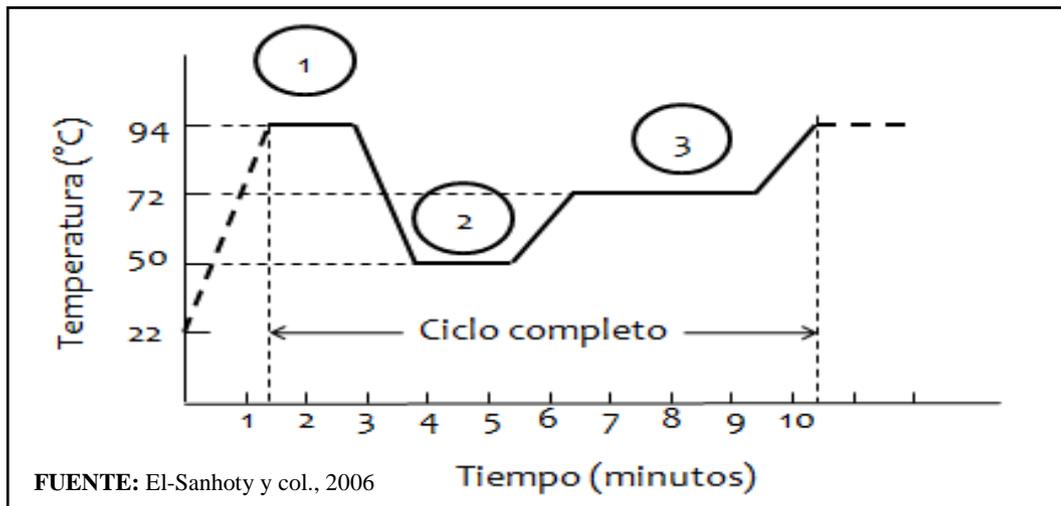


Figura 14 Condiciones de temperatura en un ciclo estándar de PCR.

La duración de cada etapa debe corregirse para incluir el tiempo necesario en 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 (Perera y col., 2002).

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 (Perera y col., 2002).

1.6.3.4 Componentes de la reacción

1) **Par de primers u oligonucléotidos.** El tipo de primer o cebador que se utilice en la PCR dependerá del tipo de identificación que se requiera. De esta forma, se utilizarán cebadores específicos, es decir, diseñados a partir de una secuencia de DNA



conocida previamente y complementarios de la misma, fundamentalmente en la detección de los Organismos modificados genéticamente e identificación de especies. Los cebadores semiespecíficos son aquellos complementarios de elementos repetitivos de DNA, y tienen su principal aplicación en la detección de especies (López y col., 2003).

Para esta última se emplean así mismo cebadores arbitrarios, que no requieren conocimiento previo de su secuencia de DNA. La elección de los cebadores y el tamaño del fragmento amplificado son de gran importancia para el resultado final. El tamaño del fragmento amplificado debe estar en un rango de 80 a 150 pares de bases de DNA procedente de alimentos procesados, y de 250 pares de bases en el caso de alimentos frescos (López y col., 2003).

2) **dNTP's en exceso.** Son nucleótidos sintéticos que no forman ninguna secuencia al inicio de la reacción, es decir, son el sustrato de la enzima DNA polimerasa y serán los componentes de miles de copias del fragmento diana al final de la reacción. Pueden denominarse como dATP's, dTTP's, dCTP's y dGTP's (Sambrook y Russell, 2001).

3) **DNA polimerasa estable.** 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 *T. Aquaticus*, y otra modificada por ingeniería genética y expresada en *E. Coli* (*AmpliTaq*^{MR}). En ambas, la actividad de la polimerasa va acompañada de una exonucleasa 5'----3', pero carecen de exonucleasa 3'----5' por lo que no son capaces de corregir errores producidos en la elongación, que resultan incorporados al fragmento amplificado con una nueva frecuencia de alrededor de uno por cada 10⁴ nucleótidos. Sus propiedades son equivalentes y ambas se utilizan en reacciones de PCR (Perera y col., 2002).

También se comercializan otras polimerasas termoestables, como la polimerasa Vent^{MR}, de *Thermococcus litoralis*, o la polimerasa Pfu, aislada de *Pyrococcus furiosus*, presentadas como enzimas que introducen menos errores y son, por tanto, más fieles en la amplificación; o como algunas retrotranscriptasas termoestables, utilizadas particularmente en la versión RT-PCR (Perera y col., 2002).

4) **DNA a amplificar.** La adición de DNA a la reacción implica su previa extracción de la célula o del tejido y la solubilización en agua. Es requerida una concentración adecuada para lograr una amplificación óptima; si la concentración de



DNA es menor, es probable que no se visualice una banda clara en un gel de agarosa, por otro lado, si la concentración es muy alta, la DNA polimerasa probablemente no podrá actuar sobre las cadenas desnaturalizadas de DNA (Sambrook y Russell, 2001).

1.6.3.5 Limitaciones de la técnica

El gran nivel de amplificación que 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'--5'y, por 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 errores; cualquier dato obtenido por esta vía ha de ser confirmado por el análisis de varios clones independientes, preferiblemente generados en reacciones de PCR diferentes. De esta manera se elimina, la posibilidad de que la incorporación incorrecta se haya producido en las primeras rondas de amplificación y aparezca posteriormente en la mayoría de los clones derivados de la reacción (Perera y col., 2002).

1.6.3.6 Aplicaciones de la PCR

Actualmente las aplicaciones de la PCR son numerosas, debido a que esta técnica ha resultado ser una herramienta de gran ayuda, debido a su alta especificidad y confiabilidad. Algunas de sus aplicaciones son:

Clonación: en el campo de la biología molecular, la PCR se utiliza para la clonación molecular de genes y su secuenciación nucleotídica. La PCR favorece la clonación si se incorporan genes de restricción (Torres y Baca, 1995).



Diagnóstico clínico: en este campo, la PCR se usa en la genética médica para el diagnóstico de enfermedades hereditarias y de algunas cromosopatías comunes; en el campo de la inmunología se emplea para determinar asociaciones entre el complejo mayor de histocompatibilidad y la predisposición genética para el desarrollo de enfermedades autoinmunes; en el campo de la oncología, para probar mutaciones activadoras de oncogenes o supresoras de antioncogenes, para detectar arreglos cromosómicos presentes en procesos neoplásicos y para la detección de virus, entre otros muchos aspectos (Torres y Baca, 1995).

Proceso evolutivo: en este ámbito la PCR se ha aplicado a estudios de secuencias conservadas del DNA, acelerando la reconstrucción de árboles filogenéticos y se ha convertido en el instrumento más accesible para el análisis de especies en vías de extinción (Torres y Baca, 1995).

Alimentos: recientemente, debido a la necesidad que se tiene con respecto a la seguridad del consumidor, y los alimentos que llegan hasta el, en cuanto a la autenticidad de los alimentos procesados y su calidad, se han tenido que desarrollar técnicas eficaces para asegurar estos aspectos en alimentos. Para llevar a cabo dicha práctica se hace uso de manera exitosa de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa ya que esta permite confirmar con fiabilidad y rapidez la calidad y pureza de los alimentos y productos alimenticios, lo que constituye un asunto de vital importancia para las empresas del sector alimentario y la seguridad del propio consumidor (Torres y Baca, 1995).



CAPITULO II. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

2.1 Cuadro metodológico

El cuadro metodológico utilizado para la realización de este proyecto se muestra en la Figura 15.

2.2 Descripción del cuadro metodológico

A continuación se describen los objetivos particulares y las actividades que fueron realizadas para cumplir cada uno de ellos.

2.2.1 Objetivo general

Evaluar la presencia de organismos genéticamente modificados en productos comerciales derivados de maíz o soya, mediante la amplificación de fragmentos específicos de DNA utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener un método rápido de identificación transgénica.

2.2.2 Objetivo particular 1

Extraer el DNA del control positivo (soya y maíz transgénicos), control interno (soya y maíz no transgénicos) y de productos comerciales derivados de maíz o soya, mediante la técnica de Sambrook para su posterior amplificación en PCR.

2.2.3 Objetivo particular 2

Seleccionar el par de primers específicos que delimiten la zona de amplificación de las regiones de interés: CaMV, T-NOS, genes mitocondriales de maíz y soya, mediante el análisis de la secuencia de su DNA para determinar si existe la presencia de organismos genéticamente modificados.

2.2.4 Objetivo particular 3

Comprobar que los primers seleccionados amplifiquen las zonas de interés (citocromo b de maíz y soya, CaMV y T-Nos) utilizando un programa de PCR para su posterior aplicación.



2.2.5 Objetivo particular 4

Aplicar la técnica de PCR, mediante la amplificación de la región específica ya evaluada para la identificación de DNA genéticamente modificado en productos comerciales derivados de maíz o soya.



“Detección de organismos genéticamente modificados en productos derivados de maíz o soya utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)”.

OBJETIVO GENERAL. Evaluar la presencia de organismos genéticamente modificados en productos comerciales derivados de maíz o soya, mediante la amplificación de fragmentos específicos de DNA utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener un método de identificación transgénica.

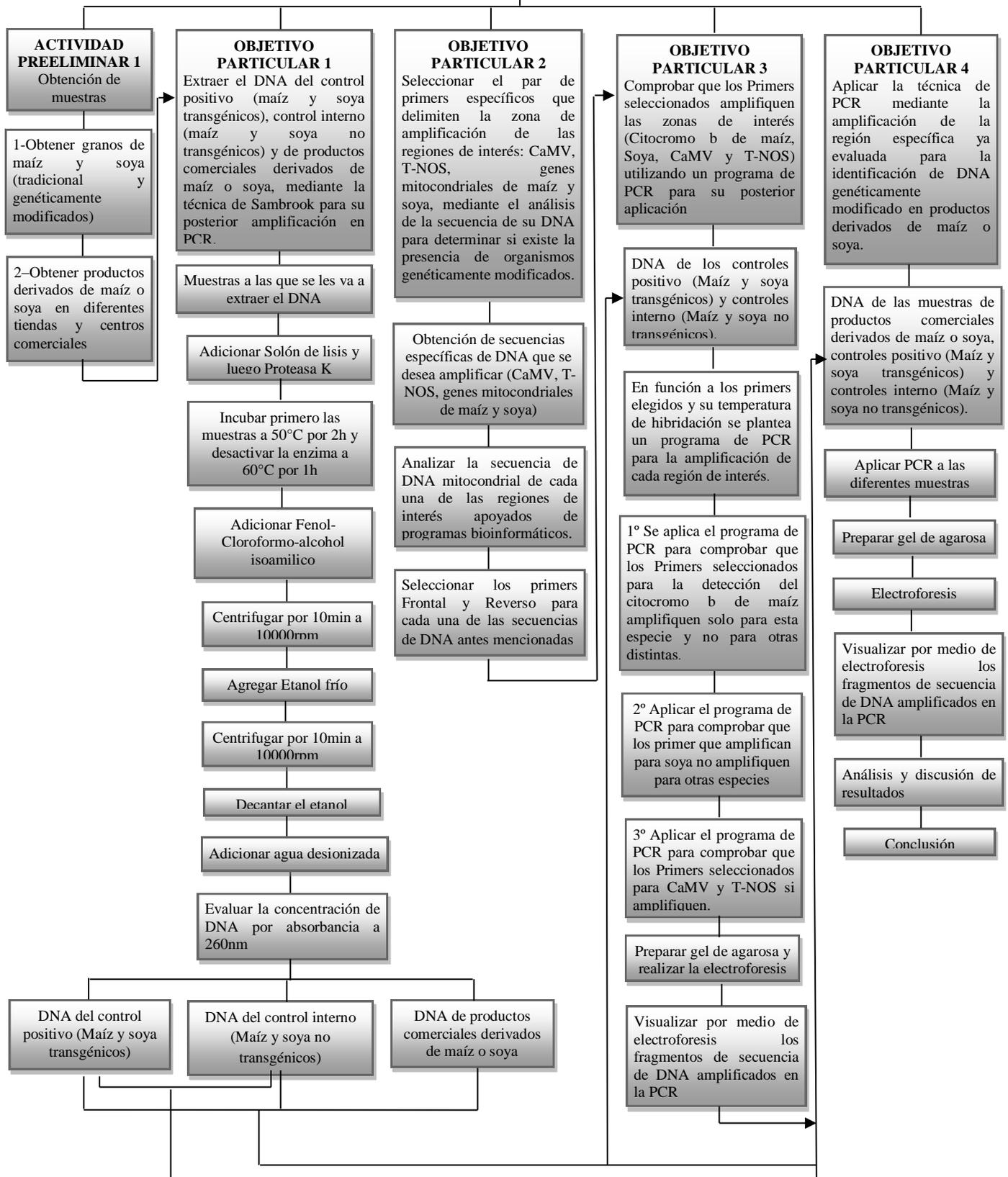


Figura 15. Cuadro metodológico



2.3 Materiales

2.3.1 Material biológico

De acuerdo a lo que se describe en el cuadro metodológico, se requirieron de varias muestras objetivos las cuales fueron obtenidas de diferentes supermercados, tiendas naturistas y tiendas de productos orgánicos. En total se emplearon 11 muestras de productos derivados de maíz y 11 de productos derivados de soya además de granos de maíz (normal y genéticamente modificados) y granos de soya (normal y genéticamente modificada). En el Cuadro 5 y 6 se presentan algunas generalidades de las muestras utilizadas y en la Figura 16 y 17 la imagen de las mismas.

Cuadro 5. Generalidades de las muestras de productos derivados de maíz

| Muestras | Marca | Lote | Caducidad | Contenido Neto | Precio Neto aproximado (\$) |
|-----------------------------------|-------------|------------------------|-----------|----------------|-----------------------------|
| Maíz palomero | La merced | 184791 | 11/13 | 500 g | 9.30 |
| Tostadas de maíz horneadas | Great Value | 010712T1 | 06/05/12 | 240 g | 16.90 |
| Galletas de maíz horneadas | Saníssimo | 4213A16 | 25/04/12 | 18 g | 3.50 |
| Tortillas | *NA | *NA | *NA | 1 kg | 10.0 |
| Takis Huakamoles | Barcel | L19AVBDC1 | 30/05/12 | 68 g | 5.00 |
| Corn Flakes | Nestlé | 1348020802 | 14/09/12 | 726 g | 35.90 |
| Corn Flakes | Maizoro | 40MA14012 | 06/01/13 | 660 g | 30.80 |
| Harina de maíz | Minsa | 111201273 | 27-07-12 | 1 kg | 13.00 |
| Tortillas de maíz | Milpa Real | 50615 15:43 0508 | 09/03/12 | 800 g | 13.50 |
| Elotes | Herdez | LF2 195 15:54 GE 07 | 07/12 | 220 g | 7.10 |
| Sopa de Fideos | Knorr | 2006AM1 | 20/01/13 | 95 g | 10.40 |

*N.A.= No Aplica



Cuadro 6. Generalidades de las muestras de productos derivados de soya

| Muestras | Marca | Lote | Caducidad | Contenido Neto | Precio Neto aproximado (\$) |
|---|-----------------|-----------|-----------|----------------|-----------------------------|
| Polvo para preparar bebida de soya instantánea | Soya Pac | 14031102 | 14/03/12 | 200 g | 39.00 |
| Malteada de Soya | Herbalife | 609702A10 | Oct/2011 | 550 g | 287.00 |
| Frijol de soya | Pronasoya | 18030811 | 03/08/12 | 1 kg | 24.70 |
| Ades | Unilever | 1356C7S | 22/10/12 | 200 ml | 4.50 |
| Soya albóndiga | La Salud | NR | 20/04/15 | 200 g | 31.00 |
| Carne de soya para hamburguesa | Joinish Bros | 200112 | 30/03/12 | 400 g | 39.50 |
| Nuggets de okara | César Soya | *NR | *NR | 400 g | 26.00 |
| Chicharrón prensado | César Soya | *NR | *NR | 500 g | 37.50 |
| Soy Drink | Member's Mark | 11354D1A | 20/09/12 | 1L | 18.00 |
| Alimento de soya con sabor tipo chorizo | Soyamigo | 114448 | Feb/13 | 185 g | 35.00 |
| Guten | Sigma alimentos | 3042D | 08/08/12 | 457 g | 21.65 |

*NR= No reportado

De cada uno 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 líquidas se tomaron 10 mililitros y se pusieron en refrigeración a 4°C mientras eran utilizadas. Posteriormente todas las muestras a excepción de las líquidas fueron molidas y homogenizadas con ayuda de un mortero.



Figura 16. Productos comerciales utilizados para analizar la presencia de maíz transgénico.



Figura 17. Productos comerciales utilizados para analizar la presencia de soya transgénica.



2.3.2 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 20mg/mL
- Mezcla Fenol – Cloroformo – Alcohol isoamílico, en proporción 25:24:1
- Etanol frío.

Reacción en cadena de la polimerasa

Kit para PCR, *Promega* el cual contiene lo siguiente:

- PCR Master Mix (50 unidades de Taq DNA polimerasa, 400 μ M de cada dNTP's y 3 mM de $MgCl_2$).
- Agua libre de nucleasas.

Productos biológicos

- Muestras de DNA de productos derivados de maíz o soya
- DNA de los controles positivo (maíz y soya transgénicos)
- DNA de los controles interno (Maíz y soya no transgénicos)
- Pareja de Primers. La pareja de primers que fueron utilizadas se muestran en el Cuadro 7.

Reacción en cadena de la polimerasa (directo)

Kit de PCR directo para plantas Finnzymes Phire®

Productos biológicos

- Muestras de productos derivados de maíz o soya
- Muestra de los controles positivo (maíz y soya transgénicos)
- Muestra de los controles interno (Maíz y soya no transgénicos)
- Pareja de Primers. La pareja de primers que fueron utilizadas se muestran en el Cuadro 7.



Cuadro 7. Secuencia de primers utilizados para la detección de Cox 2 de soya, Citocromo b del maíz, Promotor CaMV y Terminador T-NOS.

| Especie | Gen | Primers (5' → 3') | Tamaño del amplificado |
|--|-------------|---|------------------------|
| Maíz (<i>Zea mays</i>) | Citocromo b | F: GAAGGGGGCTGGTTGCTCCG R: ATGAGGCGGGGTGGGCATCG | 588 pb |
| Soya (<i>Glycine max</i>) | Cox2 | F: AGCGGGGTAGAGTAATTGGTC R: CAAGGAGCATCGTGAGGAATAG | 305 pb |
| Promotor CaMV 35S (Virus del Mosaico de la coloflor) | | F: GCTCCTACAAATGCCATCA R: GGATAGTGGGATTGTGCGTC | 195 pb |
| Terminador T-NOS (Terminador de la nopaline Sintetasa) | | F: GAATCCTGTTGCCGGTCTTG R: TTATCCTAGTTTGC GCGCTA | 180 pb |

Electroforesis

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

2.3.3 Equipo utilizado

- Balanza analítica electrónica, *Cole parmer PR410 Equipar*
- Agitador Vortex, *Genie K-55-G*
- Microcentrifuga, *Minispin plus eppendorff* 14000 rpm
- Temoblok, *Thermomixer compact Eppendorf*
- Nanoespectrofotómetro, *Accesolab Nano Drop ND-1000*
- Termociclador, *Apollo ATC 401 CLP*



- Cámara de electroforesis
- Cassete de electroforesis
- Fuente poder, Bio-Rad PowerPac 200
- Juego de micropipetas marca *Rainin* de volúmenes desde 0.5 μ l hasta 1000 μ L
- 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

2.4 Métodos

2.4.1 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA de las muestras se utilizó el protocolo descrito por Sambrook, 2001, 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. Primero se llevó a cabo la disgregación de las muestras, en el caso de granos estos se dejaron remojando con agua libre de nucleasas aproximadamente 12 horas antes de su utilización, y con ayuda de un bisturí se retiró sólo el embrión de cada grano. Posteriormente se trituraron cada una de las muestras con ayuda de un mortero. Se pesaron 250 μ g de cada muestra en un tubo eppendorf. En el caso de las muestras líquidas se tomaron 1500 μ L, se centrifugó y se decantó para concentrar los sólidos. Se adicionaron 2000 μ l de solución de Lisis y se agitó con el vortex para homogenizar la muestra. Luego se adicionaron 7 μ l de la enzima proteasa previamente concentrada a 20mg/ml, y se incubaron los tubos a 50°C en el Termoblok por 2 horas. Para desactivar la enzima se aumentó la temperatura a 60°C durante aproximadamente 1 hora.

Para la extracción de proteínas y polisacáridos al tubo con muestra se le adicionaron 250 μ l de la mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se agitó suavemente para que la mezcla pudiera interactuar con los demás componentes, después se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se separaron las fases y se recuperó la fase acuosa superior que contiene el DNA trasladando el contenido a 2 tubos



eppendorf nuevos.

Finalmente para precipitar el DNA se adicionaron 1500µl de etanol frío a cada uno de los tubos con muestra y se mezcló suavemente, posteriormente se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm, durante 10 min para luego decantar el etanol y dejar secar cada uno de los tubos con muestra en el termomixer a 37°C aproximadamente por 1 hora. El DNA se visualizó en la parte inferior del tubo. Una vez que el etanol fue eliminado se adicionaron 50 µL de agua libre de nucleasas para resuspender el DNA agitando suavemente el tubo con muestra hasta su completa disolución. La muestra se guardó y conservó a una temperatura de -20°C para luego cuantificar por medio de absorbancia el DNA obtenido.

2.4.2 Cuantificación de DNA por medio de absorbancia a 260 nm

Este método es útil para detectar cualquier compuesto que absorbe luz significativamente a 260 nm, ya que se presentan ácidos nucleicos altamente puros, lo cual incluye, por ejemplo: DNA, RNA, EDTA y Fenol. La relación de absorbancia 260nm se utiliza como prueba de contaminación de una preparación de DNA y RNA con proteína, puesto que los aminoácidos aromáticos absorben la luz a 280nm. En este caso, sólo un nivel significativo de proteína en la preparación puede causar un cambio significativo en la relación de absorbancia en 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 de 1.8, entonces no se puede cuantificar el DNA presente en la solución (Sambrook y Russell, 2001).

La cuantificación de DNA obtenido de la extracción se llevó a cabo en un Nanoespectrofotómetro, *Accesolab Nano Drop ND-1000* el cual se encuentra conectado a una computadora. Primero se calibró el equipo colocando 2 µL de agua libre de nucleasas, posteriormente se utilizó como blanco otros 2 µL de agua libre de nucleasas donde al dar clic en la opción blanco la lectura dio un valor de cero. Cuando el equipo



dio los valores del blanco, se limpió el sensor con ayuda de un pañuelo y se pusieron ahora 2 μL de la muestra a cuantificar. Finalmente en la pantalla de la computadora se mostraron los resultados obtenidos, la gráfica, los valores de la relación 260/280 y la concentración a la cual se encontraba la muestra de DNA. Los valores que se consideraron como aceptables fueron que la relación 260/280 fuese 1.8 y la concentración aproximadamente de 60 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

2.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Preparación de la reacción

Para la preparación de la reacción es fundamental la estandarización de las concentraciones de los componentes (Primers y DNA). Los primers deben ser solubilizados a una concentración de 25 mM, mientras que el DNA requiere una concentración baja (50 $\text{ng}/\mu\text{L}$) puesto que una sola copia de DNA es suficiente para una adecuada amplificación.

Para la dilución de los primers se tomaron 2 μL de los concentrados y se disolvieron en 18 μL de agua libre de nucleasas.

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 μL como se muestra en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Cantidad de componentes necesarios para realizar la PCR.

| COMPONENTE | VOLUMEN μL | CONCENTRACION FINAL |
|-------------------------|--|---------------------|
| Mezcla Master Mix | 12.5 | 1X |
| Primer Frontal | 0.5 | 0.1 – 1.0 Mm |
| Primer Reverso | 0.5 | 0.1 – 1.0 mM |
| DNA | 1 | < 250 ng |
| Agua libre de nucleasas | La necesaria para completar 25 μL | *N.A. |

*N.A.= No Aplica



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 (Mendoza, A. y col., 2006; Wilson, I.G., 1997).

La temperatura media para cada primer fue calculada mediante la siguiente ecuación:

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

- Para los primers que detectaron **maíz** la temperatura media (T_m) fue de la siguiente manera:

Primer frontal:

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

Primer reverso:

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

Sin embargo, se comprobó de manera experimental que la temperatura de 68°C fue muy elevada y no permitía la adecuada amplificación de la región de interés (citocromo b del maíz) por lo que se decidió utilizar una temperatura inferior la cual fue de 60°C . En la Figura 18 se muestran las condiciones que se llevaron a cabo para esta prueba. Teniendo un programa de 30 ciclos con una duración de 1 hora 58 minutos.

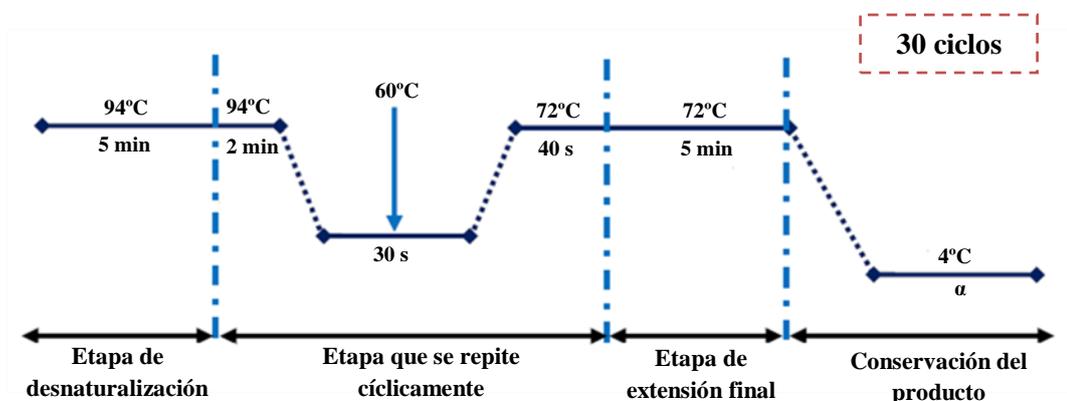


Figura 18. Programa de PCR utilizado para la detección de maíz



- En el caso de los primers para detectar **soya**, la temperatura media para ambos primers fue la siguiente:

Primer Frontal:

$$T_m = (4(9 + 2)) + (2(5+5)) = 4(11) + 2(10) = 4 + 20 = 64 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Primer Reverso:

$$T_m = (4(8 + 3)) + (2(8 + 3)) = 4(11) + 2(11) = 44 + 22 = 66 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Se utilizó la temperatura de 64°C que es la que permitió la adecuada hibridación de los primers, el programa de PCR aplicado se muestra en la Figura 19, teniendo 30 ciclos con un tiempo de 1 hora 20 minutos.

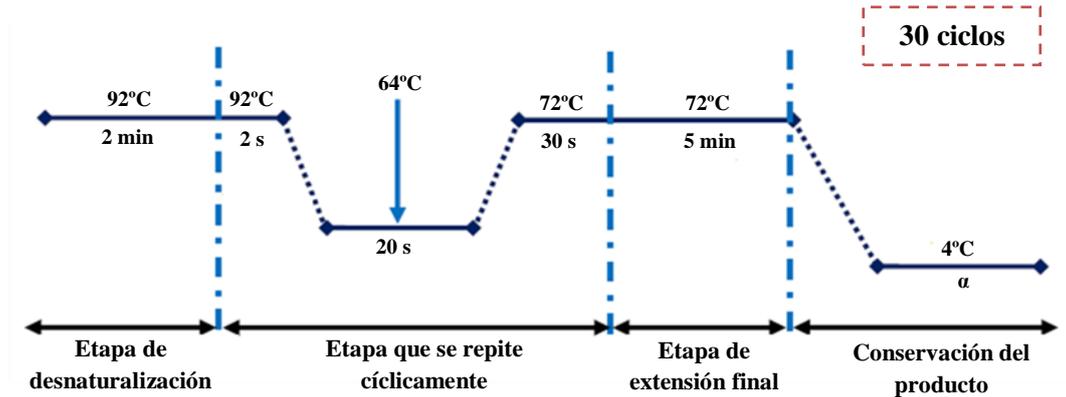


Figura 19. Programa de PCR utilizado para la detección de soya.

- Los cálculos de la temperatura media para los primers tanto frontal como reverso del **CaMV** y **T-NOS** se presentan en las siguientes ecuaciones:

CaMV 35S

Primer Frontal:

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

Primer Reverso:

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

T-NOS

Primer Frontal:

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



Primer Reverso:

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

Para la detección tanto de maíz como de soya transgénicos se utilizó una temperatura media de 60°C ya que al realizar los cálculos se presentó una temperatura inferior y una superior y al obtener un promedio la temperatura resultante fue de 60°C la cual permitió la adecuada hibridación de los primers tanto del CaMV como del T-NOS, por lo tanto, se decidió aplicar el mismo programa de PCR presentado en la Figura 20 con 40 ciclos y un tiempo de 3 horas con 30 minutos.

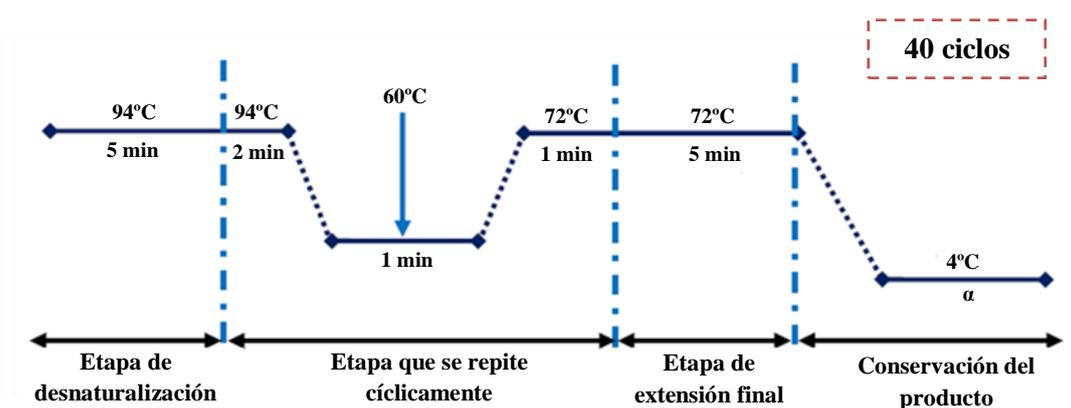


Figura 20. Programa de PCR para la detección de maíz y soya transgénicos.

Una vez preparados los componentes de la reacción y establecidas las condiciones, se programó el termociclador Apollo ATC 401 CLP para los primers correspondientes y se realizó la electroforesis para observar los productos amplificados.

Reacción en cadena de la polimerasa (directo)

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo con el mismo procedimiento que se mencionó anteriormente para PCR, la diferencia fue que las muestras se utilizaron de manera directa sin previa extracción de su DNA.

La cantidad de componentes utilizados para efectuar la reacción se muestra en el Cuadro 9 para un volumen de $20 \mu\text{L}$.

**Cuadro 9.** Cantidad de componentes necesarios para realizar la PCR directo

| COMPONENTE | VOLUMEN μL |
|---|---|
| 2x Phire [®] Plant PCR Bufer | 10 μL |
| Primer Frontal | 0.5 μL |
| Primer Reverso | 0.5 μL |
| Phire [®] Hot Start DNA polimerasa | 0.4 μL |
| Tejido de la planta Protocolo directo Protocolo diluido | Muestra de 5mm ó 0.5 μL de la muestra |
| Agua libre de nucleasas | La necesaria para completar 20 μL |

FUENTE Finnzymes Phire[®] Plant Direct PCR Kit

Las condiciones del programa de PCR directo que se utilizaron tanto para la detección de maíz como para las de soya fueron establecidas de acuerdo a lo que propone el protocolo Finnzymes Phire[®] Plant Direct PCR Kit. En el cuadro 10 y 11 se muestran las temperaturas, ciclos y tiempos en los que se efectuó la reacción:

Cuadro 10. Condiciones de PCR directo utilizadas para la detección de maíz

| Pasos del ciclo | Protocolo de 3 pasos | | Ciclos |
|---------------------------|----------------------|--------|--------|
| | Temperatura | Tiempo | |
| Desnaturalización inicial | 98°C | 5 min | 1 |
| Desnaturalización | 98°C | 5 s | 40 |
| Alineación | - | - | |
| Extensión | 72°C | 20 s | |
| Extensión final | 72°C | 1 min | 1 |
| | 4°C | Hold | |

Cuadro 11. Condiciones de PCR directo utilizadas para detección de soya.

| Pasos del ciclo | Protocolo de 2 pasos | | Ciclos |
|---------------------------|----------------------|--------|--------|
| | Temperatura | Tiempo | |
| Desnaturalización inicial | 98°C | 5 min | 1 |
| Desnaturalización | 98°C | 5 s | 40 |
| Alineación | 62.2°C | 5 s | |
| Extensión | 72°C | 20 s | |
| Extensión final | 72°C | 1 min | 1 |
| | 4°C | Hold | |



2.4.4 Electroforesis.

La electroforesis es una técnica bioquímica estándar para la separación de moléculas sobre la base del tamaño y la carga eléctrica. Hay varios tipos de electroforesis; para separar las moléculas de DNA se utiliza electroforesis en gel (Perera y col., 2003).

El gel es sometido al paso de corriente a través de él. Dado que el grupo fosfato de cada nucleótido de DNA posee una carga negativa, los fragmentos de DNA migran hacia el extremo positivo del gel y la movilidad de estos dependerá de su tamaño (Perera y col., 2003).

Preparación del gel de agarosa

Una vez finalizada la PCR, los productos obtenidos se analizaron en un gel de agarosa al 2% en el caso de maíz y soya no transgénicos y al 3% para la detección de maíz y soya transgénicos los cuales estaban contenidos en una cámara de 50ml. Primero se pesaron 1g de agarosa para un gel al 2% y 1.5g en el caso del gel al 3% disolviéndose en 50 ml TAE 1X. Después se calentó la disolución en un horno de microondas aproximadamente por un minuto, en intervalos de tiempo de 10 segundos para evitar que se evaporara la disolución. Se dejó enfriar la mezcla, evitando que se gelificara (aproximadamente 15 minutos) y se cerraron las aperturas laterales del soporte del gel. Enseguida se añadió 1 gota de BRET (Bromuro de Etidio) y se homogenizó la mezcla para luego verterla en el soporte evitando la formación de burbujas, si se formaban burbujas, de inmediato estas eran removidas. Luego se colocaron los peines y se dejó solidificar el gel en una zona libre de corriente de aire. Una vez que se solidificó el gel se retiraron los peines y se colocó en el soporte de la cámara de electroforesis. Finalmente se adicionó TAE 1X a la cámara a modo que el gel quedara cubierto.

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% y a 60 V para el gel al 3%. Los pocillos del gel se cargaron de acuerdo a los volúmenes indicados en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Componentes y cantidades necesarias para la preparación de una muestra a realizar una electroforesis

| COMPONENTE | VOLUMEN |
|------------------------------------|----------------|
| Bromuro de Etidio 0.01µg/ml | 3 µL |
| Blue Orange 6x Loading Dye | 3 µL |
| Muestra blanco | 5 µL |
| Marcador de peso molecular | 1 a 3 µL |

Para llevar a cabo la corrida primero se colocaron en un trozo de parafilm 3 µL de colorante (tinte cargador azul/naranja 6x) por cada muestra a cargar, incluyendo el blanco. Del mismo modo se situaron 3 µL de BrEt diluido (0.01µg/ml) junto a cada gota colocada en el paso anterior. Posteriormente se colocaron 5 µL de muestra y blanco mezclándolos con los otros elementos, se tomó la mezcla utilizando la micropipeta y se depositó cuidadosamente en el pocillo correspondiente. En el primer carril se colocaron 3 µL de marcador de peso molecular². Se cerró la cámara y se conectó a la fuente de poder (a 90V para un gel al 2% o a 60V para un gel al 3%). El cátodo se conectó al extremo cercano a los pocillos, de modo que la molécula de DNA migrara hacia el ánodo. Se dejó migrar las muestras, hasta que el frente de la corrida (colorante amarillo) se visualizó cerca del extremo contrario del gel. Por último, se empleó el sistema de fotodocumentación para fotografiar y visualizar el gel.

² El marcador de peso molecular utilizado fue de 10 0000 pb. En la Figura 21 se pueden observar las bandas y su peso de referencia.

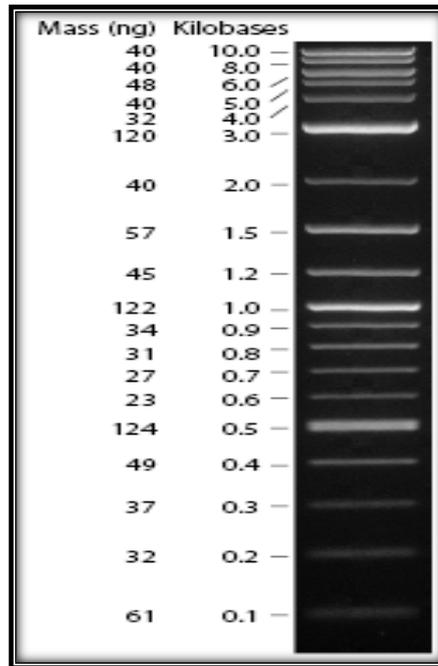


Figura 21. Marcador de peso molecular

2.4.5 Visualización de los geles de electroforesis

La visualización de los resultados de los geles de electroforesis se llevó a cabo en un transiluminador de luz UV marca Claver Scientific LTD, la captura de estas imágenes visualizadas se logró utilizando un equipo de fotografía para luz UV marca Kodak digital Science. Estas condiciones son esenciales 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 254nm por el DNA y transmitida al colorante, el cual unido por si mismo absorbe la luz a 302nm y 366nm. En ambos casos, la energía es re-emitida a 590nm en la región rojo-naranja del espectro visible (Sambrook y Russell, 2001).



CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo particular 1

Se llevó a cabo la extracción de DNA tanto de los controles positivo (maíz y soya transgénicos), controles interno (maíz y soya no transgénicos) como de los diferentes productos comerciales derivados de maíz y soya, empleando el protocolo de Sambrook que ha sido adaptado para el presente proyecto. Posteriormente se cuantificó la concentración de DNA a través del Nanodrop, las concentraciones obtenidas se muestran a continuación:

1) Concentraciones de DNA obtenido de los controles internos y positivos:

En el Cuadro 13 se muestran las concentraciones obtenidas de los controles internos (Maíz y soya no transgénico) y de los controles positivos (maíz y soya transgénicos).

Cuadro 13. Nomenclatura y concentración de DNA, al extraer el DNA total de los controles internos y positivos.

| Muestra | Nomenclatura | 260/280 | ng/ μ l |
|------------------|-----------------|---------|-------------|
| Maíz | C _M | 2.08 | 532.5 |
| Soya | C _s | 2.04 | 1353.8 |
| Maíz transgénico | C _{M+} | 1.97 | 1 871.4 |
| Soya transgénica | C _{s+} | 1.78 | 3318.2 |

A cada muestra se le asignó una nomenclatura para poder distinguir unas de otras, al purificar el DNA de cada muestra se puede observar que la relación 260/280 da valores mayores a 1.8 que es el valor ideal para indicar que no existe contaminación significativa de proteínas, sin embargo, la concentración obtenida fue muy alta lo cual podría afectar la hibridación de los primers una vez que se realice la PCR. Por ello se decidió hacer el cálculo de agua libre de nucleasas necesaria para diluir las muestras hasta obtener una concentración cercana a 60 ng/ μ l, cantidad suficiente para amplificar el DNA. Una vez diluidas las muestras se comprobó la concentración en el Nanodrop.

El Cuadro 14 muestra las concentraciones finales de los controles positivos e internos con la que se llevó a cabo la PCR.



Cuadro 14. Concentración de DNA próxima a los 60 ng/μl de los controles internos y positivos.

| Muestra | Nomenclatura | 260/280 | ng/μl |
|------------------|-----------------|---------|-------|
| Maíz | C _M | 2.04 | 73.5 |
| Soya | C _s | 1.92 | 60.1 |
| Maíz transgénico | C _{M+} | 2.03 | 60.6 |
| Soya transgénica | C _{s+} | 1.94 | 70.6 |

Como se puede observar en el cuadro anterior, la concentración de DNA obtenida en cada muestra es aceptable porque no se encuentra saturada, permitiendo que cuando se realice la PCR los primers puedan hibridar correctamente, por otro lado, la cantidad de DNA es suficiente ya que teóricamente solo se necesita de una pequeña cantidad de DNA para replicar millones de copias del fragmento deseado. La relación 260/280 nos muestra valores por encima del 1.8 indicando que el DNA extraído cuenta con la calidad y pureza para llevar a cabo la PCR.

2) Concentraciones de DNA obtenido de productos comerciales derivados del maíz

A los productos comerciales derivados de maíz también se les extrajo el DNA y se les asignó una nomenclatura a cada muestra para identificarlas, en el Cuadro 15 Se muestran los resultados de las concentraciones obtenidas. Los productos seleccionados fueron aquellos que se consumen con mayor frecuencia en el mercado y que han provocado dudas respecto a si son o no transgénicos debido a que no está indicado en su etiqueta si el maíz utilizado para su elaboración es transgénico.

En el Cuadro 15 se observa que al inicio la concentración fue muy alta por lo que se diluyó a una concentración cercana a 60 ng/μl para permitir la adecuada hibridación de los primers al momento de realizar la PCR, los resultados finales de las muestras ya diluidas se presentan en la última columna donde los valores van desde 51.4 hasta 78 ng/μl. Por otro lado la relación 260/280 indica la posible contaminación de las muestras por proteínas y el valor ideal debe estar por encima de 1.8, en cambio, algunas muestras presentaron valores por debajo de esta cantidad, sin embargo, si se purificaba nuevamente el DNA con fenol cloroformo alcohol isoamilico y etanol frio, el DNA se degradaba y los valores disminuían considerablemente es por ello que se decidió trabajar con estas muestras.



Cuadro 15. Resultados de la concentración de DNA obtenida de los diferentes productos comerciales derivados del maíz

| Muestra | Nomenclatura | Concentración inicial | | Concentración final | |
|----------------------------|-----------------|-----------------------|-------------|---------------------|-------------|
| | | 260/280 | ng/ μ l | 260/280 | ng/ μ l |
| Maíz palomero | M ₁ | 1.70 | 1055.9 | 1.94 | 69.8 |
| Tostadas de maíz Horneadas | M ₂ | 1.86 | 1426.6 | 1.84 | 78.0 |
| Galletas de maíz | M ₃ | 1.85 | 2094.3 | 1.80 | 55.9 |
| Tortillas de maíz comunes | M ₄ | 1.52 | 917.0 | 1.55 | 71.1 |
| Takis | M ₅ | 1.87 | 1982.6 | 1.89 | 55.8 |
| Corn Flakes (Nestlé) | M ₆ | 1.53 | 1352.6 | 1.68 | 71.0 |
| Corn Flakes (Maizoro) | M ₇ | 1.54 | 1012.8 | 1.67 | 61.0 |
| Harina de maíz | M ₈ | 1.94 | 1915.5 | 1.85 | 62.6 |
| Tortillas (milpa real) | M ₉ | 1.59 | 302.9 | 1.67 | 66.9 |
| Elotes | M ₁₀ | 1.94 | 1213.8 | 1.84 | 76.0 |
| Sopa de fideo | M ₁₁ | 1.87 | 2940.2 | 1.84 | 51.4 |

3) Concentración de DNA obtenido de productos comerciales derivados de soya

Se llevó a cabo la extracción de DNA de once productos derivados de soya la cual ha sido utilizada como materia prima en diversos alimentos, la concentración obtenida se midió en el Nanodrop (Cuadro 16) teniendo inicialmente como resultado concentraciones de DNA muy elevadas por lo que al igual que las muestras anteriores se tuvieron que diluir hasta aproximarse a una concentración de 60 ng/ μ l que es una cantidad suficiente de DNA que se requiere para que se lleve a cabo de manera adecuada la PCR sin tener problemas en la hibridación de los primers causado por la saturación de la muestra.

En la última columna se presentan las concentraciones de DNA de las diferentes muestras ya diluidas que van desde 50.2 hasta 81.9 ng/ μ l. La relación 260/280 para este caso indica que también puede existir una contaminación de proteínas pero que aún se conservan los ácidos nucleicos, por lo tanto, estas muestras si pueden ser utilizadas para llevar a cabo la PCR.



Cuadro 16. Resultados de la concentración de DNA obtenido de los diferentes productos comerciales derivados de soya

| Muestra | Nomenclatura | Concentración inicial | | Concentración final | |
|------------------------|-----------------|-----------------------|--------|---------------------|-------|
| | | 260/280 | ng/μl | 260/280 | ng/μl |
| Soya Pac | S ₁ | 1.61 | 4821.5 | 1.74 | 76.2 |
| Malteada de soya | S ₂ | 1.59 | 4385.4 | 1.51 | 51.7 |
| Frijol de soya | S ₃ | 1.92 | 1605.4 | 2.0 | 53.4 |
| Ades | S ₄ | 1.84 | 1400.9 | 1.84 | 50.9 |
| Albóndiga de soya | S ₅ | 1.88 | 5136.5 | 1.97 | 81.9 |
| Carne para hamburguesa | S ₆ | 1.79 | 5243.0 | 1.94 | 50.2 |
| Nuggets de soya | S ₇ | 1.79 | 2008.2 | 1.78 | 63.2 |
| Chicharrón de soya | S ₈ | 1.73 | 2466.5 | 1.65 | 71.5 |
| Soy drink | S ₉ | 1.78 | 476.8 | 1.50 | 67.7 |
| Longaniza de soya | S ₁₀ | 1.52 | 5215.4 | 1.81 | 60.9 |
| Guten | S ₁₁ | 1.86 | 2519.0 | 1.69 | 56.3 |

Después de haber realizado la extracción de DNA de las diferentes muestras se llevó a cabo la PCR aplicando los programas diseñados en el Termociclador, posteriormente se prepararon los geles para la electroforesis. Los resultados obtenidos se presentan más adelante.

Objetivo Particular 2

Los primers que se utilizaron para el presente proyecto ya se habían diseñado anteriormente en otros trabajos (López, 2011) Sin embargo, se decidió trabajar con los mismos y probarlos tanto experimentalmente como con los programas bioinformáticos para verificar que podían ser empleados para la detección de maíz y de soya, en el anexo se presenta la metodología a seguir para el diseño de primers.

La selección de primers que amplifican la zona de CaMV 35S y T-NOS fue basado en el artículo de Karamollaoglu y col., 2009. “QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs)”.



Objetivo particular 3

Después de haber seleccionado los primers de maíz y soya con ayuda del programa bioinformático, se llevó a cabo la PCR para garantizar que dichos primers no amplifiquen para otras especies. Para ello se utilizó el DNA extraído previamente de los controles interno (maíz y soya no transgénicos). En la Figura 22 y 23 se muestran los resultados:

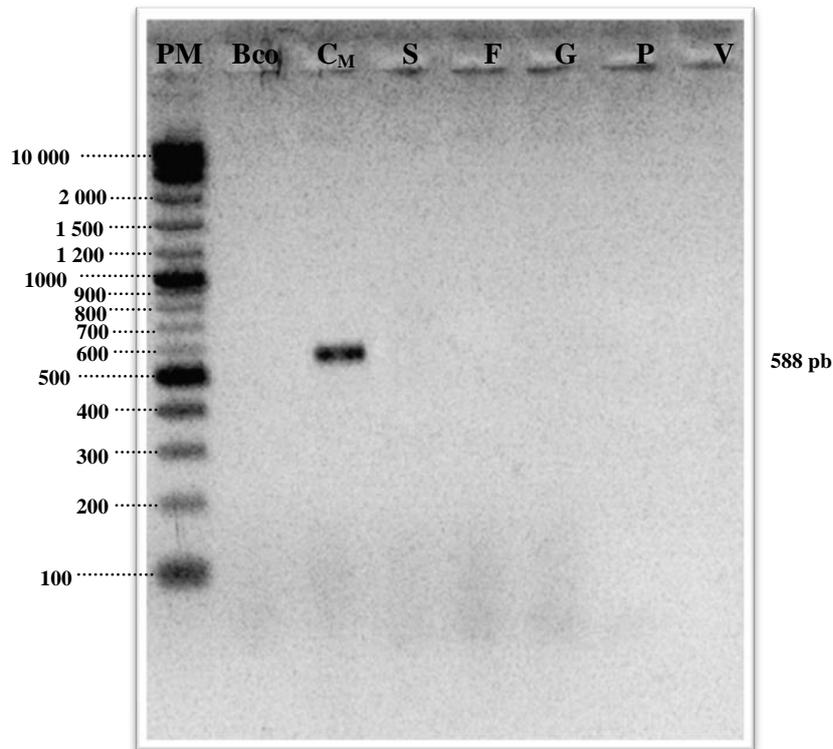


Figura 22. Especificidad de los primers de maíz en un gel de agarosa al 2% a 90v. (PM) marcador de peso molecular 10 kb; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (C_M) maíz blanco criollo, control interno; (S) Soya; (F) Frijol; (G) *Aspergillus niger*; (P) Pollo; (V) Vaca. Se cargaron con 5 µL de cada muestra.

Como se puede observar en la Figura 22 los primers seleccionados pueden ser utilizados para detectar cualquier variedad de maíz en los diferentes productos comerciales ya que permitieron que la muestra de DNA de maíz amplificara a 588 pb como se esperaba, la banda que representa este resultado se presenta en el carril de C_M, así mismo, se puede decir que dichos primers son específicos ya que al utilizarlos con muestras de DNA provenientes de especies filogenéticamente lejanas al maíz como son Soya, Frijol, el hongo *Aspergillus niger*, Pollo o Vaca no amplificaron, lo cual garantiza que son



capaces de delimitar únicamente la región del citocromo b del maíz cuando sean sometidos a las condiciones de la PCR.

También se puede apreciar que las muestras no están contaminadas puesto que el carril del blanco (segundo carril) no presenta ninguna banda visible. La banda que está presente en el tercer carril pertenece al DNA del maíz criollo tradicional y sirvió como control interno durante toda la experimentación, es decir, siempre que se pretendía detectar maíz en las diferentes muestras de productos comerciales este control se utilizaba colocándose siempre en el tercer carril con el objetivo de demostrar que si existe la presencia de maíz en otras muestras estas deberían amplificar a la misma altura que dicho control (588 pb) y si este control no amplificaba nos indicaba que la prueba no había sido adecuada y que se tenía que repetir la PCR.

En la Figura 23 se muestra que los primers seleccionados son adecuados para la detección de soya en cualquier producto comercial debido a que la banda esperada a 305 pb si amplificó, esta banda representa el DNA de una muestra de soya, la cual fue utilizada durante toda la experimentación como control interno, es decir, para garantizar si existía o no la presencia de soya en los diferentes productos comerciales, en caso de que se tuviera soya, se presentaría una banda en el carril correspondiente, a la misma altura que el control interno de soya.

El segundo carril correspondiente al blanco indica que no hay contaminación de las muestras ya que no hay ninguna banda visible que demuestre lo contrario. Cabe mencionar que al igual que los primers de maíz, los de soya son específicos para esta especie debido a que no amplificaron las muestras que contenía DNA de especies filogenéticamente lejanas a la soya como son Maíz, Frijol, el hongo *Aspergillus niger*, Pollo o Vaca.

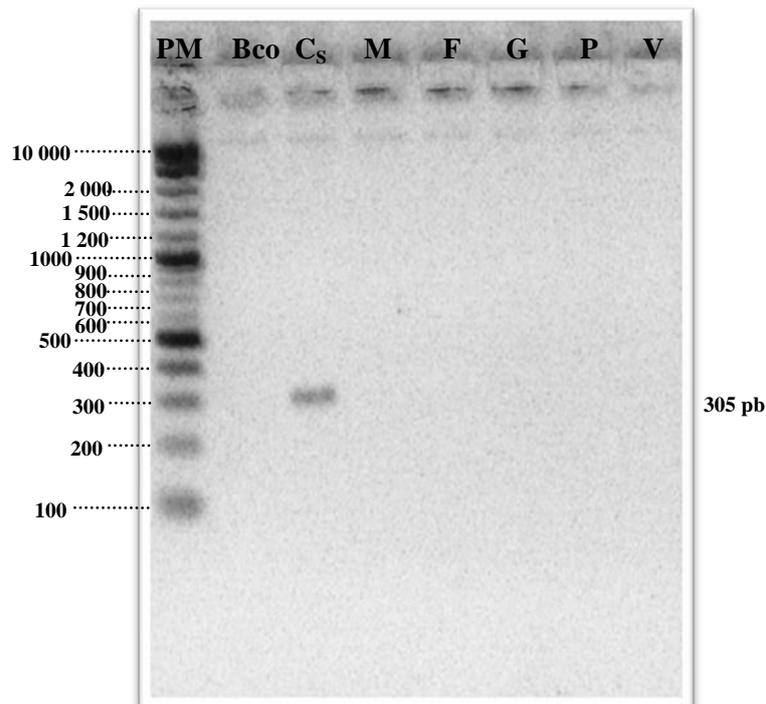


Figura 23. Especificidad de los primers de soya en un gel de agarosa al 2% a 90v. (PM) marcador de peso molecular 10 kb; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (C_S) Soya, control interno; (M) Maíz; (F) Frijol; (G) *Aspergillus niger*; (P) Pollo; (V) Vaca. Se cargaron con 5 µL de cada muestra.

Por otro lado, también se efectuó la PCR para comprobar que la secuencia de primers seleccionados amplifican las secuencias del Virus del Mosaico de la coliflor (CaMV) y el Terminador de la nopaline sintetasa (T-NOS). Los resultados se muestran en la Figura 24 y 25.

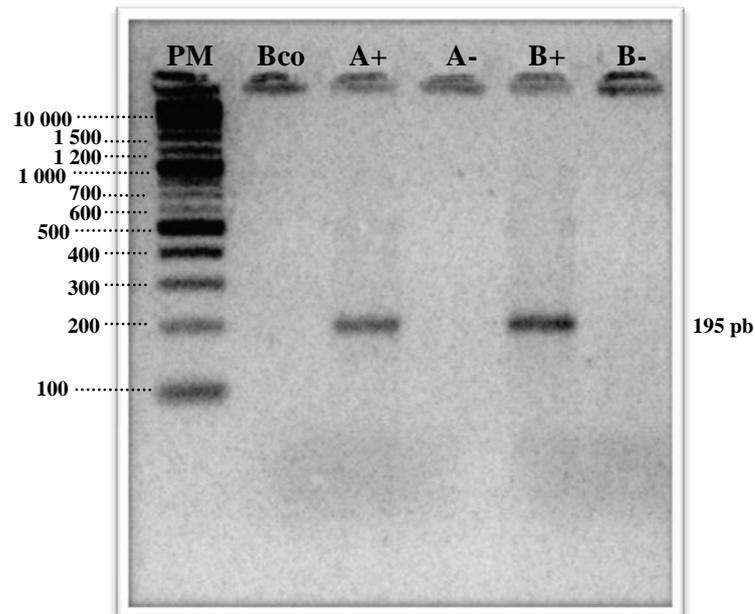


Figura 24. Amplificación del gen **CAMV** presente en maíz y soya transgénicos en un gel de agarosa al 3% con una potencia de 60v. (PM) marcador de peso molecular 10 Kb; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (A+) CaMV en maíz, control positivo; (A-) maíz no transgénico; (B+) CaMV en soya, control positivo; (B-) soya no transgénica. Se cargaron 5 μ L de cada muestra.

En la Figura 24 se aprecia que el gen del Virus del Mosaico de la Coliflor se encuentra tanto en la muestra de maíz como en la de soya, el carril A+ y el B+ lo demuestran ya que presentan una banda que amplifica a 195 pb como se esperaba. Por otro lado, en el carril A- y B- se colocó una muestra de maíz y de soya no transgénicos para garantizar que los primers hibridan específicamente para el gen CaMV por lo tanto, en ambas muestras no hubo amplificación.

Una vez que se comprobó que las muestras de maíz y soya transgénicos amplifican con los primers que hibridan en la secuencia del CaMV, estas fueron utilizadas como control positivo para asegurar que la PCR se llevó a cabo adecuadamente.

Para comprobar la amplificación de los primers que hibridan en la secuencia del T-NOS se utilizaron también las muestras de maíz y soya transgénicos (Figura 25), en el carril D+ y E+ se observa que ambas presentaron una banda a 180 pb como se esperaba, mientras que las muestras de maíz y soya genéticamente modificados no amplificaron debido a que no contienen el gen del T-NOS.

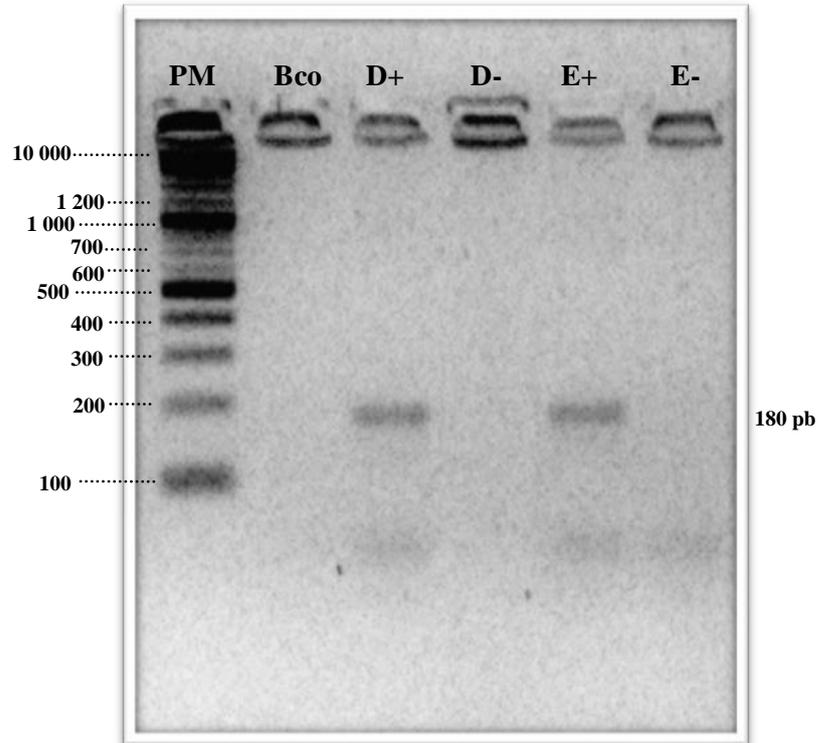


Figura 25. Amplificación del gen **T-NOS** presente en maíz y soya transgénicos en un gel de agarosa al 3% a 60v. (PM) marcador de peso molecular 10Kb; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (D+) T-NOS en maíz, control positivo; (D-) maíz no transgénico; (E+) T-NOS en soya, control positivo; (E-) soya no transgénica. Se cargaron 5 μ L de cada muestra.

También se aprecia que las muestras no están contaminadas y que la PCR se llevó a cabo de manera adecuada ya que el blanco no presenta ninguna banda, por lo que las muestras de maíz y soya transgénicos se pueden utilizar para las pruebas posteriores.



Objetivo Particular 4

Se llevó a cabo la técnica de PCR para la detección de organismos genéticamente modificados en diferentes productos comerciales derivados de maíz y de soya. Primero fue necesario detectar la presencia de maíz o de soya en las diferentes muestras para posteriormente verificar si contienen alguno de los genes CaMV o T-NOS que son generalmente utilizados por la ingeniería genética de plantas como promotor y terminador respectivamente, para introducir genes de una misma especie o de otras distintas.

DETECCIÓN DE MAÍZ

Para la detección de maíz en los diferentes productos comerciales derivados del mismo se realizaron dos geles de electroforesis con la finalidad de obtener una mejor interpretación de los resultados.

En la Figura 26 se observa que las primeras cinco muestras (Maíz palomero, Tostadas de maíz horneados, Galletas de maíz, Tortillas y Takis) presentan una banda de 588 pb como se esperaba, lo cual demuestra que estos productos si contienen maíz en su composición como está declarado en la etiqueta.

En el pocillo C_M se colocó un control interno, es decir, DNA de una muestra de maíz criollo no transgénico que sirvió como referencia para garantizar que la PCR se realizó de manera adecuada, en este caso fue correcta ya que dicho control también amplificó a 588 pb. Asimismo se puede apreciar que el blanco no presenta ninguna banda visible indicando que no hay contaminación en las muestras.

En el carril M_5 que pertenece a la muestra de DNA de Takis de barcel se observa que la banda es menos intensa en comparación a las otras, esto puede deberse a que este producto contiene diferentes saborizantes, colorantes y conservadores que pudieron haber afectado para obtener una mayor cantidad y calidad de DNA, sin embargo, al amplificar también a 588 pb se considera como un producto que si contiene maíz.

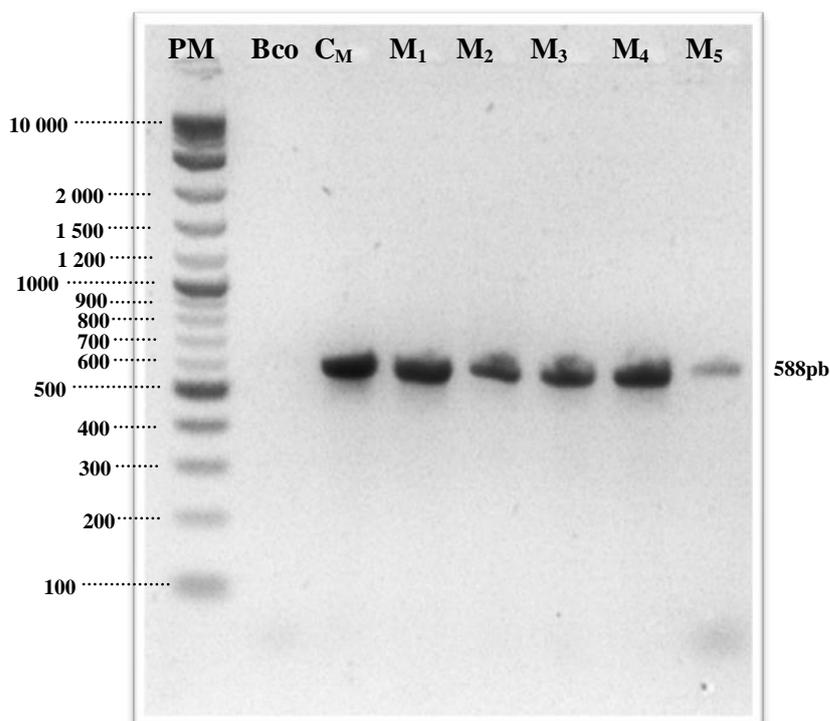


Figura 26. Detección de maíz en las primeras cinco muestras de productos comerciales en un gel de agarosa al 2% a 90v. (PM) marcador de peso molecular; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (C_M) maíz blanco criollo, control interno; (M_1) maíz palomero; (M_2) tostadas de maíz horneadas; (M_3) galletas de maíz; (M_4) tortillas; (M_5) takis.

Las siguientes seis muestras (Corn Flakes de Nestlé, Corn Flakes Maizoro, Harina de maíz, Tortillas Milpa Real, Elotes, y sopa) se sometieron al mismo programa de PCR para la detección de maíz, teniendo también como control interno al maíz criollo no transgénico (Carril C_M) el cual amplificó a 588 pb, demostrando que la reacción se llevó a cabo de manera adecuada.

Para estas muestras se realizaron variaciones en la cantidad de DNA requerida para la reacción (0.5, 1 y 1.5 μL), lo ideal era trabajar con 1 μL , sin embargo, ninguna amplificaba, por lo que se decidió primero disminuir la cantidad de DNA de cada muestra (0.5 μL) de las cuales solo la M_9 y M_{10} se vieron favorecidas (Figura 27), esto es debido a que las muestras se encontraban saturadas impidiendo la hibridación de los primers. En el caso de la muestra M_{11} se utilizó 1.5 μL de DNA, no obstante, se obtuvo una banda menos intensa pero visible a 588 pb indicando también que contiene maíz en su composición.

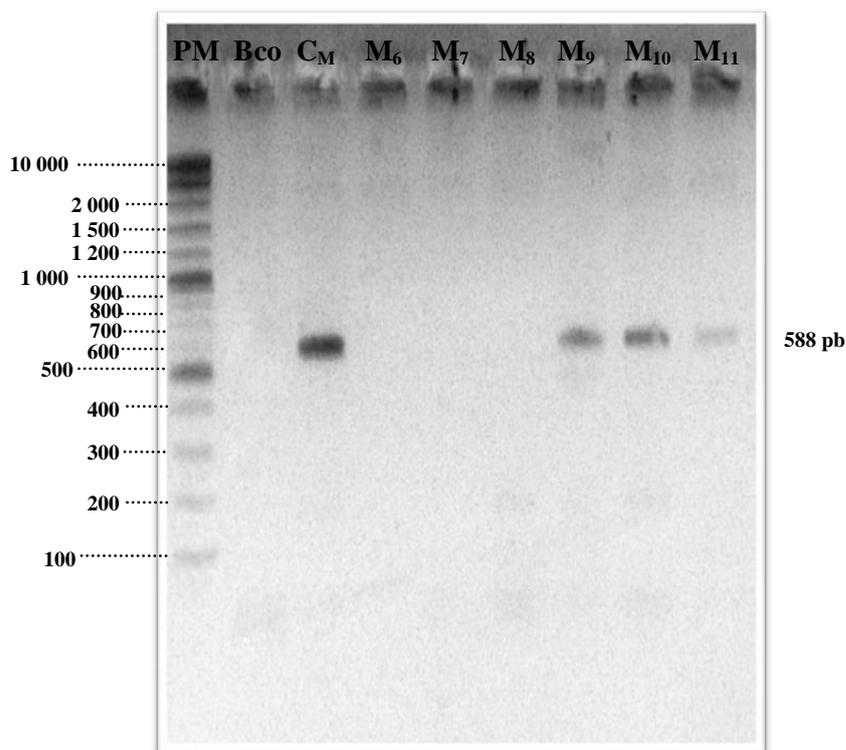


Figura 27. Detección de maíz de las siguientes seis muestras de productos comerciales en un gel de agarosa al 2% a 90v. (PM) marcador de peso molecular; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (C_M) maíz blanco criollo, control interno; (M₆) Corn Flakes de Nestlé; (M₇) Corn Flakes Maizoro; (M₈) Harina de maíz; (M₉) Tortillas Milpa Real; (M₁₀) Elotes; (M₁₁) Sopa.

En las muestras M₆, M₇ y M₈ (Corn Flakes de Nestlé, Corn Flakes Maizoro y Harina de maíz) se realizó PCR directo debido a que no amplificaron a las condiciones de PCR normal antes establecidas. Para esta técnica se utilizó un kit específico diseñado para realizar la PCR directamente de plantas o semillas sin necesidad de purificar previamente el DNA, es decir, se evita el paso de extracción del material genético. La muestra de Harina y de los cereales fueron tomados con ayuda de un Harris Uni-Core de 0.50 mm evitando contaminación entre cada toma.

En la Figura 27 se observa que las muestras de cereales y Harina de maíz tampoco amplificaron a pesar de haber aplicado PCR directo esto puede deberse a que en algunos alimentos el DNA se encuentra degradado a consecuencia del tipo de procesamiento al que son sometidos haciendo ineficiente su detección. Cuando son tratados con temperaturas por encima de los 80°C como es el caso de los cereales, el DNA sufre una rotura en sus puentes de hidrogeno y una pérdida de las reacciones hidrofóbicas entre



las bases nitrogenadas provocando la separación parcial o total de sus 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 (Garrido y col., 2006).

La muestra de DNA de la harina tampoco amplificó, la posible causa es porque es harina nixtamalizada y como se define en la norma NMX-F-046-S-1980 la harina de maíz es el producto que se obtiene de los granos de maíz (*Zea mays*) sanos, limpios y previamente nixtamalizados y deshidratados, lo que conlleva a decir que el DNA fue afectado por los cambios tan drásticos de pH durante la nixtamalización y las condiciones de temperatura empleadas durante la deshidratación. Asimismo la presencia de otros aditivos en el producto podrían haber inhibido algunos reactivos durante la extracción de DNA afectando la cantidad y calidad de muestra obtenida.

Después de realizar la detección de maíz en las 11 diferentes muestras de productos comerciales se llevó a cabo la PCR en las mismas pero ahora utilizando los primers que detectan la presencia de soya esto es porque los genes de CaMV y T-NOS pueden estar presentes tanto en maíz como en soya genéticamente modificados y para garantizar que si estas 11 muestras son transgénicas sean específicamente por la presencia de maíz.

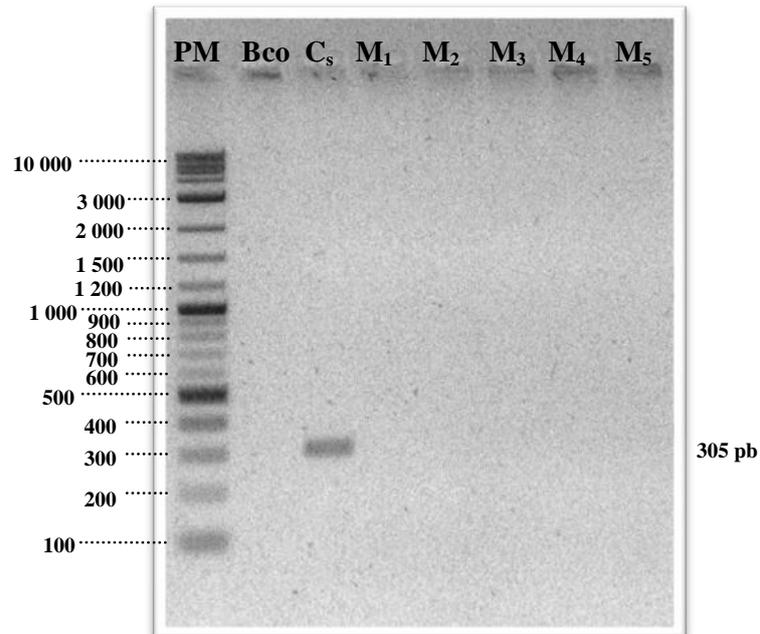


Figura 28. Detección de soya en las primeras cinco muestras de maíz en un gel de agarosa al 2% a 90v. (PM) marcador de peso molecular; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (C_s) Soya, control interno; (M₁) maíz palomero; (M₂) tostadas de maíz horneadas; (M₃) galletas de maíz; (M₄) tortillas; (M₅) takis.

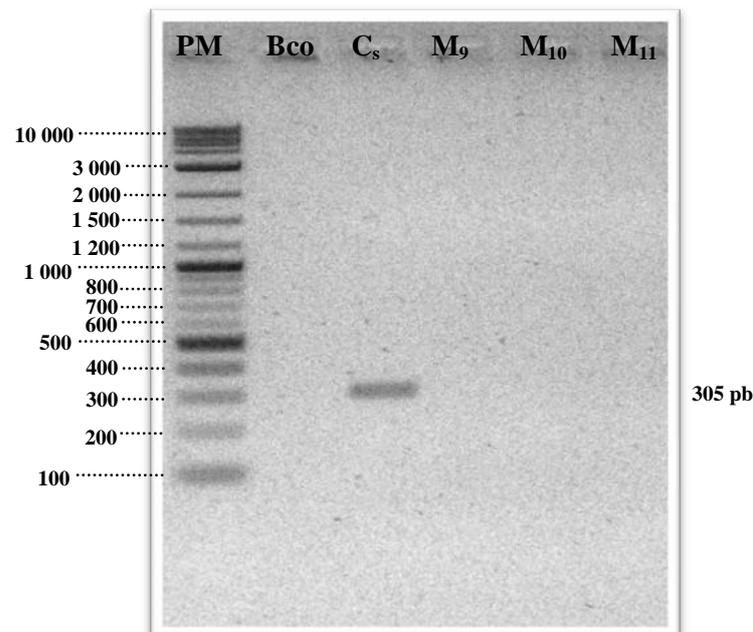


Figura 29. Detección de soya en las tres muestras restantes de maíz en un gel de agarosa al 2% a 90v. (PM) marcador de peso molecular; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (C_s) Soya, control interno; (M₉) Tortillas Milpa Real; (M₁₀) Elotes; (M₁₁) Sopa.



Como se puede apreciar en la Figura 28 y 29 los productos derivados de maíz no contienen soya ya que ninguna muestra amplificó a 305 pb como se esperaba, el control interno (DNA de soya) presentado en el carril Cs indica que la PCR se llevó a cabo de manera adecuada, por otro lado, las muestras no están contaminadas lo cual se demuestra en el segundo carril donde el control negativo (Bco) no presenta ninguna banda visible. Al no detectar DNA de soya en los productos derivados de maíz, se puede garantizar más adelante que si se detecta la presencia de alguno de los genes CaMV o T-NOS es a consecuencia del uso de maíz transgénico.



DETECCIÓN DE SOYA

La detección de soya en los 11 productos comerciales se efectuó también en partes, es decir, primero se realizó un gel de electroforesis donde se analizaron las primeras cinco muestras y en el segundo gel las siguientes seis, esto con la finalidad de tener una mejor interpretación de los resultados.

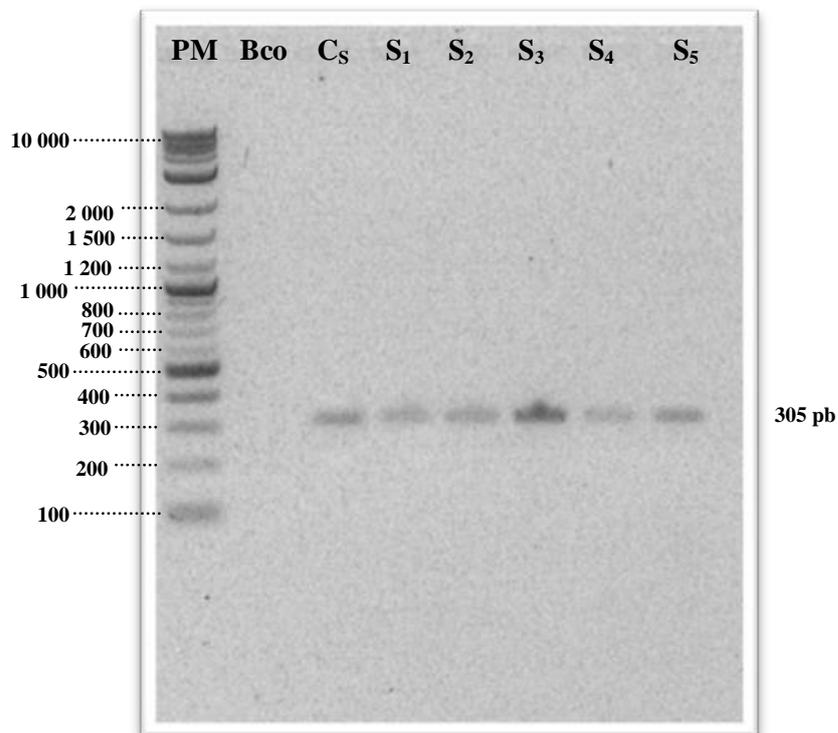


Figura 30. Detección de soya en los primeros cinco productos comerciales en un gel de agarosa al 2% y 90v. (PM) marcador de peso molecular; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (C_S) Soya, control interno; (S₁) Polvo para preparar bebida de soya instantánea; (S₂) Malteada de soya; (S₃) Frijol de soya; (S₄) Ades; (S₅) Soya albóndiga.

Las muestras de DNA de los diferentes productos comerciales derivados de soya fueron sometidas al programa de PCR representado en la Figura 19 teniendo como resultado que las primeras cinco muestras amplificaron a 305 pb (Figura 30), a la misma altura que el control interno (DNA de soya), demostrando que la reacción se llevó a cabo de manera adecuada. El control negativo (Bco) no presenta ninguna banda visible por lo que puede considerarse que las muestras no están contaminadas.



La intensidad de cada una de las bandas es a consecuencia de la calidad y cantidad de DNA obtenido durante la extracción, no obstante, se observa que las cinco muestras (Polvo para preparar bebida de soya instantánea, Malteada de soya, Frijol de soya, Ades y Soya albóndiga) contienen fragmentos de soya en su composición como se declara en la etiqueta.

En la Figura 31 se presenta las siguientes seis muestras de productos derivados de soya de las cuales solo la S₉ (Soy drink) amplificó a la misma altura que el control interno (DNA des soya), es decir, a 305 pb como se esperaba, demostrando que la PCR se llevó a cabo de manera adecuada. Se aprecia también que el control negativo (Bco) no tiene ningún amplificado por lo que se considera que no existe contaminación de las muestras.

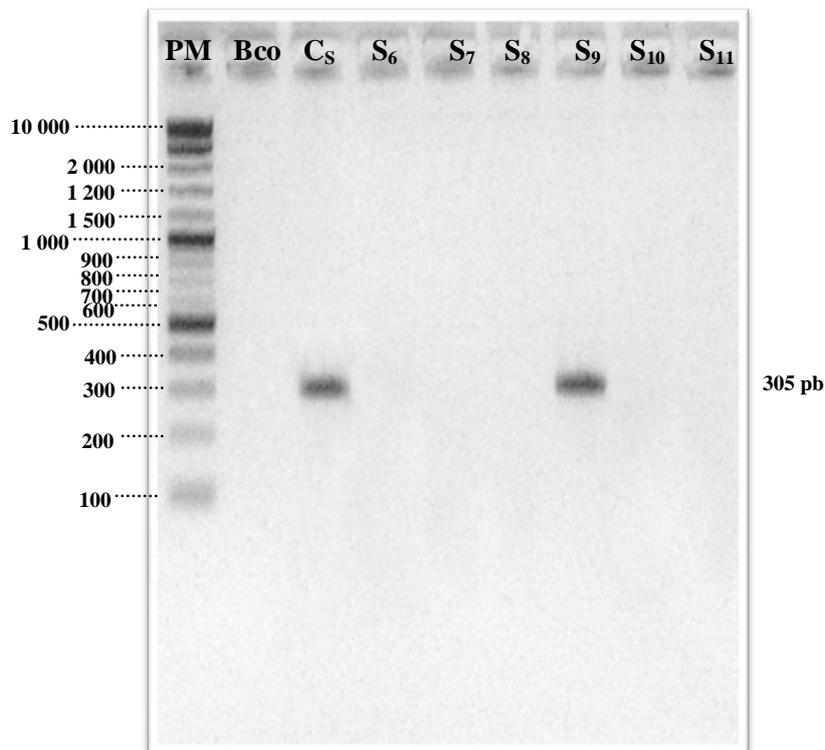


Figura 31. Detección de soya en las siguientes seis muestras de productos comerciales con un gel de agarosa al 2% y 90v. (PM) marcador de peso molecular; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (C_s) Soya, control interno; (S₆) Carne de soya para hamburguesa; (S₇) Nuguets de soya; (S₈) Chicharrón de soya; (S₉) Soy drink; (S₁₀) Chorizo de soya; (S₁₁) Guten.



Para las muestras S_6 , S_7 , S_8 , S_{10} y S_{11} se realizaron variaciones en la cantidad de DNA utilizado para la PCR (0.5, 1 y 1.5 μ L) con la finalidad de lograr que amplificaran a las condiciones establecidas, sin embargo, ninguna muestra se vio favorecida así que se aplicó PCR directo a las muestras ya que esta técnica es más sensible por el tipo de enzima que se utiliza.

Después de haber aplicado PCR directo se observó que las muestras tampoco amplificaron, en el caso de la carne para hamburguesa, las nuggets y el Guten podría deberse a que en general, las carnes tienen un alto contenido de proteínas, por lo que debe tenerse estricto cuidado al realizar la extracción ya que se pueden pegar al DNA contaminándolo y afectando su adecuada amplificación en PCR. Estas muestras también contienen conservadores, saborizantes, y colorantes que podrían actuar sobre los reactivos utilizados durante la extracción impidiendo la obtención de un DNA más puro. Existen diferentes métodos de extracción que son optimizados para cada matriz del alimento, debido a que varios de los componentes alimenticios inhiben los reactivos usados en el análisis (Food Technology, 2000), y por los cuales sería más conveniente llevar a cabo la extracción de DNA ya que para el presente proyecto se utilizó la técnica de sambrook, sin embargo, se obtuvieron resultados desfavorables para la detección de soya en los productos de (Carne de soya para hamburguesa, Nuggets de soya, Chicharrón de soya, Chorizo de soya y Guten).

En el caso de las muestras antes mencionadas también se puede considerar que el DNA podría estar afectado en gran medida por el tipo de procesamiento al que fueron sometidos los alimentos ya sea desde las materias primas o al alimento como tal, pudiendo llevar esto a una total o parcial degradación del material genético. Parámetros físicos y químicos, como presión, calor ó distintos valores de pH, pueden causar rupturas ó la pérdida de bases del ADN por los tratamientos a los que la molécula de DNA es sometida (Beever y Kemp, 2000; Ahmed, 2002). En el chorizo de soya (S_{10}) se observa que tampoco amplificó lo cual podría ser debido a que la materia prima principal para su elaboración es la soya texturizada y esta para su obtención es sometida a cambios bruscos de PH y a altas temperaturas que pueden ocasionar la degradación total o parcial del DNA, Rott y col., 2004 mencionan en un estudio que altas temperaturas y PH ácido degradan el DNA y esto interfiere en la calidad del ADN por lo que se dificulta la amplificación de los segmentos de los genes, otra causa podría ser debido a que este producto contiene saborizantes y colorantes que pudieron interferir



desde la extracción del DNA al inhibir algunos de los reactivos utilizados. Asimismo el chorizo de soya es un alimento análogo con un alto contenido de proteínas las cuales son un factor determinante durante la obtención del DNA ya que si estas llegan a estar presentes, la PCR no se lleva a cabo de manera adecuada por consiguiente ocasiona que no se presente ninguna banda visible como se observa en el carril S₁₀ de la figura 31.

En la Figura 32, se muestra un gel de electroforesis que demuestra que los productos comerciales derivados de soya no contienen maíz en su composición, esta prueba se realizó con la finalidad de garantizar más adelante que si al probar los primers que hibridan la región del CaMV y T-NOS estos estaban presentes es a consecuencia de la soya y no del maíz.

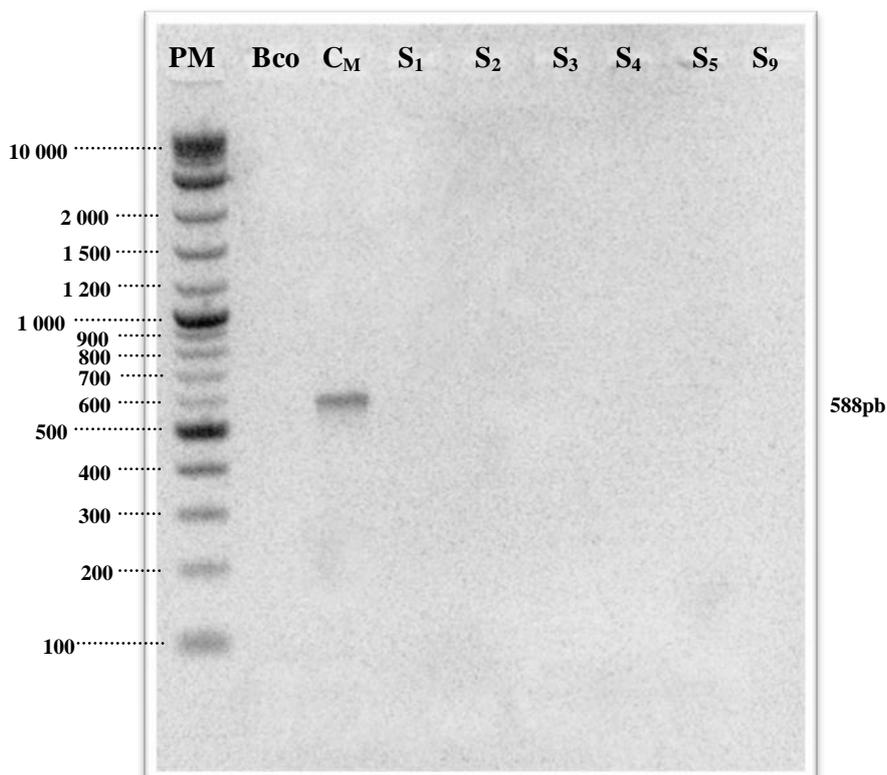


Figura 32. Detección de maíz en productos comerciales derivados de soya con un gel de agarosa al 2% y 90v. (PM) marcador de peso molecular; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (C_M) Maíz blanco criollo, control interno; (S₁) Polvo para preparar bebida de soya instantánea; (S₂) Malteada de soya; (S₃) Frijol de soya; (S₄) Ades; (S₅) Soya albóndiga; (S₉) Soy drink.



En la Figura anterior se presentan únicamente las muestras que habían amplificado anteriormente para soya para este caso no se incluyeron las muestras S₆, S₇, S₈, S₁₀ y S₁₁ que son a las que posteriormente se les aplicó PCR para detectar si las soya que contienen es genéticamente modificada. El control positivo mostrado en el carril C_M pertenece al DNA de maíz tradicional el cual presenta una banda visible a 588 pb como se esperaba, las demás muestras no amplificaron por lo que puede decirse que los productos derivados de soya no contienen maíz en su composición. En cuanto al control negativo (Bco) no presentó ningún amplificado por lo tanto las muestras de DNA de los productos no están contaminadas.

DETECCIÓN DE TRANSGENICOS EN LOS DIFERENTES PRODUCTOS COMERCIALES

Se llevó a cabo la técnica de PCR para detectar la secuencia de los genes CaMV y T-NOS en los diferentes productos comerciales derivados de maíz y de soya. Las condiciones a las que fueron sometidas las muestras se presentan en la figura 20. El gel de electroforesis se realizó al 3% debido a que cuando el peso molecular del DNA es pequeño se requiere de una concentración mayor del gel de agarosa para tener una mejor migración de las moléculas, en el caso de los genes CaMV y T-NOS se espera una banda a 195 y a 180 pb respectivamente.

A continuación se muestran los resultados obtenidos con respecto a la detección de los promotores CaMV y T-NOS en los diferentes productos comerciales derivados de maíz o soya, al ser detectados en las muestras se puede garantizar que estas son transgénicas, sin embargo, no se especifica a que tipo de transgénico corresponde. Para los geles de electroforesis se utilizaron dos controles positivo, en el caso de los productos derivados de maíz se utilizó el maíz genéticamente modificado y en el caso de las muestras de productos derivados de soya se utilizó soya genéticamente modificada, ambos controles deben amplificar a 195 pb en el caso de tener la presencia del virus del Mosaico de la coliflor (CaMV) y a 180 pb en el caso del Terminador de la nopaline sintetasa (T-NOS).



DETECCIÓN DE CaMV y T-NOS EN PRODUCTOS DERIVADOS DE MAÍZ

Para tener una mejor interpretación de los resultados se realizaron dos geles de electroforesis, primero para las muestras de la M₁ a la M₅ se detectó el Virus del Mosaico de la Coliflor y posteriormente a esas mismas muestras se les aplicó también PCR para detectar el Terminador de la Nopaline Sintetasa.

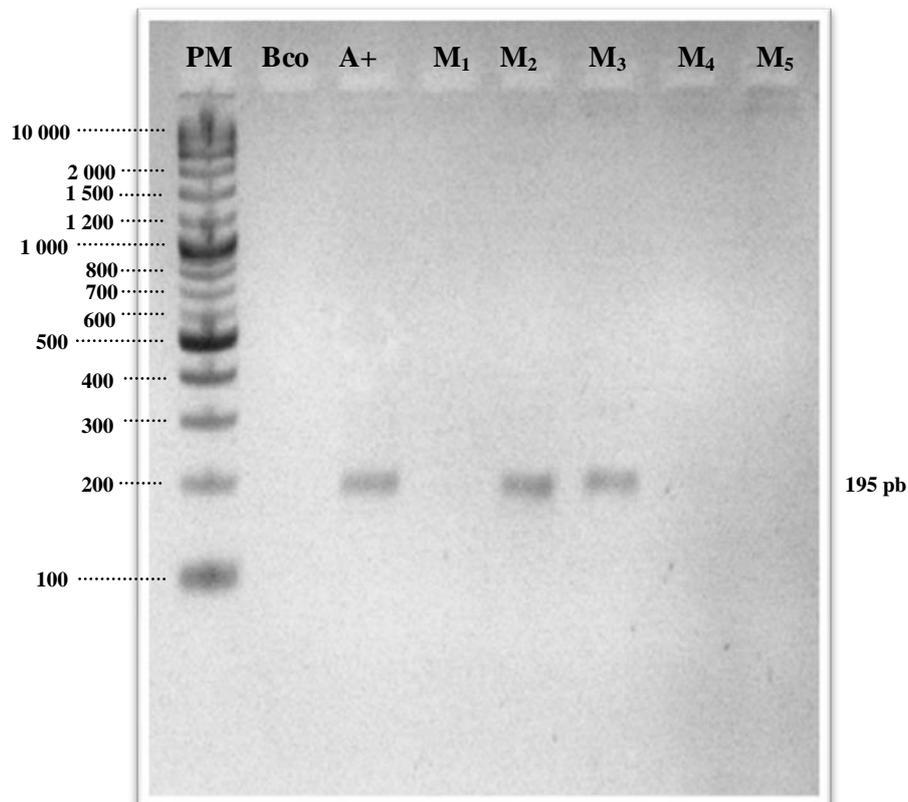


Figura 33. Detección del gen **CAMV** en las primeras cinco muestras de productos comerciales en un gel de agarosa al 3% a 90v. (PM) marcador de peso molecular; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (A+) CaMV en maíz, control positivo; (M₁) maíz palomero; (M₂) tostadas de maíz horneadas; (M₃) galletas de maíz; (M₄) tortillas; (M₅) takis.

En la Figura 33 se puede observar que las muestras no están contaminadas puesto que el control negativo (Bco) no amplificó, en cuanto al control positivo se puede decir que se encuentra una banda visible a 195 pb como se esperaba indicando en primer instancia que la PCR se llevó a cabo de manera adecuada, la cantidad de DNA utilizada para la amplificación de estas muestras fue de 1 μ L, sin embargo, únicamente las muestras de tostadas de maíz horneadas y galletas de maíz resultaron tener la presencia del Virus del Mosaico de la Coliflor, no obstante, en la etiqueta no está declarado la posibilidad de



contener algún tipo de transgénico y este estudio, en cambio, nos comprueba que estamos consumiendo alimentos que contienen genes modificados.

Por otro lado en la Figura 34 también se puede apreciar que de las muestras M_1 a la M_5 únicamente la muestra M_2 (Tostadas de maíz horneadas) contiene el Terminador de la Nopalina Sintetasa, en cambio la muestra de galletas de maíz solo presentó el gen CaMV pero no el T-NOS esto puede ser debido a que el Virus del Mosaico de la Coliflor se utiliza con mayor frecuencia como promotor ya que es un potenciador capaz de conferir una fuerte expresión constitutiva en plantas (Philip N. Benfey y col., 1990) mientras que el T-NOS a pesar de que es el más utilizado puede ser sustituido por otros terminadores ejemplo la Octopina Sintetasa (OCS) (Stram y col., 2000).

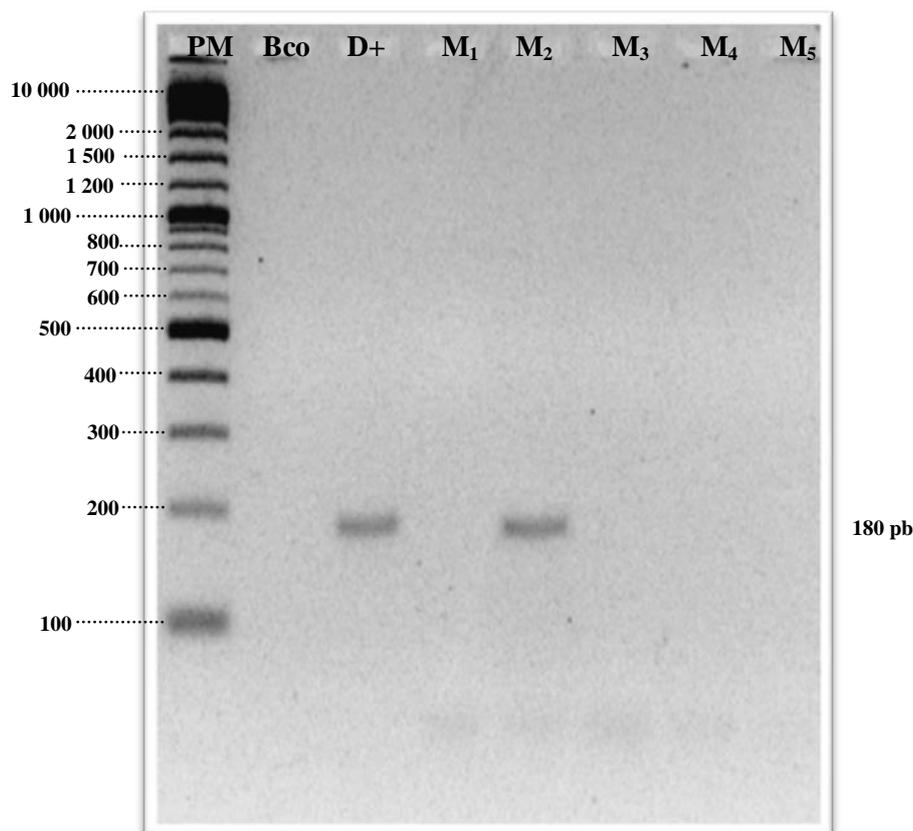


Figura 34. Detección del gen T-NOS en las primeras cinco muestras de productos comerciales en un gel de agarosa al 3% a 90v. (PM) marcador de peso molecular; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (D+) T-NOS en maíz, control positivo; (M_1) maíz palomero; (M_2) tostadas de maíz horneadas; (M_3) galletas de maíz; (M_4) tortillas; (M_5) takis.



Las siguientes muestras de productos derivados de maíz se presentan en la Figura 35, cabe mencionar que a las muestras M₆, M₇ y M₈ no se incluyen en este gel de electroforesis ya que no se les detectó maíz y tampoco el gen CaMV a pesar de haber variado la concentración de DNA. En cambio de las muestras M₉, M₁₀ y M₁₁ se puede observar que la M₉ (Tortillas Milpa Real) y M₁₀ (Elotes) si contienen algún transgénico ya que se detectó la presencia del Virus del Mosaico de la Coliflor, sin embargo, como se mencionó con anterioridad en la etiqueta no se especifica.

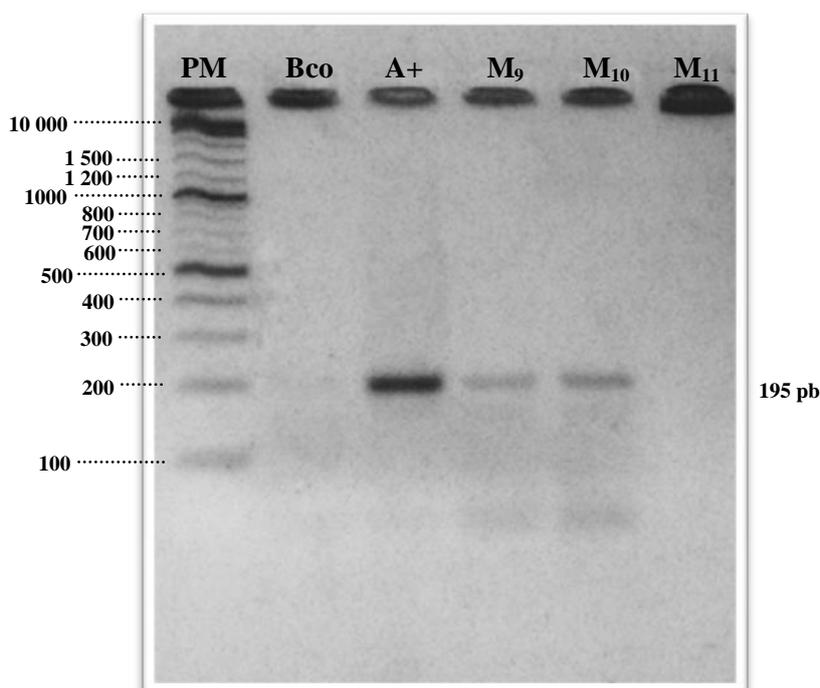


Figura 35. Detección del gen CaMV en las siguientes muestras de productos comerciales en un gel de agarosa al 3% a 90v. (PM) marcador de peso molecular; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (A+) CaMV en maíz, control positivo; (M₉) Tortillas Milpa Real; (M₁₀) Elotes; (M₁₁) Sopa.

Con respecto a la detección del gen T-NOS (Figura 36) se aprecia que ninguna muestra lo contiene, podría ser porque la cantidad de DNA presente es mínima o que se encuentra degradado en su totalidad impidiendo la detección por PCR. También se varió la cantidad de DNA utilizado para la reacción (0.5, 1 y 1.5 μ L), sin embargo, los resultados fueron los mismos, el T-NOS no está presente en ninguna de las muestras presentadas en la Figura 30, aunque como se mencionó anteriormente esto tampoco quiere decir que no se tenga transgénicos porque al detectar por ejemplo el Virus del



Mosaico de la Coliflor en las muestras M₉ y M₁₀ podría considerarse entonces que se utilizaron otros terminadores y no precisamente el T-NOS que es el más frecuente.

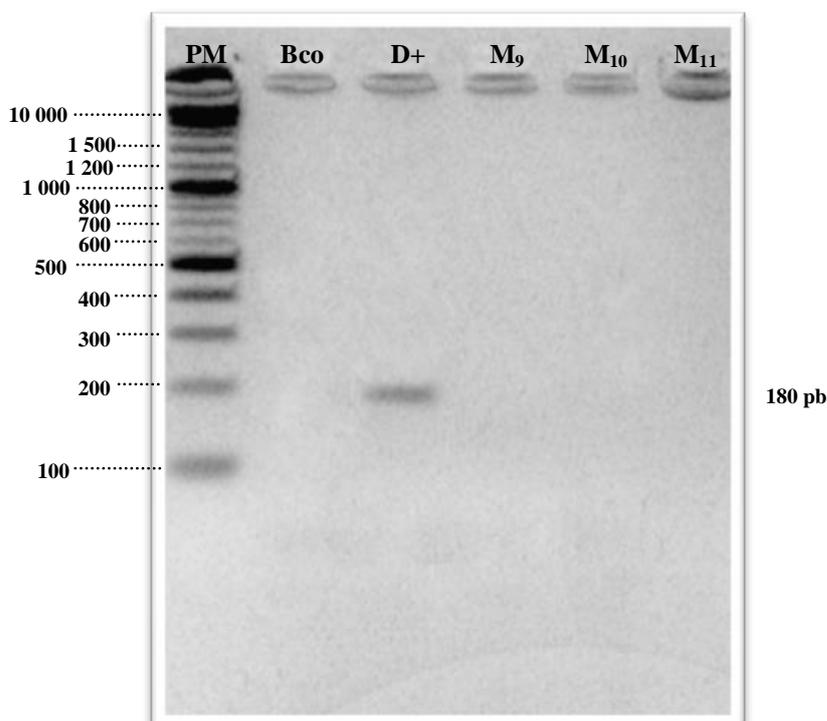


Figura 36. Detección del gen T-NOS en las siguientes muestras de productos comerciales en un gel de agarosa al 3% a 90v. (PM) marcador de peso molecular; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (D+) T-NOS en maíz, control positivo; (M₉) Tortillas Milpa Real; (M₁₀) Elotes; (M₁₁) Sopa.

DETECCIÓN DE CaMV y T-NOS EN PRODUCTOS DERIVADOS DE SOYA

Las muestras de productos derivados de soya también se presentan en partes, es decir, primero se analizaron las muestras de la S₁ a la S₅ y posteriormente de la S₆ a la S₁₁ aunque cabe mencionar que la muestra S₆, S₇, S₈, S₁₀ y S₁₁ no amplificó para soya y por ende tampoco amplificaron para CaMV y T-NOS a pesar de haber variado la cantidad de DNA.

En la Figura 37 se observa que el Virus del Mosaico de la Coliflor se emplea también como promotor para introducir genes en soya y esta ha sido utilizada para la elaboración de diferentes productos, en este caso podemos apreciar que en tres muestras (Malteada de soya, Ades y Albóndiga de soya) se encontró soya genéticamente modificada y



aunque no se sabe qué tipo de gen se le ha introducido se esperaba se reportara en la etiqueta, sin embargo, no fue así incluso la leyenda de algunos productos derivados de soya no mencionan los ingredientes con los que fue elaborado solo se sabe que contienen soya porque el nombre del producto lo indica.

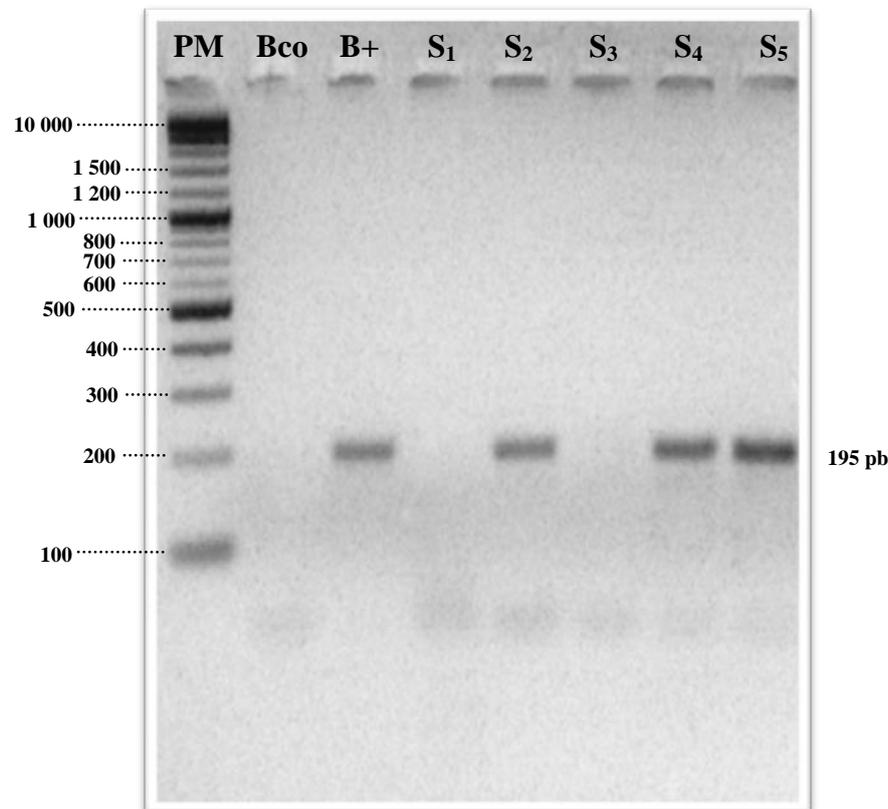


Figura 37. Detección del gen **CaMV** en las primeras cinco muestras de productos comerciales en un gel de agarosa al 3% a 90v. (PM) marcador de peso molecular 10kb; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (B+) CaMV en soya, control positivo; (S₁) Soya Pac; (S₂) Malteada de soya; (S₃) Frijol de soya; (S₄) Ades; (S₅) Albóndiga de soya.

En la Figura 38 se puede observar que de las primeras cinco muestras el gen T-NOS solo se encuentra en la Albóndiga de Soya, aunque la intensidad de la banda es baja cual a consecuencia de la cantidad y calidad de DNA obtenida de la extracción. En las muestras S₂ y S₄ donde también se encontró la presencia del CaMV y se garantiza que son transgénicas no se presentó el terminador T-NOS, esto podría ser porque como se mencionó anteriormente existen otros terminadores que podrían haberse utilizado durante la inserción de un gen. Sin embargo, en el presente estudio solo se decidió trabajar con el T-NOS.

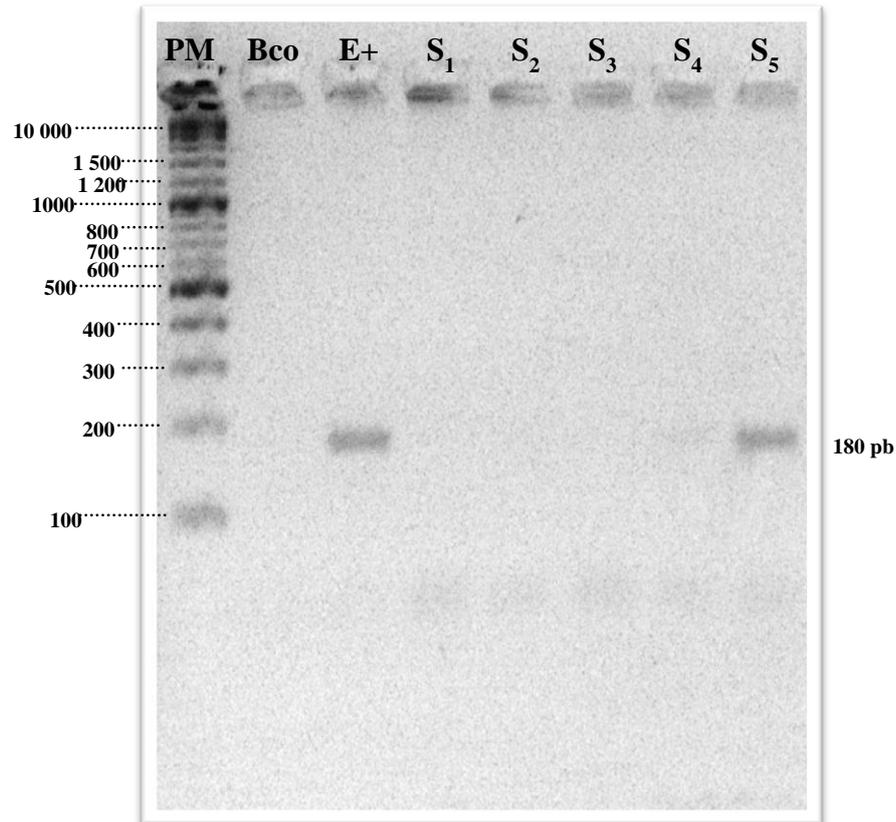


Figura 38. Detección del gen **T-NOS** en las primeras cinco muestras de productos comerciales en un gel de agarosa al 3% a 90v. (PM) marcador de peso molecular 10kb; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (E+) T-NOS en soya, control positivo; (S₁) Soya Pac; (S₂) Malteada de soya; (S₃) Frijol de soya; (S₄) Ades; (S₅) Albóndiga de soya.

En la Figura 39 se observa que se detectó el Virus del Mosaico de la coliflor en la muestra S₉ (Soy Drink) lo cual demuestra que en dicho producto se tiene la presencia de organismos genéticamente modificados y se asume que es a consecuencia de la soya a la que generalmente se le insertan genes que la hacen resistente a herbicidas.

Finalmente a la muestra S₉ también se le aplicó PCR para detectar la presencia del T-NOS (Figura 40), sin embargo, a pesar de haber variado la concentración de DNA no amplificó lo cual demuestra que no se utilizó este terminador y que pudieron haberse utilizado otros, aunque cabe mencionar que la muestra sigue siendo transgénica puesto que en la figura anterior se observó que si tiene la presencia del Virus del Mosaico de la coliflor.

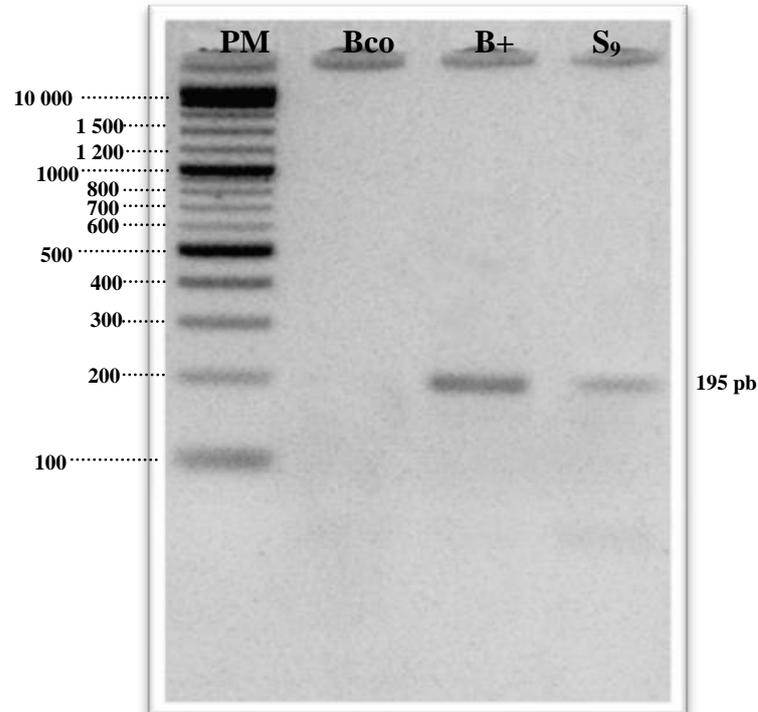


Figura 39. Detección del gen **CaMV** en una muestra comercial de soya con un gel de agarosa al 3% a 90v. (PM) marcador de peso molecular; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (B+) CaMV en soya, control positivo; (S₉) Soy drink.

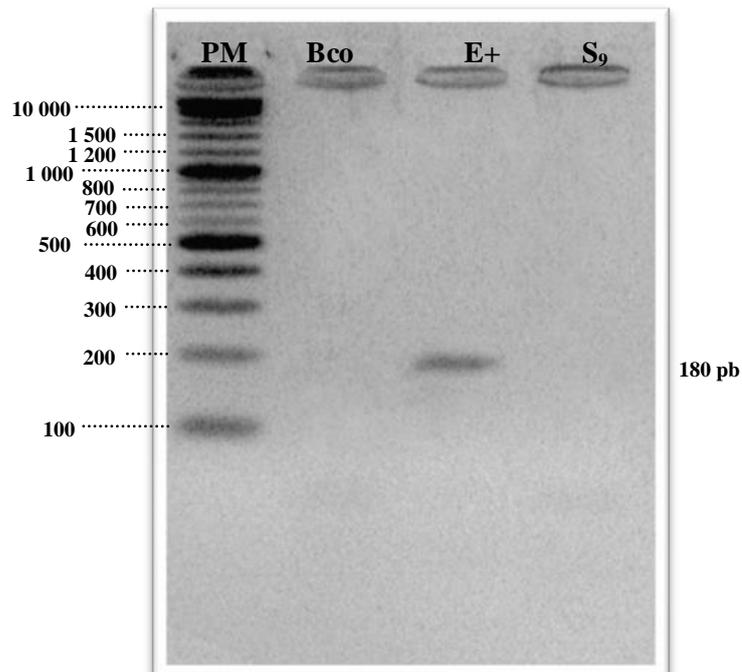


Figura 40. Detección del gen **T-NOS** en una muestra comercial de soya con un gel de agarosa al 3% a 90v. (PM) marcador de peso molecular 10kb; (Bco) muestra que no contiene DNA, control negativo; (E+) T-NOS en soya, control positivo; (S₉) Soy drink.



CONCLUSIONES

La metodología desarrollada para la detección de organismos genéticamente modificados fue efectiva ya que se encontraron fragmentos de DNA del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) y del Terminador de la nopaline sintetasa (T-NOS) en algunos productos derivados tanto de maíz como de soya demostrando que a pesar de que existen leyes que exigen que en el etiquetado se especifique si algún ingrediente del producto está modificado genéticamente, no se cumplen. En el caso de los alimentos transgénicos, la ley de Bioseguridad de OGMs se encarga día a día de vigilar y monitorear todos aquellos productos que declaran tener la presencia de organismos genéticamente modificados, sin embargo, de acuerdo al presente estudio se puede observar que en la actualidad en México se consumen alimentos comerciales con residuos transgénicos que carecen de etiquetas que informen acerca de esos residuos.

Se demostró que los primers utilizados para la detección del CaMV y T-NOS no sólo pueden utilizarse para detectar maíz transgénico sino que también para soya genéticamente modificada, así mismo se puede decir que el gen CaMV es el que se utiliza con mayor frecuencia para introducir genes foráneos mientras que el T-NOS puede ser sustituido por otros terminadores, sin embargo, para el presente trabajo se decidió trabajar con ambos ya que se tenían precedentes de los mismos en el desarrollo de otros proyectos relacionados con el tema.

Con la técnica de PCR se ha logrado detectar la presencia de maíz y soya en los diferentes productos, no obstante, a pesar de haber aplicado PCR directo no se logró la amplificación de todas las muestras debido a que posiblemente el DNA se encontraba degradado a consecuencia del tipo de procesamiento al que fue sometido el alimento o al tipo de ingredientes que contienen los cuales podrían inhibir algunos reactivos utilizados desde la extracción de DNA. También podría decirse que al no detectar la presencia de DNA ya sea de maíz o soya, respectivamente, en los productos la causa podría ser que no se estén presentes a pesar de declararse en la etiqueta.

La selección de los primers de maíz y de soya se había realizado ya en otros trabajos, sin embargo, en el presente proyecto se describió la metodología que debe seguirse para elegirlos, así mismo, se puede decir que los primers utilizados fueron comprobados para observar su especificidad tanto en programas bioinformáticos como de manera experimental.



Finalmente se obtuvieron resultados favorables al detectar mediante la PCR organismos genéticamente modificados. De las 11 muestras de productos derivados del maíz 4 de ellas resultaron tener la presencia del Virus del Mosaico de la Coliflor y solo una contiene tanto el CaMV como el T-NOS, lo mismo que en los productos derivados de soya 4 tuvieron el CaMV y una contiene ambos el CaMV y el T-NOS.



GLOSARIO

- Ⓢ **Aditivo:** Sustancia añadida intencionalmente a los alimentos con fines tecnológicos en cualquier etapa del proceso de elaboración.
- Ⓢ **Alérgeno:** Sustancia capaz de desencadenar una respuesta inmune en el organismo.
- Ⓢ **Amplificación:** Producción de copias adicionales de un secuencia de DNA.
- Ⓢ **Bioseguridad:** El propósito de garantizar que el desarrollo y uso de plantas transgénicas y otros organismos genéticamente modificados (y productos de los 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.
- Ⓢ **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.
- Ⓢ **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.
- Ⓢ **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 (gameto masculino), proceso mismo que subyace a la transferencia natural de genes de plantas genéticamente modificadas a sus parientes silvestres.
- Ⓜ **Fungicida:** sustancia tóxica que se emplea para impedir el crecimiento o eliminar los hongos y mohos perjudiciales para las plantas, los animales o el hombre. Todo fungicida, por más eficaz que sea, si se utiliza en exceso puede causar daños fisiológicos a la planta.
- Ⓜ **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.
- Ⓜ **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.
- Ⓜ **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.

- ④ **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).
- ④ **Polinización:** es el proceso de transferencia del polen desde los estambres hasta el estigma o parte receptiva de las flores en las angiospermas, donde germina y fecunda los óvulos de la flor, haciendo posible la producción de semillas y frutos.
- ④ **Poliformismo:** es la presencia de dos o más variantes heredables para una misma característica que coexisten dentro de una población.
- ④ **Primer o cebador:** Pequeña cadena de nucleótidos a partir de la cual la DNA polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de DNA.
- ④ **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.
- ④ **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.
- ④ **Secuenciación de DNA:** Determinación del orden de nucleótidos o bases en una muestra pura de moléculas de DNA.
- ④ **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.



- ④ **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.
- ④ **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 una organismo huésped. Un transgén puede consistir en un gen (o genes) de un organismo distinto (es decir, DNA extraño) o bien genes creados artificialmente.
- ④ **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 progenie de un organismo genéticamente modificado.
- ④ **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.
- ④ **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.
- ④ **Variación somaclonal:** es la variación genética o epi genética que se genera durante el cultivo in vitro de plantas (cultivos celulares de tejidos u órganos) que provenga de células somáticas.



BIBLIOGRAFÍA

- 1) Acquaaah, 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 27 de junio de 2012. Disponible en http://www.agropanorama.com/news/001_enero2008/05_28al00/01_global_ProduccionMundialMaiz.htm
- 3) Ahmed, F. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. Trends in Biotechnol., 20: 215-223
- 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) Appel, M., (2010). Siembra de problemas: Cultivos experimentales en México; Amenaza transgénica. PROCESO, semanario de información y análisis, 1738, 44-46.
- 6) 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.
- 7) Badui, S. (2006). “Química de los Alimentos”. 4ª ed. Pearson Educación. México
- 8) Bains, W., (2004). Biotechnology from A to Z. 3ª ed. Oxford University Press INC. United States of America. P.p. 73-74, 200-2001.
- 9) 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
- 10) 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 116 (2): 403 – 410.
- 11) Beever, D.E. y Kemp, C.F. (2000). Safety issues associated with the DNA in animal feed derived from genetically modified crops. A review of scientific and regulatory procedures. Nutrition Abstracts and Reviews (Series B: Livestock Feeds and Feeding) 70: 175-182.



- 12) Brouwer IA, Katan MB, Zock PL. (2004). Dietary alpha-linolenic acid is associated with reduced risk of fatal coronary heart disease, but increased prostate cancer risk: a meta-analysis. *British Journal of Nutrition*; 134 (4):919-22.
- 13) Calva C. G., Rios L. E. (1999). Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. En: Rodríguez V. R., Calva C. G., Ramos R. E. G., Salazar M. A. (Eds.) *Aspectos aplicados de la biotecnología*. pp 267-301.
- 14) 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.
- 15) Casini, C. (2012). Proyecto de eficiencia de cosecha, postcosecha de granos y agroindustria en origen. [México](http://www.cosechaypostcosecha.org/data/articulos/postcosecha/AlmacenamientoSoja.asp). Consultado el: 22 de Julio de 2012. Disponible en: <http://www.cosechaypostcosecha.org/data/articulos/postcosecha/AlmacenamientoSoja.asp>
- 16) Castillo, G.F. (2002). Contribuciones del fitomejoramiento al desarrollo agrícola en México. CP Montesillo Estado de México. Simposio "El fitomejoramiento ante los avances científicos y tecnológicos". XIX Congreso Nacional de Fitogenética. Pp13-19
- 17) Centro Tecnológico AINIA. (2009). Boletín Principios bioquímicos: alimentos transgénicos, principios básicos y métodos de detección. Centro Tecnológico AINIA. 1-24
- 18) Conocimientos Web. (2010). Northern blot (en línea). Consultado 27 de febrero de 2012. Disponible en <http://www.conocimientosweb.net/portal/term1542.html>.
- 19) Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (COPROICA), (2006). Soya (*Glycine max* (L) Merrill) alternativa para los sistemas de producción de la Orinoquia Colombiana. 1ra edición, Colombia. P.p. 59-61
- 20) EFE Verde. (2010). Desarrollo sostenible (Internacional/Ciencia-Maíz). Nuevo método para medir la resistencia del maíz a las sequías (en línea). Consultado 2 abril, 2012. 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>
- 21) 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.



- 22) Ferl, R., Paul A. I. (2000). Genome organization and expression. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 312-357
- 23) Food Technology (2000). Etiquetado de alimentos derivados de la biotecnología del rADN. 54: 9
- 24) Frewer, L., D. Hedderley, C. Howard y R. Shepherd. (1999). Reactions to information about genetic engineering: impact of source credibility, perceived risk immediacy and persuasive content. *Public Understanding of Science* 8 (1): 35-50
- 25) Garduño, F.G. (2010). *Revista Virtual Gastronómica*. El origen del maíz (en línea). Consultado 26 de octubre de 2011. Disponible en http://www.uaemex.mx/Culinaria/primer_numero/maiz.html
- 26) Garrido Pertierra Armando, Rivera Tejjón José María, Blanco Gaitán Dolores, Villaverde Gutiérrez Carmen, Mendoza Oltras Carlos, Ramírez Rodrigo Jesús, (2006). *Fundamentos de Bioquímica estructural*. 2ª edición, Madrid. Pág. 278
- 27) Gil, A. (2010). *Tratado de nutrición, composición y calidad nutritiva de los alimentos*. Tomo II, 2da ed., Editorial medica panamericana, Madrid.
- 28) 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.
- 29) Hayes KC. (2000). Dietary fatty acids, cholesterol, and the lipoprotein profile. *British Journal of Nutrition*; 84 (4): 397-9
- 30) Hossain, F., Onyango, B., Schilling, B., Hallman, W. y Adelaja, A. (2003). Product attributes consumer benefits and public approval of genetically modified foods. *International Journal of Consumer Studies* 27 (5): 353-365
- 31) Hurley I, Coleman R., Ireland H. y Williams J. (2004). Measurement of bovine igG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration. *Journal of Dairy Science*. 87: 215-221.
- 32) Jeremy M. B., John L. T. y Lubert S. (2008). *Bioquímica*. Reverté. Barcelona-España.
- 33) 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.
- 34) Khachatourians, G.G., Mc Hughen, A., Scorza, R., Nip, W-K., Hui, Y.A., (2002). *Transgenics plants and crops*. 1ª ed. Marcel Dekker, INC. United States of America. P.p. 637-654.



- 35) Lacadena J.R., Montoliu L., Fresno A., Barahona E., Torralba F., Gracia D., (2001). Aspectos científicos, jurídicos y éticos de los transgénicos. Universidad Pontificia Comillas, Madrid.
- 36) Lee, B. (1996). Fundamentos de biotecnología de los alimentos. Acribia, España.
- 37) Llanos, C.M. (1984). El maíz, su cultivo y aprovechamiento. Ediciones Mundi-Prensa. España.
- 38) Lockley A.K. y Bardsley R.G. (2009). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology* 11: 67-77.
- 39) López Calleja, I, González, I, Fajardo, V., Hernández, P. E., García, T. y Martín, R. (2007). Application of an indirect ELISA and PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats's milk cheeses. *International Dairy Journal*, 17: 87-93.
- 40) López Lozano Misael. (2003). El cultivo del maíz en México y la contribución del fitomejorador para favorecer la autosuficiencia. Vol. 12, P.p. 600
- 41) López, M., Mallorquín, P y Vega M. (2003). Tecnologías Moleculares de Trazabilidad Alimentaria. Informe de Vigilancia tecnológica. Sector Agroalimentario. Genoma España/CIBT-FGUAM.
- 42) López Moran Sandra. (2011). Autenticación de maíz tradicional y genéticamente modificado en productos comerciales en México. Universidad Nacional Autónoma de México. Ingeniería en Alimentos. México.
- 43) Luque José, Herraiz Ángel. (2001). Biología molecular e ingeniería genética, conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Harcourt S.A
- 44) Lusk, J., M. Moore, I. House y B. Morrow. (2002). Influence of brand and type of modification on consumer acceptance of genetically engineered corn chips: a preliminary analysis. *International Food and Agribusiness Management Review* 4: 320-331.
- 45) Margarit, E., Reggiardo, M.I., Vallejos, R.H. y Permingeat, H.R., (2006). Detection of BT transgenic maize in foodstuffs. *Food Research International*, 39: 250-255.
- 46) 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.
- 47) Micklos D; Freyer A.; y Crotty D. (2003). DNA Science. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 48) Miles, J.W., Maass, B.L., y do Valle, C.B. (1998). Brachiaria: Biología, Agronomía y mejoramiento. CIAT, Cali, Colombia.



- 49) Monografías. (2010). Métodos y aplicaciones de la biología molecular en Biomedicina (en línea). Consultado el 27 de Enero de 2012. Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos20/biologia-molecular/biologia-molecular.shtml>
- 50) Noussair, C., S. Robin y B. Ruffieux. (2002). Do consumers not care about biotech foods or do they just not read the labels? *Economics Letters* 75 (1): 47-53
- 51) 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>
- 52) Passarge, E. (2004). *Genética. Texto y Atlas. Médica Panamericana*. Buenos Aires, Argentina
- 53) Patent Lens, (2010). The CaMV 35S promoter (en línea). Consultado 16 mayo, 2012. Disponible en <http://www.patentlens.net/daisy/promoters/242/g1/250.html>
- 54) Perera, J., Tormo, A., García, J. L. (2002). *Ingeniería genética: expresión de DNA en sistemas heterólogos. Volumen II. Editorial Síntesis. España. P.p. 41-55*
- 55) Perera J., Tormo A. y García J. L. (2002). *Ingeniería genética, preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA. Síntesis, Madrid España. Vol. 1: 40-48, 223-229.*
- 56) Philip N. Benfey, Ling Ren and Nam-Hai Chua. (1990). Tissue-Specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant developmen. *The EMBO Journal* Vol. 9, no. 6. Pp. 1677-1684, Laboraroty of Plant Molecular Biology, Rockefeller University.
- 57) Pierce Benjamín A. (2010). *Genética, un enfoque conceptual. 3ª ed. Médica panamericana, Madrid España. P.p. 505-515*
- 58) Rand WM, Pellett, Young V.R. (2003). Meta-analysis of nitrogen balance studies for estimating protein requirements in healthy adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 77 (1): 109-27
- 59) Reyes, C.P. (1990). *El maíz y su cultivo. A.G.T. México.*
- 60) Ridner Edgardo. (2006). *Soja, propiedades nutricionales y su importancia en la salud. 2da ed. Sociedad argentina de nutrición, Buenos Aires, P.p. 18-23*
- 61) Rott M., Lawrence T., Wall E., Green M. (2004). Detection and Quantification of roundup ready soy in foods by conventional and real-time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 5223-5232.
- 62) Sachinandan D., Biswajit B., Shamik P., Ayan M., Moloya G., Karan P., Sing R.; Sing T., Kumar D. y Surender L. (2011). Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. *Food control*. 22: 690-696
- 63) Sadava, D.E., Chrispeels, M.J., (2003). *Plants, genes and crop biotechnolgy. 2ª ed. Jones and Bartlett Publishers, Inc. United States of America. P.p. 528-538.*



- 64) SAGARPA (2010). La importancia del frijol de soya. (En línea) consultada el 1 de marzo de 2012, disponible en: <http://www.infoserca.gob.mx/fichas/ficha30-Soya201007.pdf>
- 65) Sambrook, J., Russel, D. (2001). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. E.U.A., Cold Spring Harbor Laboratory press.
- 66) Sánchez R. F. A., Martínez M. I. A., López I. (1998). Oportunidades de desarrollo del maíz mexicano. FIRA, Boletín informativo, Num. 309: Pag.88
- 67) Sector Agroalimentario, Genoma España. (2003). Informe de Vigilancia Tecnológica. Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria. Agenda Española de Seguridad Alimentaria. España.
- 68) Silva Castro Carlos Arturo. (2005). Maíz genéticamente modificado. Publicación agro bio, Bogotá Colombia. (En línea) consultada el 26 de noviembre de 2011, disponible en: <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Maiz20Geneticamente20Modificado.pdf>
- 69) Smith, J.E., (2004). *Biotecnología*. Acribia. España. P.p. 14-26
- 70) 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.
- 71) Stram Y. , Vilk A., Klinger I. (2000). Detection of residues of genetically modified soybeans in breaded fried turkes cutlets. *J. Food Sci.* 65: 604-606.
- 72) Tagu, D., Moussard, C., (2006). *Techniques for Molecular Biology*. Science Publishers. United States of America. P.p. 25-37
- 73) Thieman William J., Palladino Michael A. (2010). *Introducción a la biotecnología*. Pearson, Madrid, España. P.p. 57-73.
- 74) Torres T. A. G. y Baca B. E. (1995). “Reacción en cadena de la polimeraza. *Elementos*, 23: 16-21.
- 75) Verdume, A. y J. Viaene. (2003). Consumer beliefs and attitude towards genetically modified food: basis for segmentation and implications for communication. *Agribusiness* 219 (1): 91-113.
- 76) 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.
- 77) Watson, S.A. (1987). Structure and composition. En S.A. Watson y P.E. Ramstad. eds. *Corn: chemistry and technology*, St Paul, EE.UU., Am. Assoc. Cereal Chem, P.p. 53-82
- 78) Wilson, I.G., (1997). Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3741-3751.



ANEXO A

- Obtener la secuencia genética del gen de interés (Citocromo b de maíz y de soya) en GenBank.

Secuencia de Citocromo b de soya gi333031609

Secuencia de Citocromo b de maíz gi94502557

El ejemplo que a continuación se presenta es el de la selección de primers para soya, cabe mencionar que se llevó a cabo la misma metodología para los primers que hibridan en la región del Citocromo b del maíz.

Glycine max cytochrome b (cob) gene, complete cds; mitochondrial

GenBank: JF437888.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#) []

LOCUS JF437888 1173 bp DNA linear FLN 01-MAR-2012

DEFINITION Glycine max cytochrome b (cob) gene, complete cds; mitochondrial.

ACCESSION JF437888

VERSION JF437888.1 GI:333031609

KEYWORDS .

SOURCE mitochondrion Glycine max (soybean)

ORGANISM [Glycine max](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; rosids; fabids; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; Phaseoleae; Glycine.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1173)

AUTHORS Li, Y., Zhao, H., Liu, X., Zhang, C. and Dong, Y.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-FEB-2011) Biotechnology Research Center, Northeast Agricultural Research Center of China, No. 1363 Cai-Yu Street, Jingyue Economic Development Zone, Changchun, Jilin 130033, China

FEATURES
 Location/Qualifiers

source
 1..1173
 /organism="Glycine max"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:2847"

gene
 1..1173
 /gene="cob"

CDS
 1..1173
 /gene="cob"
 /codon_start=1
 /product="cytochrome b"
 /protein_id="MF12208_1"
 /db_xref="GI:333031610"
 /translation="MENQRFSLLNEPISSTLNQHLIDVPTFENLSYVWQFCSLAGICL
 VQIVTGVFLAMHYTFHDLAPNFVHMDVGGWLLRVMHANGSMLIVVHLHIF
 RGLYHAYSSRFRVRCGLGVIFLIMIVTATPTGVFLWQMSFNGATVITSLSAIFV
 VSDIIVTLWGGFSVDMALNRPFSLHLLPFLLVGASLHLAALHQVSNWFLGVHS
 EMDQISFVFFVVKLVGWVAFVIFPFIYFVFNVLGHEWVIFANMFTFPHVVE
 WFLPFIHAILRSIPKSGGVAAIAVFIICLLALPFFKSMIVRSSSFRFVHQSIWLLL
 ADRLLLGWIGCVVVEAFVITGQVFFVFLFAITPFGKVGSGVFNSTYDDETQ"

ORIGIN

```

1 atgaggaaacc aacgattbct tcttctbtaa gaaactatat cctccacact taatcaacat
61 ttgatagatt atccaaaccc gagcaatctt agttattggt gggcttbgg ttgcttagct
121 ggtatbttgt tagtcaacca gatagtgact ggcgtttttt tagctatgca ttacacaact
181 catgtggatc tagctttcaa cagcgtagaa cacggtatga gagatgttga ggggggctgg
241 ttgctccggt atatgcatgc taatggggca agtatgttct tcattgtggt tcaccttcac
301 attttctggt gttcattaca tggcagttat agcagctca ggyaatttgt tgggtgtctc
361 gtagttgtaa tcttctatt aatgatgtg acagcttcta caggatacgt actaacttgg
421 ggtcagatga gcttttggg agctacagta attacaagt tagctagcgc catacctgta
481 gtaggagata ccattgtgac ttgcttttgg ggtgtttct cctgtggaca tgccacctta
541 aatcgttttt ttagtcttca tcattttact ccttttcttt tagtaggcgc cagctctbct
601 catctggcgc caatgcatca atatggatca aataatccat tgggtgtaca ttcagagatg
661 gatcaaaatt cttttcaacc ttatttttat gtaaaagatc tagtagtggg ggtagctttt
721 gctatctttt ttctcatttg gatcttttat gctctaatg ttttgggcca tccgacaact
781 tatatacctg ctaatccgat gcccaacccg cctcattatg tgcctggaatg gtaatttcta
841 ccgatccatg ccattcttgg tagtatacct gacaatcgg gaggttagc cgaatagca
901 ccagttttta tatgtctggt ggtcttacct ttttttaaaa gatatgactg cgttagttca
961 agtcttgcgc ctattcaaca aggaatattt tgggtctttt tggcggatcg cttactacta
1021 ggtgtgctcg gatgtcaacc tgtggaggca cttttgttta ctatggaca aatctctctt
1081 tttgtttctt tctgttcttt tgccataacg cccattccgg gacgagttgg aagaggaatt
1141 ccgaattctt aacaggatga gactgatcag tga
    
```

Figura A.1. Secuencia genética de la soya (*Glycine max*)



- Comparar las secuencias obtenidas entre sí para ver las diferencias que tienen. A partir de estas diferencias en la secuencia de nucleótidos se obtienen primers específicos para alguna de las especies.

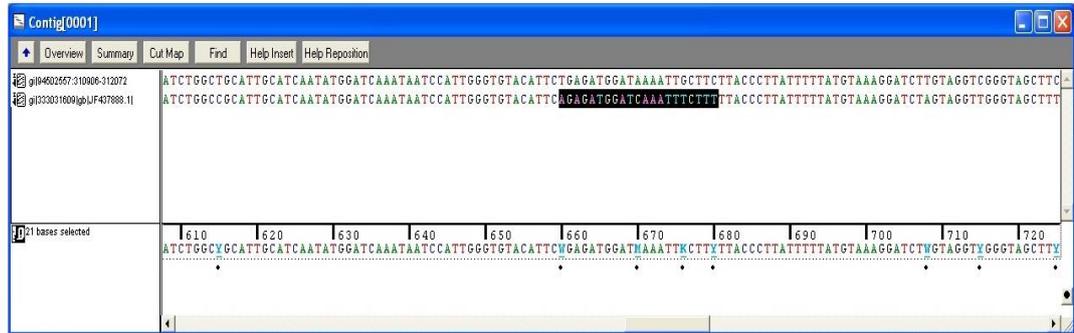


Figura A.2. Diferencias entre la secuencias de genes del maíz y de la soja

- Una vez seleccionados los primers se comprueba su especificidad en el programa bioinformático BLAST (NCBI).
Primero se introducen las secuencias de primers seleccionados en el campo correspondiente.

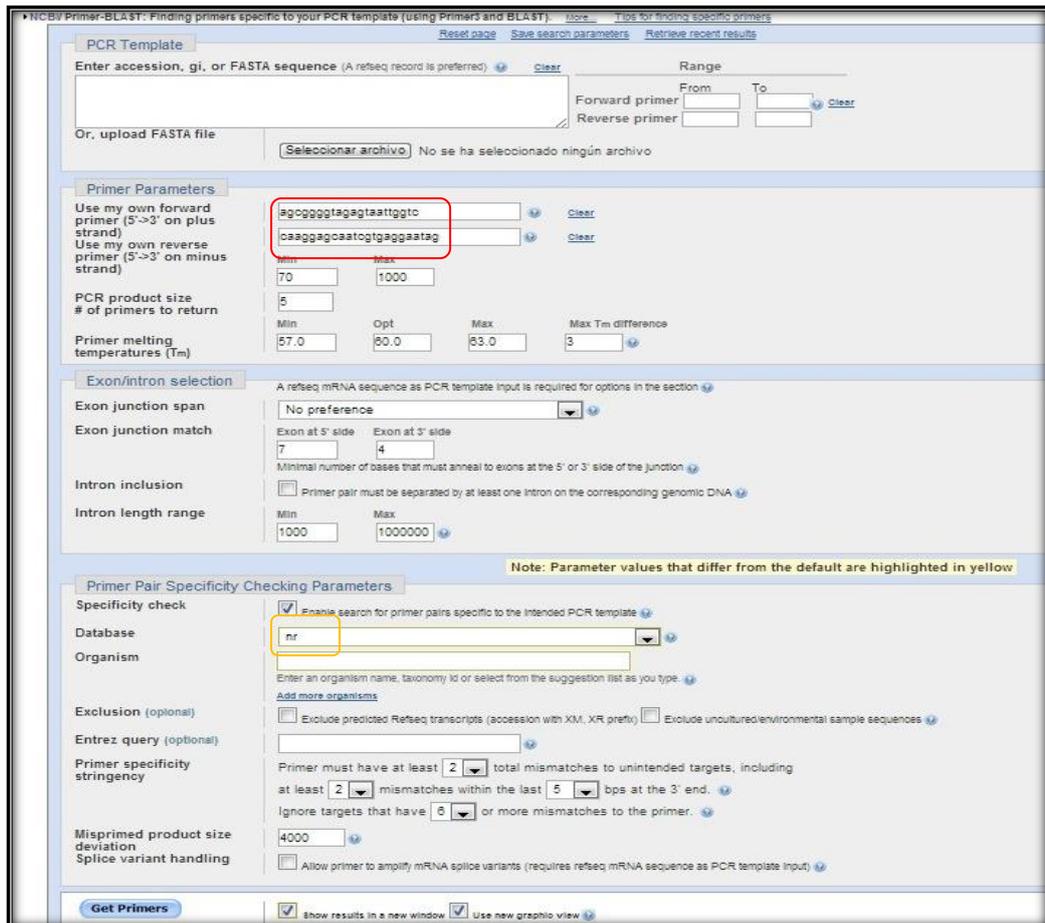


Figura A.3. Especificidad de los primers de soja en el programa BLAST



Para revisar la especificidad se cambia la base de datos a la opción “nr” del menú desplegable.

Por último se observa que los primers seleccionados alinean únicamente con la secuencia objetivo.

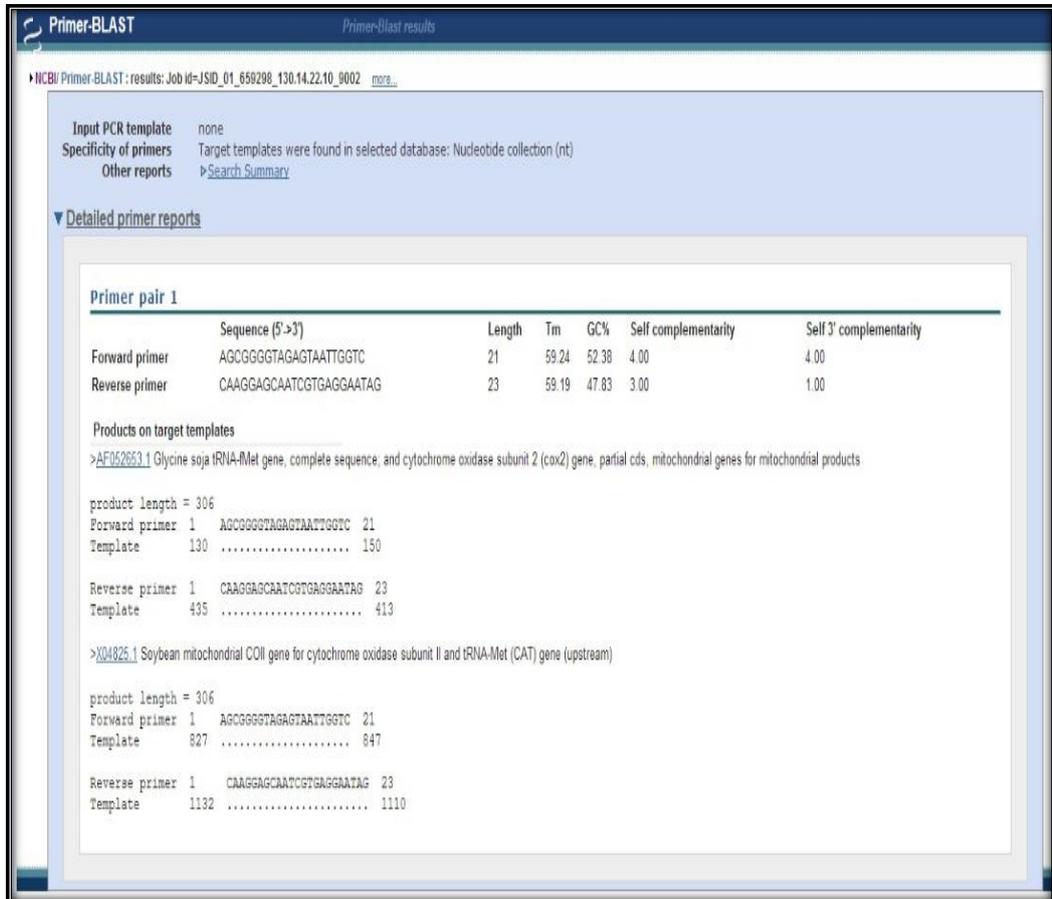


Figura A.4. Alineamiento de los primers con la secuencia objetivo