



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“IDENTIFICACIÓN DE JITOMATE GENÉTICAMENTE
MODIFICADO EN FRESCO Y PRODUCTOS COMERCIALES
EN MÉXICO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

BRENDA PAULINA MARTÍNEZ GARCÍA

ASESORES

Dr. José Francisco Montiel Sosa

M. en C. Josefina Moreno Lara

CUAUTITLÁN IZCALI, ESTADO DE MÉXICO

2014



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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Identificación de jitomate genéticamente modificado en fresco y productos comerciales en México

Que presenta la pasante: Brenda Paulina Martínez García
Con número de cuenta: 305313119 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 20 de mayo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
SECRETARIO	I.A. María Guadalupe López Franco	
1er. SUPLENTE	I.A. Miriam Álvarez Velasco	
2do. SUPLENTE	Dr. Omar Reyes Martínez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac

*"Somos lo que hacemos repetidamente.
La excelencia, entonces, no es un acto,
sino un hábito . . ."*

(Aristóteles)

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme estar viva y llegar al culmino de esta etapa tan importante en mi vida; dándome salud, fortaleza y sabiduría día con día para realizar mis objetivos.

A mi familia por su apoyo y entrega incondicional, por ser día con día mi más grande inspiración y, en los momentos difíciles, el pilar que me sostiene; dedico con todo amor y respeto este logro esperando que también lo sientan como suyo.

A mis padres Maricela García Sánchez y Pablo Martínez Maldonado, por cuidar cada detalle de mi vida dando siempre lo mejor de sí para mi bienestar, por depositar en mí todo su amor y confianza, por regalarme la valiosa oportunidad de una formación profesional y por darme todo de ellos sin escatimar en nada.

A mi hermano Pablo Iván Martínez García, por ser mi amigo y cómplice durante estos 21 años, por permitirme ser parte de su vida, su educación y sobre todo por toda la alegría que le da a mi existencia.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme formar parte de la máxima casa de estudios y brindarme grandes e invaluable conocimientos técnicos y valores, así como inculcar en mí un compromiso social para la mejora de nuestro país.

A todos los profesores que contribuyeron durante toda mi formación profesional, especialmente a mis asesores el Dr. Francisco Montiel Sosa por brindarme los conocimientos y recursos así como la confianza depositada en mí para la realización de este proyecto; y a la M. en C. Josefina Moreno Lara por su confianza y gran apoyo incondicional a lo largo de este tiempo.

A mis amigos, por ser una pieza clave en mi vida y compartir conmigo una parte de la suya, por estar a mi lado en todos los buenos momentos pero sobre todo en los más difíciles y por todas las experiencias que hemos vivido.

“Por mi raza, hablará el espíritu”.

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT con clave IN211413 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, por la ayuda brindada para la realización de este proyecto.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iii
AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	xiii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1. GENERALIDADES DEL JITOMATE Y SUS PRODUCTOS DERIVADOS	1
1.1. Antecedentes del jitomate.....	1
1.1.2. Clasificación.....	3
1.1.2.1. Clasificación botánica.....	3
1.1.2.2. Clasificación agronómica.....	3
1.1.2.3. Clasificación del fruto.....	4
1.1.2.4. Morfología del jitomate	5
1.1.2.5. Fisiología del jitomate	8
1.1.3. Propiedades sensoriales.....	8
1.1.4. Composición y valor nutritivo	10
1.1.5. Plagas y enfermedades	11
1.1.6. Cadena productiva del jitomate.....	13

Página

1.1.6.1. Proceso de elaboración de conservas de jitomate	14
1.1.7. Entorno Nacional.....	22
1.2. INGENIERÍA GENÉTICA EN LOS ALIMENTOS.....	24
1.2.1. Plantas y alimentos transgénicos.....	24
1.2.2. Biotecnología.....	25
1.2.3. Mejora genética en plantas.....	26
1.2.4. Cultivos transgénicos	27
1.2.5. La ingeniería genética molecular en la mejora de plantas.....	41
1.2.6. Las secuencias 35S y T-NOS en eventos transgénicos	43
1.2.7. Aspectos ecológicos	44
1.2.7.1. Beneficios y riesgos de plantas transgénicas.....	45
1.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN LA DETECCIÓN DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS.....	46
1.3.1. Descripción.....	46
1.3.2. Fundamento	46
1.3.3. Etapas de la PCR	47
1.3.4. Componentes para llevar a cabo la PCR.....	50
1.3.5. Evaluación de PCR por electroforesis.....	51
 CAPÍTULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	 53
2.1. Cuadro metodológico.....	53
2.1.1. Descripción del cuadro metodológico	54
2.2. MATERIALES Y METODOS.....	58

2.2.1. Muestras requeridas	58
2.2.2. Reactivos, material de laboratorio y equipos	61
2.2.3. Metodología	62
2.2.3.2. Cuantificación de la concentración de DNA por absorbancia	64
2.2.3.3. PCR	65
2.2.3.4. Electroforesis horizontal en gel de agarosa	67
2.2.3.5. Visualización de los geles	69
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
CONCLUSIONES	87
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
GLOSARIO	96
ANEXO 1	102

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Morfología del jitomate .	6
Figura 2. Fisiología del jitomate	7
Figura 3. Daños causados por plagas en el jitomate	12
Figura 4. Diagrama de los pasos empleados en la determinación de un tratamiento térmico	20
Figura 5. Producción de jitomate en México	22
Figura 6. Producción de jitomate en México a lo largo del año.	23
Figura 7. Producción estacional de jitomate en México	24
Figura 8. Tipos de manipulación y cultivos in vitro de sistemas vegetales	29
Figura 9. . Representación esquemática de un gen exógeno para la transformación genética de plantas	33
Figura 10. Tumores causados por <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> en plantas	35
Figura 11. Representación esquemática de los prototipos de vectores que son usados para la transformación genética de plantas usando el sistema de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
Figura 12. Transformación genética por microinyección	38
Figura 13. Transformación genética por electroporación	39
Figura 14. Transformación genética por biobalística	39
Figura 15. Secuencia de nucleótidos del promotor CaMv 35S	44
Figura 16. Etapas de temperatura que se realizan en cada ciclo de la PCR convencional.	48
Figura 17. Método de Sambrook para la extracción de DNA.	56
Figura 18. Programa de amplificación para jitomate fresco	66
Figura 19. Programa de amplificación para jitomate transgénico	67
Figura 20. Cámara fotográfica y transluminador	69
Figura 21. Par de primers seleccionados para amplificar jitomate	70
Figura 22. Programa de PCR establecido para jitomate	71
Figura 23. DNA extraído de productos derivados de jitomate	72
Figura 24. Amplificación de jitomate fresco visualizado en gel de agarosa al [1%].	75
Figura 25. Especificidad de primers visualización en gel de agarosa al [1%].	76
Figura 26. Amplificación de jitomate en productos, visualizado en gel de agarosa al [1%].	77

Figura 27. Amplificación de jitomate en productos, visualizado en gel de agarosa al [1%].	78
Figura 28. Amplificación de CaMv en jitomate fresco, visualizado en gel de agarosa al [2%].....	79
Figura 29. . Amplificación de CaMv en jitomate fresco, visualizado en gel de agarosa al [2%].....	80
Figura 30. Amplificación de T-NOS en jitomate fresco, visualizado en gel de agarosa al [2%].....	81
Figura 31. Amplificación de CaMv en productos de jitomate, visualizado en gel de agarosa al [2%]..	82
Figura 32. Amplificación de T-NOS en productos de jitomate, visualizado en gel de agarosa al [2%]. .	83

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Componentes principales de 100g de porción comestible de jitomate.....	10
Tabla 2. Muestras de jitomate fresco analizadas.....	59
Tabla 3.Muestras de productos derivados de jitomate analizadas.	60
Tabla 4. Componentes de la PCR, preparación de la reacción.....	65
Tabla 5. Cantidades para cargar el gel de electroforesis.	68
Tabla 6. Cuantificación de DNA en muestras de jitomate fresco.....	72
Tabla 7. Cuantificación de DNA en muestras de productos derivados de jitomate.	73
Tabla 8. Identificación de las secuencias CaMv y T-NOS en las muestras analizadas.....	84

RESUMEN

Hoy en día, en México se comercializan un gran número de alimentos en cuya composición se encuentran organismos genéticamente modificados (OGM), conocidos también como transgénicos. En los últimos años se ha desatado una gran polémica sobre este tema, debido a la falta de información sobre los organismos transgénicos, la mayoría de los consumidores creen que son malos para la salud, sin embargo, no existe ningún resultado obtenido por métodos científicos que demuestre que los transgénicos que actualmente se encuentran en el mercado, sean peligrosos para la salud del consumidor. En cualquier caso, el consumidor tiene derecho de ser informado de forma completa a través del etiquetado, para poder decidir deliberadamente si quiere o no consumir alimentos transgénicos.

El jitomate es un cultivo muy importante para México, pues representa su principal producto de exportación; tan solo basta mencionar que este cultivo supera por sí solo a todos los demás casos de éxito de exportaciones como lo son: aguacates, cítricos, mangos y plátanos. Siendo lo anterior la razón principal para la producción de jitomate transgénico. Por ello en el presente trabajo se realizó un estudio a jitomate en estado fresco y a productos derivados del mismo, con la finalidad de detectar en ellos, la presencia de las secuencias del virus del mosaico de la coliflor (CaMv) y el terminador de la nopalina sintetasa (T-NOS), utilizadas por la ingeniería genética para la inserción de genes, que en el caso del jitomate le confieren ciertas características que originalmente no posee, como son la resistencia a plagas y a situaciones climáticas adversas.

De manera general, el proyecto aborda temas como son los antecedentes del jitomate, la ingeniería genética aplicada a los métodos más comúnmente utilizados para la producción de OGM, así como el papel de la biología molecular para la detección de estos organismos.

Finalmente se presentan los resultados obtenidos, por medio de los cuales se logró confirmar la presencia de organismos genéticamente modificados tanto en jitomate fresco como en productos derivados.

Los resultados fueron obtenidos gracias a la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, la cual permite identificar secuencias de DNA específicas mediante la amplificación de un

fragmento de DNA, con lo que se pudo comprobar que en México se están consumiendo alimentos transgénicos sin que el consumidor decida si prefiere o no adquirirlos, ya que estos no se reportan en su etiqueta.

INTRODUCCIÓN

La biotecnología incluye cualquier técnica que utilice organismos vivos o partes de los organismos para fabricar o modificar productos, con lo que se pueden mejorar plantas, animales o bien desarrollar microorganismos para usos específicos (Rodríguez Villanueva, 2008). La manipulación genética de las plantas en beneficio del hombre es parte de la biotecnología (Gafo, 2001). En 2010 aproximadamente el 10% de la superficie de cultivo total mundial fue plantado con organismos genéticamente modificados (OGM) (Pengue, 2000). Aunque la mayoría de los OGM comerciales, pertenecen a las cuatro especies: soja, maíz, algodón y colza, hay otras 20 especies más. La Organización de las Naciones Unidas calcula que para el año 2050 la población mundial será de 16 mil millones de habitantes, por lo crece la preocupación debido a todos los problemas medioambientales y el impacto de éstos sobre los sistemas productivos por lo que la ingeniería genética ha contribuido generando organismos genéticamente modificados. (Badui, 2006). Todos estos factores contribuyen a la creciente complejidad de la detección y la correcta identificación de material derivado de OGM. Los organismos genéticamente modificados se definen como organismos "en los que se ha alterado el material genético de una manera que no ocurre en el apareamiento y / o recombinación natural" (European.Commission, 2001). A partir de los primeros desarrollos de la ingeniería genética, la sociedad científica ha manifestado su preocupación por esta nueva tecnología (Berg et al., 2004). Casi todos los OGM desarrollados hasta el momento han sido modificados mediante la inserción de ADN extra (BCH, 2011; CERA, 2012; COMPASS, 2012). Una modificación genética es, por lo tanto, siempre detectable a nivel del ADN (Frizzi, 2010). El cultivo de jitomate ocupa un lugar importante entre las hortalizas en el mundo y es un producto muy apetecido. Además es una importante materia prima para la industria de transformación.

El control sanitario es necesario para limitar la incidencia de plagas y enfermedades, estas pueden variar notoriamente según el clima, suelo, variedades y regiones de producción. A estas dos razones principales se atribuye el hecho de realizar modificaciones genéticas a dicho cultivo.

El presente estudio se realizó porque hoy en día existe la comercialización de cultivos transgénicos no autorizados, por lo que resulta de gran interés estudiar e identificar este tipo de irregularidades. Sin embargo, la información sobre los desarrollos, pruebas de campo, autorizaciones, el cultivo, el comercio y las observaciones hechas en los laboratorios oficiales de control de OGM en los diferentes países de todo el mundo es a menudo limitada, ésta falta de información, inevitablemente, hace que sea difícil detectar e identificar los OGM, especialmente los no autorizados.



CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1. GENERALIDADES DEL JITOMATE Y SUS PRODUCTOS DERIVADOS

1.1. Antecedentes del jitomate

El jitomate fue introducido en Europa en el siglo XVI. Al principio se cultivaba como planta ornamental, por sus flores amarillas y sus bayas rojas o amarillas. A partir de 1900, se extendió el cultivo como alimento humano (Montes, 1992).

Su nombre procede del náhuatl *xictli*, ombligo y *tomatl*, tomate, que significa tomate de ombligo. Perteneció a la familia *Solanaceae*, a la especie *Lycopersicon esculentum*, y su nombre científico es *Solanum lycopersicum* (SAGARPA, 2010).

El jitomate es una planta dicotiledónea que se agrupa dentro de las hortalizas, plantas herbáceas con órganos o tejidos comestibles para la alimentación humana y que son fuente importante de vitaminas, minerales y proteínas (Rodríguez, 2001). La clasificación de los alimentos de este grupo tan amplio es complicada, dada la gran variedad de hortalizas utilizadas para consumo humano, y teniendo en cuenta que se pueden utilizar distintas partes de las diferentes especies vegetales. El *Código Alimentario Español* (C.A.E.) establece la clasificación de las hortalizas en tres apartados:

- Desde el punto de vista botánico; por la parte de la planta a la que pertenecen: frutos, bulbos, coles, hojas y tallos tiernos, inflorescencias, legumbres verdes, raíces y tallos jóvenes.
- Por su forma de presentación al consumidor: según el tratamiento tecnológico al que hayan sido sometidas.
- Por su calidad comercial: las que determine la reglamentación correspondiente.



La planta de jitomate es de porte erecto o semierecto, arbustivo y de cultivo tipo anual; cuyo fruto es una baya ovalada, redonda o periforme, de tamaño variado. Es originario de América del Sur, de la región andina, particularmente de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile. Sin embargo, su domesticación fue llevada a cabo en México (SAGARPA, 2010).

Se cultiva en las zonas templadas y cálidas. Existen notables diferencias en cuanto a los sistemas y técnicas culturales empleadas por los horticultores, según la finalidad del producto, se puede diferenciar el cultivo del jitomate para fines de consumo fresco y el cultivo de jitomate industrial para la elaboración de otros alimentos. De acuerdo con esta finalidad se usan distintas variedades. Sus técnicas de cultivo también difieren. Ocasionalmente, se usan variedades de jitomate industrial en la producción de jitomate para el consumo fresco (Mondoñedo, 2000).

La existencia de zonas productoras diferentes justifica la necesidad de ensayar variedades aceptables y técnicas de cultivo adaptadas al suelo, clima y además requisitos de crecimiento. El control sanitario es necesario para limitar la incidencia de plagas y enfermedades. Éstas pueden variar notoriamente según clima, suelo, variedades y regiones de producción (Mondoñedo, 2000).

Los estudios sobre métodos de cosecha, clasificación y empaque son básicos para lograr un mercado y comercialización benéficos. Lo anterior es válido también para conquistar mercados lejanos. La producción de jitomate para el consumo fresco requiere una comercialización inmediata y continua. La producción de jitomate industrial se hace casi siempre bajo contrato entre productor y procesador. El comprador suele estipular la fecha de siembra y la variedad que desea. Él también acostumbra suministrar los insumos para el cultivo (Nuez, 2001).

El cultivo de jitomate es de gran importancia, ya que representa para nuestro país una fuente importante de divisas, al ser ubicado como el tercer país exportador en el mundo. Para México, representa 41% del total de las exportaciones agrícolas, de las cuales 22% son exclusivamente jitomates (Moor, 2004). En el año 2000, la exportación de jitomate generó a México divisas por un monto de 462.6 millones de dólares (INEGI, 2002).



Las siguientes razones destacan la importancia mundial del jitomate:

- Su variedad de uso para el consumo fresco.
- Su variedad de uso como ingrediente principal en jugos, pastas, bebidas y otros concentrados.
- Su sabor universalmente apreciado, ya que existen más de 120 recetas culinarias.
- Su valor nutritivo, porque contiene relativamente altos niveles de vitamina A y C.
- Su alto valor comercial por unidad de superficie cultivada (Mondoñedo, 2000; SAGARPA, 2000).

1.1.2. Clasificación

1.1.2.1. Clasificación botánica

Botánicamente, el jitomate se clasifica como *Solanum lycopersicum*. Este género pertenece a la familia de las solanáceas. Dicha familia abarca varias especies de importancia económica. Los géneros más importantes de las solanáceas son: el jitomate, la berenjena, el pimentón, los ajíes y el tomillo, o tomate de cáscara. También la papa y el tabaco pertenecen a esta familia. Debido a la hibridación y selección entre las especies de *Lycopersicum*, existen varios tipos. Del jitomate *Solanum lycopersicum* se reconocen, por ejemplo, los siguientes tipos botánicos (Mondoñedo, 2000).

- **Comune:** Jitomate común.
- **Grandifolium:** Jitomate hoja de papa.
- **Validum:** Jitomate erecto, arbustivo.
- **Cerasiforme:** Jitomate cereza.
- **Pyriforme:** Jitomate pera.

1.1.2.2. Clasificación agronómica

Según el hábito de crecimiento, se pueden distinguir dos tipos distintos: determinados e indeterminados. La planta determinada es de tipo arbustivo, de porte bajo, pequeño y de



producción precoz. Se caracteriza por la formación de las inflorescencias en el extremo del ápice (Mondoñedo, 2000).

El jitomate de tipo indeterminado crece hasta alturas de dos metros, o más, según el empalado que se aplique. El crecimiento vegetativo es continuo y de acuerdo a la velocidad de su desarrollo. La inflorescencia no es apical sino lateral. Este tipo de jitomate tiene tallos axilares de gran desarrollo. Según las técnicas culturales, se eliminan todos o se dejan algunos (Mondoñedo, 2000).

Para la producción mecanizada se prefieren las variedades de tipo determinativo, que son bajos o arbustivos (Mondoñedo, 2000).

1.1.2.3. Clasificación del fruto

Existen tres maneras de clasificar el jitomate, según su forma, madurez y color. De acuerdo a su forma, existen cinco tipos, del más pequeño al más grande: cherry, saladette, tipo pera, bola estándar y bola grande (SAGARPA, 2010).

Los jitomates se clasifican por su grado de madurez, el número de días entre que es plantado y su cosecha. De madurez temprana se cosechan después de 55 a 65 días. De mediana maduración se consideran de 66 a 80 días, los de mayor maduración requieren más de 80 días. De la misma manera, pueden clasificarse en función de su color. Existen verde lima, rosa, amarillo, dorado, naranja y rojo (SAGARPA, 2010).

Principales tipos de jitomate comercializado:

Cherry (Cereza). Se produce en plantas de crecimiento indeterminado. Es pequeño y de piel delgada. Se agrupan en ramilletes de 15 a más de 50 frutos. Tiene sabor dulce. Existen de color rojo y amarillo.

Saladette (Roma). Variedad italiana para conserva de jitomate pelado, fruto pequeño bi o trilocular, forma de pera, tamaño homogéneo de los frutos.

Pera. Utilizado cada vez menos, en la industria conservera para jitomate pelado.



Beef. Fruto de gran tamaño y baja consistencia. Producción precoz y agrupada. Otras variedades importantes son: Marmande, vemone, moneymaker, muchamiel, Pometa tardío, San Marzano, cocktail, ramillete, liso, entre otros (SAGARPA, 2010).

1.1.2.4. Morfología del jitomate

El jitomate es de estructura herbácea como todas las hortalizas. Morfológicamente, pueden distinguirse las siguientes partes y de la planta (Figura 1):

- (1) Una planta de jitomate del tipo indeterminado con flores y frutos al mismo tiempo.
- (2) La raíz principal se desarrolla rápidamente a profundidades mayores de un metro. Sin embargo, con el sistema de trasplante, el sistema radicular tiende a ser fibroso con muchas raíces laterales hasta de 40 cm de profundidad.
- (3) El tallo es herbáceo, pero algo lignificado en las plantas viejas. La base del tallo principal tiende a formar raíces adventicias.
- (4) La hoja está formada por varios pares de hojuelas. La superficie es pubescente. Los pelos glandulares se rompen en la poda, manchando las manos del operario.
- (5) En las axilas de las hojas están las yemas que producen chupones o tallos laterales.
- (6) En el cogollo nace el racimo que contiene hasta 40 flores. Las flores son bisexuales y se polinizan, principalmente, por medio del viento.
- (7) El pedúnculo de la flor tiene un nudo de abscisión que facilita la recolección cuando el fruto está maduro.
- (8) El receptáculo de la flor. Entre el pedúnculo y el receptáculo existe otra sección de abscisión que facilita la recolección del fruto.
- 9) De tres a 10 sépalos rodean la parte interna de la flor.
- (10) Los seis pétalos forman la corola.
- (11) Las anteras producen el polen.
- (12) El estigma recibe el polen.
- (13) El estilo sirve de conexión con el ovario.
- (14) En el ovario se produce la fecundación.



(15) Jiomate del tipo determinado, a las tres semanas de trasplante.

(16) La misma planta a las siete semanas del trasplante. Los tallos laterales terminan en una floración apical (Mondoñedo, 2000).

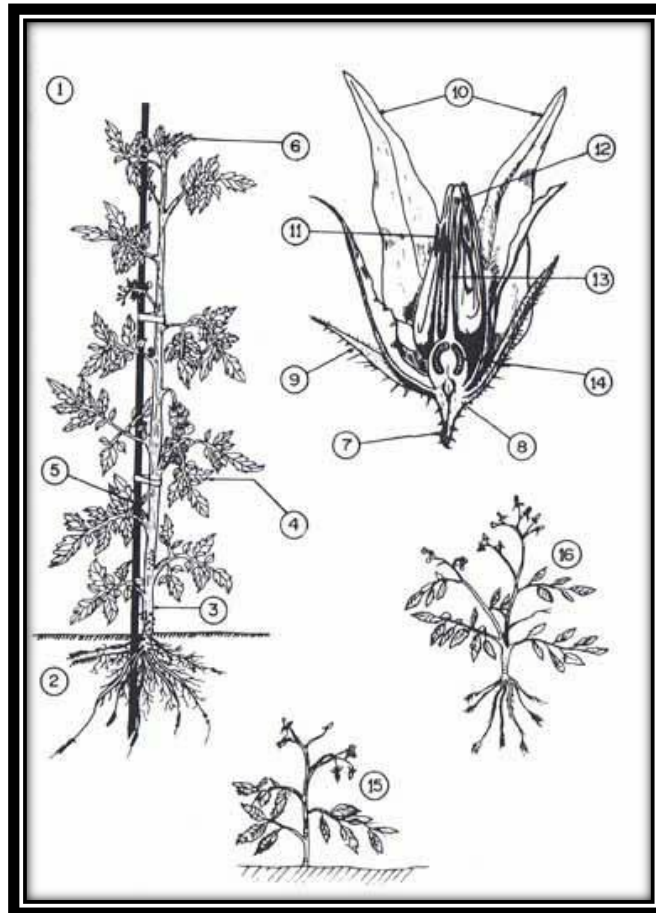


Figura 1. Morfología del jitomate (Mondoñedo, 2000).

El fruto del jitomate puede clasificarse botánicamente según el color de la piel, forma del fruto y la cantidad de celdas o carpelos. Algunos detalles del racimo, de las características de la forma del fruto y de la estructura interna del mismo son los siguientes (Figura 2):

(1) Desarrollo sucesivo de las flores y frutos. En un solo racimo puede haber, al mismo tiempo, flores en floración y frutos en pleno desarrollo. Las flores finales ya no se desarrollan más cuando el racimo está suficientemente cargado de acuerdo con el vigor del crecimiento.



- (2) Fruto de tipo redondo.
 - (3) Fruto de tipo elongado.
 - (4) Fruto de tipo acorazonado.
 - (5) Fruto de tipo pera.
 - (6) Óvulo o pared donde se desarrollan las semillas.
 - (7) Pericarpio. Éste consiste en una carnosidad externa cubierta con la piel o cáscara. La cáscara o piel puede ser rosada, roja o amarilla. El color cambia de acuerdo con el estado de madurez. La mayoría de las variedades tienen una piel amarilla y son de carne roja.
 - (8) La placenta. Esta es la parte central del fruto. Entre el pericarpio y la placenta se encuentran las paredes del ovario y las semillas.
 - (9) Los lóculos o celdas. Son los compartimientos que contienen la semilla. La cantidad de celdas tiende a tener mejor consistencia. Por ello, son más apreciados y adecuados para el consumo fresco.
 - (10) La semilla. Su forma es plana y ovalada, mide entre uno y cinco mm según la variedad y grado de desecado. Está rodeada por una capa mucilaginosa. La cascara es peluda.
- (Mondoñedo, 2000).

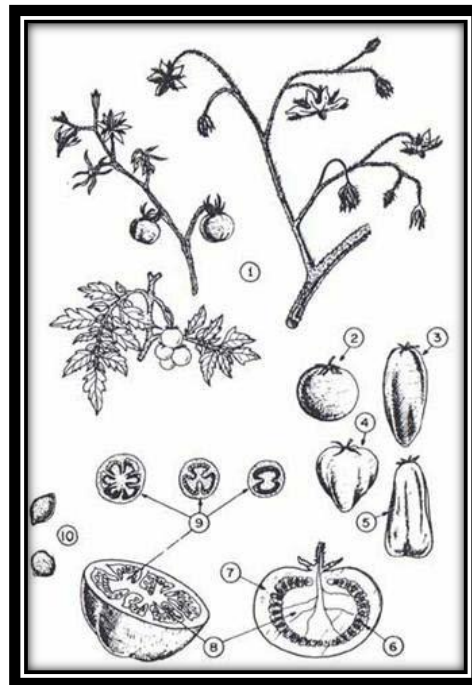


Figura 2. Fisiología del jitomate (Mondoñedo, 2000).



1.1.2.5. Fisiología del jitomate

Los procesos fisiológicos de crecimiento y desarrollo del jitomate dependen de las condiciones del clima, del suelo y de las características genéticas de la variedad. Del momento de la siembra hasta la emergencia transcurren entre seis y 12 días (Mondoñedo, 2000).

La temperatura óptima del suelo, para una rápida germinación, es de 20° a 25°C. Desde la emergencia hasta el momento de trasplante ocurren entre 30 y 70 días. El tiempo que las plantas permanecen en el semillero depende de la variedad de jitomate, de las técnicas de cultivo y de los requisitos de crecimiento. Se obtiene la primera cosecha de una variedad precoz a los 70 días después del trasplante. De una variedad tardía, bajo condiciones de crecimiento lento, se obtiene la primera cosecha a los 100 días después del trasplante (Mondoñedo, 2000).

Durante el desarrollo se guía la planta y se efectúan diferentes podas para asegurar una producción de alto volumen y de buena calidad. El tomate es neutro en cuanto a la duración de luz por día. Por lo tanto, florece a su debido tiempo de acuerdo con la edad y el desarrollo que tiene. Las temperaturas bajas y un crecimiento exuberante retardan la floración y provocan flores de difícil fecundación (Mondoñedo, 2000).

La coloración del fruto se debe a la acumulación de pigmentos. La temperatura óptima durante la maduración del fruto es de 18° a 24°C. La exposición del fruto al sol puede provocar un blanqueo o quemazón de la piel. Por esta razón, se requiere suficiente follaje para la protección de los frutos y favorecer una coloración pareja (Mondoñedo, 2000).

1.1.3. Propiedades sensoriales

En general, la preferencia del consumidor medio por un tipo de hortaliza u otro dependerá con mayor probabilidad de su sabor, aroma y olor que del conocimiento de sus cualidades nutritivas. El gusto y aroma contribuyen al sabor y ambas cualidades están tan relacionadas que resulta difícil distinguirlas o definir las. Todas ellas tienen origen químico, ya que están causadas por la presencia en las hortalizas de compuestos específicos; sin embargo, no



siempre es posible afirmar con seguridad porqué una hortaliza debe tener el gusto, aroma y sabor característicos que se asocian a ella (Sharma, 2003).

- **Textura**

La textura es una cualidad sensorial muy importante en el jitomate, hasta el punto de que una textura firme se considera índice de frescura y factor determinante de su aceptabilidad, principalmente cuando esta hortaliza está destinada a ser consumida en crudo. La marchitez, por el contrario, se considera característica de falta de frescura. Ello hace necesario un extremado cuidado después de la recolección para mantener la textura original del producto a través de los canales de distribución y venta. Esto resulta especialmente difícil en los vegetales que tienen un gran contenido en agua, como el jitomate y la papa, los cuales requieren una humedad relativa muy alta para mantener la turgencia de la estructura celular, con el grave inconveniente que esto supone por favorecer el desarrollo de hongos. La estructura celular también se altera por acción del calor, lo que aconseja el mantenimiento de las hortalizas en lugares frescos (Beltiz, 2004; Sharma, 2003).

- **Sabor y Aroma**

Las hortalizas, en general, no tienen olores y sabores tan agradables y marcados como las frutas. Los compuestos responsables de ellos son, esencialmente, ésteres, cetonas, alcoholes y aldehídos. Muchos de los olores menos atractivos y específicos de algunas hortalizas se deben a compuestos de azufre, en el caso de las hortalizas crudas e íntegras, estos compuestos de olor desagradable están unidos al azúcar y, de esa manera, se hacen inodoros.

El sabor ácido de algunas hortalizas se debe a la presencia de sustancias de esta naturaleza, como por ejemplo el ácido oxálico en los jitomates (Beltiz, 2004; Sharma, 2003).

- **Color**

El color constituye una de las cualidades sensoriales más apreciables a simple vista. Este parámetro varía bastante de unas a otras y en él tienen gran importancia, sobre todo, tres tipos de compuestos, que forman parte de su composición química:



- ❖ Las clorofilas. Pigmento más abundante en las hortalizas de hojas y responsable de los colores verdes.
- ❖ Los carotenoides, carotenos y xantofilas proporcionan los colores amarillo, anaranjado y rojo; y las antocianinas pertenecientes al grupo de los flavonoides proporcionan los colores rojo, púrpura y azulado.
- ❖ Las betalaínas, menos frecuentes, proporcionan colores violetas y amarillos (Beltiz, 2004; Sharma, 2003).

1.1.4. Composición y valor nutritivo

Desde el punto de vista químico, las hortalizas son ricas en agua, pobres en carbohidratos, proteínas y lípidos, por lo que son alimentos de escasa importancia desde el punto de vista energético. Sin embargo, tienen gran interés por su contenido en micronutrientes: vitaminas y minerales. No obstante, su composición química varía significativamente según el tipo y la procedencia (Fox, 2002).

Tabla 1. Componentes principales de 100g de porción comestible de jitomate.

COMPONENTE	CONTENIDO EN GRAMOS (g)
Agua	94.2
Proteína	1.0
Grasa	0.2
Hidratos de carbono	3.0
Ácidos orgánicos	0.5
Fibra	1.8
Sales minerales	0.6

Fuente: (Souci-Fachmann-Kraut, 2001)



En cuanto a las vitaminas, es especialmente interesante el aporte de vitamina C, fundamentalmente de las coles, espinacas, pimiento y perejil, y de vitamina A, de las hortalizas que tienen un color acusado, como por ejemplo el jitomate, zanahoria entre otras. Su principal valor nutritivo deriva de su contenido en micronutrientes (vitaminas y minerales) y en hidratos de carbono complejos difíciles de digerir (fibra de la dieta), que aunque tienen muy poco valor nutritivo, son importantes para la función intestinal (Fox, 2002).

1.1.5. Plagas y enfermedades

Existen muchas plagas y enfermedades que atacan el cultivo del tomate. La severidad de éstas varía según el clima y la región (Figura 3) (Mondoñedo, 2000).

- **Plagas**

Las más comunes son:

- ❖ *Mosca blanca*. Transmite el virus del rizado amarillo del jitomate conocido como: “virus de la cuchara”.
- ❖ *Trips*. Transmite el virus del bronceado del jitomate.
- ❖ *Pulgón*. Forman colonias y se distribuyen mediante las hembras aladas, principalmente en primavera y otoño.
- ❖ *Minadores de hoja*. Sus larvas se desarrollan dentro de la hoja, ocasionando las galerías o minas.
- ❖ *Polilla del jitomate*. Ataca a los brotes y los frutos.
- ❖ *Araña roja*. Son ácaros que producen manchas amarillentas en las hojas (Mondoñedo, 2000; SAGARPA, 2010).

- **Enfermedades**

Las enfermedades más comunes son:



- ❖ *Oidiopsis*. Son manchas amarillas que secan la hoja y la desprenden.
- ❖ *Podredumbre gris*. Produce lesiones pardas en hojas y flores. Los frutos se ponen blandos y grises.
- ❖ *Mildiu*. Aparecen manchas irregulares y aceitosas en las hojas, en el tallo son manchas pardas que lo circundan. También ataca los frutos inmaduros.
- ❖ *Fusarium oxysporum*. Comienza con la caída de las hojas superiores. Las inferiores amarillean y terminan por morirse. En un corte transversal del tallo, se observa un oscurecimiento de los vasos (Mondoñedo, 2000; SAGARPA, 2010).

Contra cada plaga existen insecticidas para eliminar el insecto y así reducir los daños. Los insecticidas llevan instrucciones de su aplicación, dosis y datos de precaución (Figura 3) (Mondoñedo, 2000).



Figura 3. Daños causados por plagas en el jitomate (Mondoñedo, 2000).

Como norma, el cultivador efectúa un programa de control preventivo. Éste consiste en lo siguiente:

- Tratamiento del suelo con un insecticida, según la plaga prevalente en la región. Para ello, se utiliza entre otros el clordano y el triclorfon antes del trasplante.
- Aspersión semanal con un insecticida sistémico hasta iniciarse la maduración. Existen el monocrotofos, metoato, parathión, demetón, metonil y muchos más.



- Aspersión semanal con un insecticida de contacto o sistémico de corta duración a partir de iniciarse la maduración. Entre otros existen el endosulfán, carbaryl y triclorfon.
- Con el fin de evitar residuos tóxicos en los frutos, se deben respetar y seguir fielmente las instrucciones señaladas en la etiqueta de los avances (Mondoñedo, 2000).

1.1.6. Cadena productiva del jitomate

La cadena productiva del jitomate enumera los procesos o actividades por los que transita el producto antes de llegar al mercado de consumo final, sea como producto fresco o procesado. Se distinguen las fases de producción primaria, procesamiento industrial y distribución (SAGARPA, 2010).

- **Fase primaria**

Plantación. El método principal es el de almácigo, consiste en sembrar las semillas en un lugar para después trasplantarlas al sitio destinado para su crecimiento.

Fetirrigación. En los cultivos protegidos de jitomate el aporte de agua y gran parte de los nutrientes se realiza de forma generalizada mediante riego por goteo.

Recolección. La mínima madurez para cosecha se define en términos de la estructura interna del fruto.

Selección. Se realiza la limpieza y selección aplicando los criterios de color, tamaño, textura y peso.

Empacado. Se realizará en cajas de madera o de cartón cuyo llenado será entre 18 y 20 kg para evitar dañar el fruto. El proceso más conveniente de empaque es intercalar un tendido de tomate y un entrepaño (SAGARPA, 2010).



- **Fase Industrial**

Los productos industrializados tienen una larga vida útil y pueden almacenarse sin necesidad de frío. El jitomate procesado incluye una gran variedad de productos, entre los que destacan: jitomate en conserva, jugo y concentrado en dos variantes, puré y pasta (SAGARPA, 2010).

1.1.6.1. Proceso de elaboración de conservas de jitomate

La conservación de los alimentos tiene como objetivo interrumpir los procesos naturales de deterioro, químicos y microbiológicos, que si se permite su progreso determinarán la alteración del producto. En la conservación de los alimentos mediante el calor, el objetivo primordial consiste en asegurar la estabilidad microbiológica del producto. Ésta suele alcanzarse introduciendo el alimento en un recipiente que será cerrado herméticamente y se someterá a un proceso térmico que destruirá o inactivará todos los microorganismos presentes en el producto capaces de originar intoxicación alimentaria o alteración, mientras permanece en condiciones normales de almacenamiento. Otra modalidad es el envasado aséptico, donde el recipiente y el alimento pueden ser calentados por separado, llenando posteriormente el recipiente que será cerrado en condiciones de asepsia (Sharma, 2003).

El enlatado es un método de preservación en el que un alimento y su envase se llevan a la esterilidad comercial por medio de la aplicación de calor, ya sea solo o en combinación con el pH y actividad de agua u otros agentes químicos. Los alimentos procesados y envasados asépticamente, comercialmente estériles, son considerados enlatados a pesar de que se pueden emplear una gran variedad de envases diferentes a las latas de metal (Fellows, 2004; Sharma, 2003).

El proceso de enlatado o elaboración de conservas depende de una serie de operaciones técnicas que se deben efectuar en forma cuidadosa y exacta para garantizar la seguridad del alimento. La preocupación principal en salud pública es la formación de la toxina botulínica en los alimentos enlatados de baja acidez (aquellos con un pH superior o igual a 4.6). Esta toxina es producida por un microorganismo resistente al calor llamado *Clostridium botulinum*.



La enfermedad producida por la toxina se conoce como “botulismo” (Fellows, 2004; Sharma, 2003).

Etapas de la elaboración de conservas de jitomate

La elaboración de alimentos vegetales enlatados consta de varias etapas que pueden resumirse de la forma siguiente:

- a) Recolección y transporte de la materia prima.
- b) Operaciones previas: lavado, limpieza, inspección, clasificación, transporte interior, pelado y troceado del jitomate.
- c) Escaldado: funciones y sistemas de escaldado.
- d) Llenado de botes.
- e) Adición del líquido de gobierno.
- f) Cierre de envases.
- g) Tratamiento térmico.
- h) Enfriamiento y secado.
- i) Operaciones complementarias (Fellows, 2004; Sharma, 2003).

Hay ocasiones, como en el enlatado, donde el alimento (generalmente líquido), sufre un tratamiento térmico antes del llenado de los botes, con lo cual el resto de las operaciones se deberán de realizar en condiciones asépticas (Sielaff, 2000).

La obtención de conservas vegetales seguras, desde el punto de vista higiénico y sanitario, depende de una correcta aplicación de calor o de cualquier otro método en grado necesario para asegurar la esterilidad comercial del producto, además del uso de cierres de envases que prevengan la posible re-entrada de microorganismos y el uso de procedimientos de manejo de envases que protejan la integridad de los envases procesados (Rees, 19994).

a) Recolección y transporte de la materia prima:

Para la obtención de un protocolo de calidad es necesario que las materias primas estén en su óptimo estado de maduración y que las variedades elegidas sean las adecuadas para el procesado al cual serán sometidas (Fellows, 2004; Sharma, 2003).



La recolección manual de las materias primas permite elegir sólo aquellos vegetales en su punto óptimo de maduración, pero la rentabilidad económica se ve muy mermada, por lo cual actualmente la recolección suele ser mecanizada. Este proceso conlleva otra serie de inconvenientes como lesiones mecánicas provocadas a muchos vegetales y la incorporación de materia extraña (Fellows, 2004; Sharma, 2003).

En el transporte de vegetales desde la zona de recolección/distribución a la industria se suele aplicar frío, ya sea con aire a bajas temperaturas, inmersión en agua fría, uso de hielo triturado o camiones refrigerados (Fellows, 2004; Sharma, 2003).

b) Operaciones previas:

Consiste en todas aquellas operaciones que sufre el producto antes del escaldado, tales como:

- **Lavado y limpieza del producto.**

Su fin es eliminar del producto los restos de materia extraña, hojas, ramas e incluso mohos, que hayan podido incorporarse a la materia prima durante la recolección y transporte de la misma. Es distinta en frutas y hortalizas. En el caso de las hortalizas se suele usar un tambor rotatorio perforado y ligeramente inclinado donde se incorpora agua. Particularmente, los jitomates se duchan con agua a presión para arrastrar los posibles mohos que puedan tener en su superficie (Fellows, 2004; Sharma, 2003).

- **Inspección del producto.**

Suele ser visual, el producto avanza por una banda transportadora y los operarios situados en ambos lados, eliminan aquellos productos que estén defectuosos. Esta banda transportadora en algunos casos lleva rodillos que hacen girar el producto para observarlo en su totalidad (Fellows, 2004; Sharma, 2003).

- **Clasificación o selección del producto.**

Las materias primas se separan en función a determinadas características propias de cada una, como son el tamaño, peso, forma, etc. La clasificación supone una serie de ventajas como son:



- Posteriormente aplicar sistemas mecanizados de pelado, deshuesado y blanqueado.
- Uniformizar todos aquellos procesos donde haya una transferencia de calor (esterilización, deshidratación y congelación).
- Un mejor control del peso de los envases.
- Hacer productos homogéneos y uniformes que sean más atractivos para el consumidor (Sharma, 2003).

Este proceso, generalmente, es mecanizado para el jitomate en particular, se utilizan bandas transportadoras con rodillos que se van separando cada vez más, lo que provoca que el producto vaya cayendo en función de su calibre (Sharma, 2003).

- **Transporte interior.**

Las materias primas pueden ser trasladadas por el interior de la fábrica de modo horizontal utilizando bandas transportadoras o rodillos. Para el movimiento vertical suelen usarse tornillos sin-fin o transportadores de cuello de cisne (Sharma, 2003).

- **Pelado de las materias primas.**

En él se separa la corteza externa del vegetal. Es importante que el pelado se realice de la forma más adecuada para cada producto, de tal forma que no se modifiquen sus propiedades sensoriales y su valor nutricional (Sharma, 2003).

Básicamente existen cinco tipos de pelado: mecánico, térmico, químico, enzimático y con infrarrojos; sin embargo, el más utilizado es:

- ❖ **Pelado enzimático.** Consiste en sumergir inicialmente el producto en CaCl_2 (cloruro de calcio) a una concentración de [20%] durante 30 segundos y, después, es congelado a una temperatura de -20°C e inmediatamente descongelado a 45°C , con esto se consigue la ruptura de la estructura celular de la piel, que libera enzimas pécticos que actúan sobre las pectinas separándose de la piel. Se utiliza mucho en jitomates porque, a diferencia del pelado térmico, presenta la ventaja de no verse afectados ni el color ni el sabor del producto y además el rendimiento es muy alto (Sielaff, 2000).



c) Escaldado de las materias primas:

Es un tratamiento tecnológico, al cual se someten gran cantidad de vegetales, consiste en un golpe térmico a una temperatura de 85°-90°C, seguido de un golpe de frío a 15°-18°C que tiene como finalidad principal la inhibición de reacciones enzimáticas y algunas otras no enzimáticas que pueden tener un efecto adverso sobre la calidad y el valor nutritivo del producto (Sielaff, 2000).

Los sistemas de escaldado más utilizados en la industria del jitomate son:

- **Con agua.** El producto es desplazado en una banda transportadora y se sumerge en un baño a una temperatura próxima a 85°-90°C y, posteriormente, en otro baño con agua a 18°C. La velocidad de la cinta determinará el tiempo de permanencia del producto en cada baño (Sielaff, 2000).
- **Con vapor.** Ya sea de modo continuo o discontinuo, el calor es transmitido por vapor al producto. Presenta la ventaja de generar menos efluentes y arrastrar menos solutos (vitaminas y minerales) que el sistema de escaldado con agua (Sielaff, 2000).

Tras el calentamiento se realiza un enfriamiento rápido para evitar que el ablandamiento sea excesivo. Este enfriamiento puede hacerse con agua o aire, siendo el último el más caro (Sielaff, 2000).

Tanto al agua de calentamiento como a la de enfriamiento, se le suele añadir [0.1%] de ácido cítrico para evitar el pardeamiento u oxidación de las partes cortadas anteriormente, por este motivo debe transcurrir el menor tiempo posible entre el cortado y el escaldado del alimento (Sielaff, 2000).

d) Llenado de botes:

Debe realizarse lo más rápido posible para evitar posibles contaminaciones del producto que hagan que el tratamiento térmico diseñado sea insuficiente. Es un proceso muy importante desde tres puntos de vista diferentes (Sharma, 2003):



- **Importancia económica.** Un excesivo llenado del envase supone una pérdida injustificada del producto (Sharma, 2003).
- **Importancia legal.** Un llenado del envase inferior al declarado en la etiqueta supone un fraude para el consumidor (Sharma, 2003).
- **Importancia técnica.** Un llenado excesivo dará lugar a grandes presiones durante el calentamiento al dilatarse el contenido, afectando a la eficacia de la transferencia de calor (Sharma, 2003).

e) Adición del líquido de gobierno:

El líquido de gobierno se utiliza con dos finalidades principales: la disminución del pH de las conservas y, a la vez, la función de antioxidante. Su composición depende totalmente del tipo de producto, en las conservas de jitomate se utiliza una salmuera (agua y sal), añadiéndose en la mayoría de las ocasiones ácido cítrico E-330 que tiene una función antioxidante. El líquido de gobierno debe ser adicionado en caliente, a unos 80°C (Sharma, 2003).

f) Cierre de envases:

Se puede llevar a cabo de forma muy diferente, dependiendo del envase utilizado (metal, vidrio, envases plásticos con tapa de metal o de vidrio, envases plásticos con tapa sellada al calor...). En cualquier caso, el cerrado se debe realizar de tal forma que evite la entrada de microorganismos y mantenga la esterilidad comercial del contenido después del procesado (Sharma, 2003).

g) Tratamiento térmico:

El objetivo primordial del tratamiento térmico es la destrucción de los microorganismos capaces de multiplicarse en el producto a la temperatura prevista de distribución o de poner en peligro la salud del consumidor. Sin embargo, para determinados productos, las propiedades organolépticas pueden ser muy importantes también a la hora de establecer la intensidad del tratamiento térmico. Para un grupo cada vez mayor de productos (en el que se incluyen las conservas), el tratamiento térmico representa solamente una parte del proceso de conservación



y suele aplicarse en combinación con otros procesos, por ejemplo, el descenso del pH, contenido de sal o las bajas temperaturas de almacenamiento (Rees, 1994).

El diseño de un tratamiento térmico es específico para cada producto. Hay que tener en cuenta dos factores a la hora de diseñarlo: en primer lugar, se debe conocer la resistencia térmica de los microorganismos del producto en cuestión (es decir, la cantidad de calor requerido para su destrucción) y en segundo lugar, debe determinarse la velocidad de calentamiento del producto en su punto más interno. Después es necesario confirmar el tratamiento mediante pruebas por inoculación de envases (Figura 4) (Rees, 1994).



Figura 4. Diagrama de los pasos empleados en la determinación de un tratamiento térmico.



En las conservas vegetales es muy común la combinación del pH con el tratamiento térmico, de tal forma, que cuanto menor sea el pH del producto, menor será el tratamiento térmico al cual se ha de someter la conserva. La FDA (Food and Drug Administration), define como alimento ácido o acidificado a aquel producto con un pH final de 4.60 o inferior y una actividad de agua mayor a 0.85. Por otro lado, los alimentos con un pH superior a 4.60 se denominan como alimentos de baja acidez (National Food Processors Association, 2001).

Existen muchos métodos para el procesado térmico de las conservas. La mayoría de los alimentos se colocan en envases, los cuales se cierran herméticamente y se procesan en algún tipo de autoclave. Éstos se conocen como sistemas de procesado térmico convencional. El procesado aséptico es un método basado en la esterilización del producto y del envase por separado, los cuales se juntan luego en un ambiente estéril para el llenado y cerrado hermético (National Food Processors Association, 2001).

h) Enfriamiento y secado:

Los envases pueden enfriarse total o parcialmente en el autoclave. Normalmente es necesario un enfriamiento a presión donde se mantiene la presión dentro del autoclave mientras los envases se enfrían lo suficiente para reducir la presión interna a un nivel seguro. Entonces el envase puede exponerse a la presión atmosférica sin el peligro de abombamiento o deformación y ruptura de los sellos (National Food Processors Association, 2001).

Hay que tener en cuenta que el agua usada para el enfriamiento de los envases debe ser clorada o desinfectada de otra manera para evitar que las posibles infiltraciones durante el enfriamiento afecten la esterilidad del producto (National Food Processors Association, 2001).

i) Operaciones complementarias:

Incluye operaciones tales como: etiquetado y marcado del producto, transporte interno del producto, paletizado, embalaje, almacenamiento, distribución y comercialización del producto (Sharma, 2003).



1.1.7. Entorno Nacional

Durante 2008, en todo México se produjeron 2.26 millones de toneladas de jitomate, siendo el principal productor el estado de Sinaloa, cuyo rendimiento representó 35% del total nacional, monto 3.8 veces mayor al obtenido por el segundo lugar, Baja California, con 9%. Siguen en la lista los estados de Michoacán, San Luis Potosí y Jalisco con 8, 6 y 5%, respectivamente. A nivel regional, a lo largo del territorio nacional, se distribuye la producción de jitomate; sin embargo, la zona productora de mayor importancia es la noroeste (Figura 5)(SAGARPA, 2010).

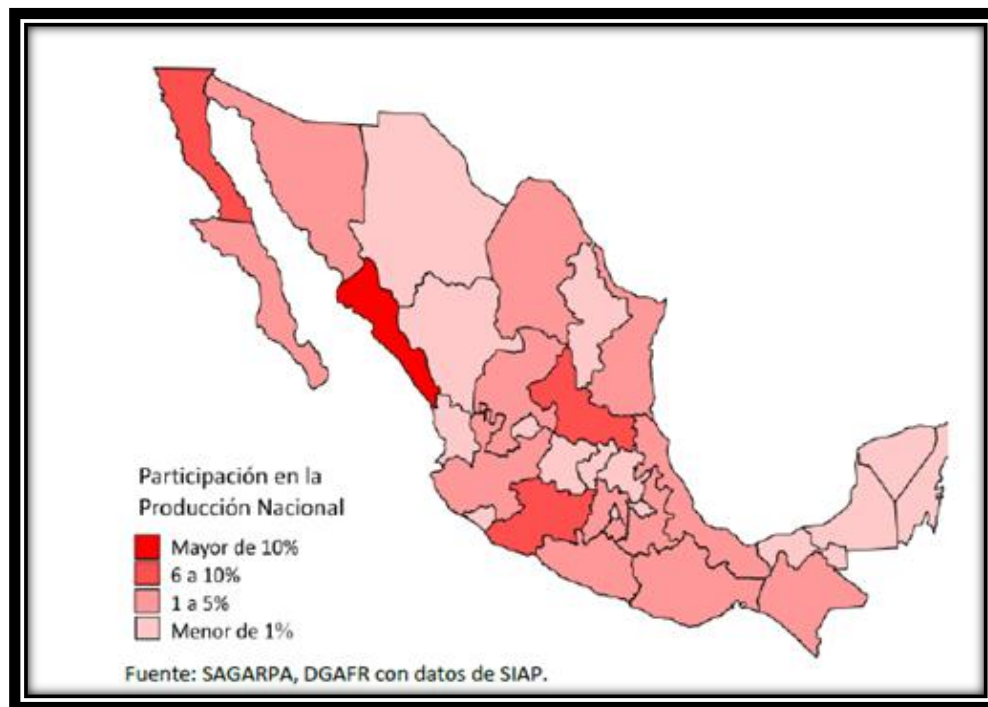


Figura 5. Producción de jitomate en México (SAGARPA, 2010).

En la República Mexicana, se produce jitomate durante todo el año. Durante los primeros meses, en el análisis temporal, es cuando se genera el tope de producción nacional en el estado de Sinaloa, que abastece al mercado nacional y la mitad del norteamericano. Por otro lado, durante el verano, la producción de los estados del centro y de Baja California, es la que



abastecen la demanda interna y de exportación. Finalmente, en los meses de agosto a diciembre, son otras entidades las que cubren la producción (Figura 6) (SAGARPA, 2010).

No obstante que el jitomate es un producto que se cosecha a lo largo de todo el año, es en los primeros meses del mismo (enero, febrero y marzo) en que se concentra su producción. Por otro lado, como se muestra en la Figura 6, su mínimo nivel lo tiene durante el verano, en los meses de junio y julio, presentando un ligero incremento hacia finales del año (Figura 7) (SAGARPA, 2010).

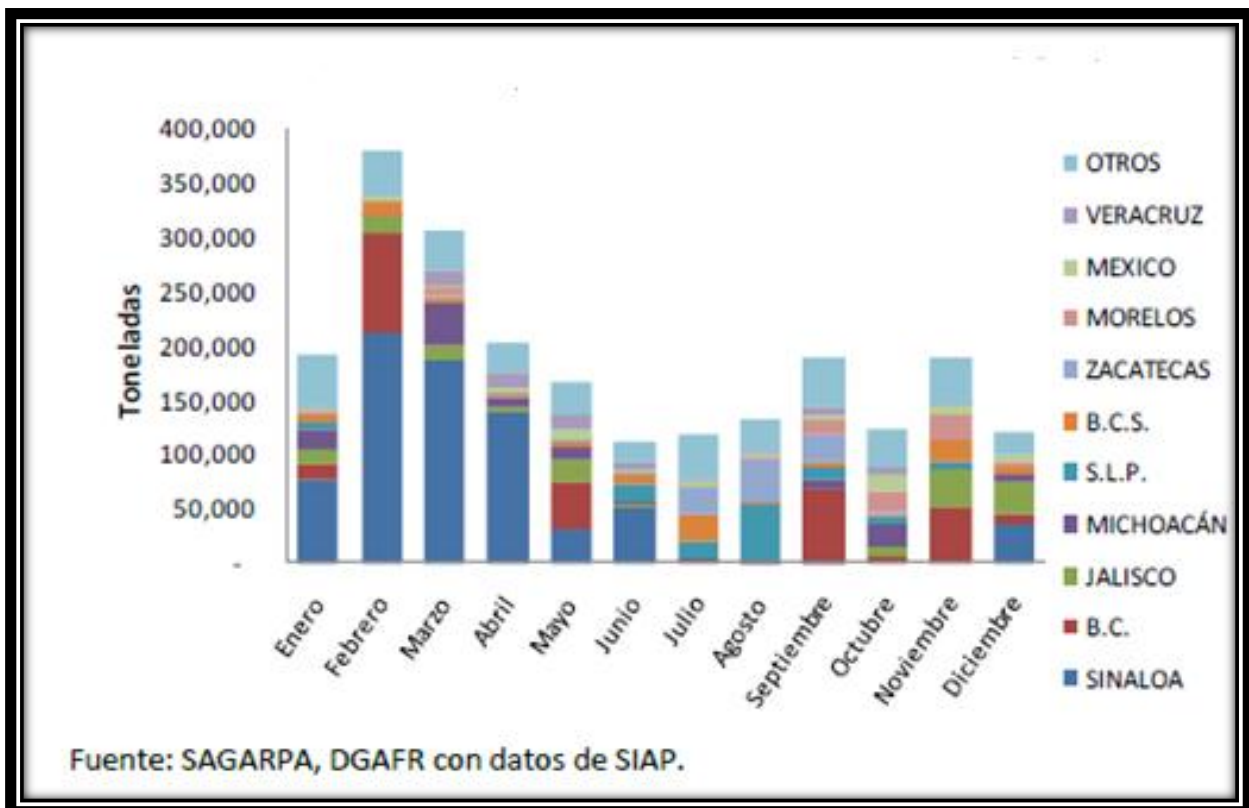


Figura 6. Producción de jitomate en México a lo largo del año (SAGARPA, 2010).

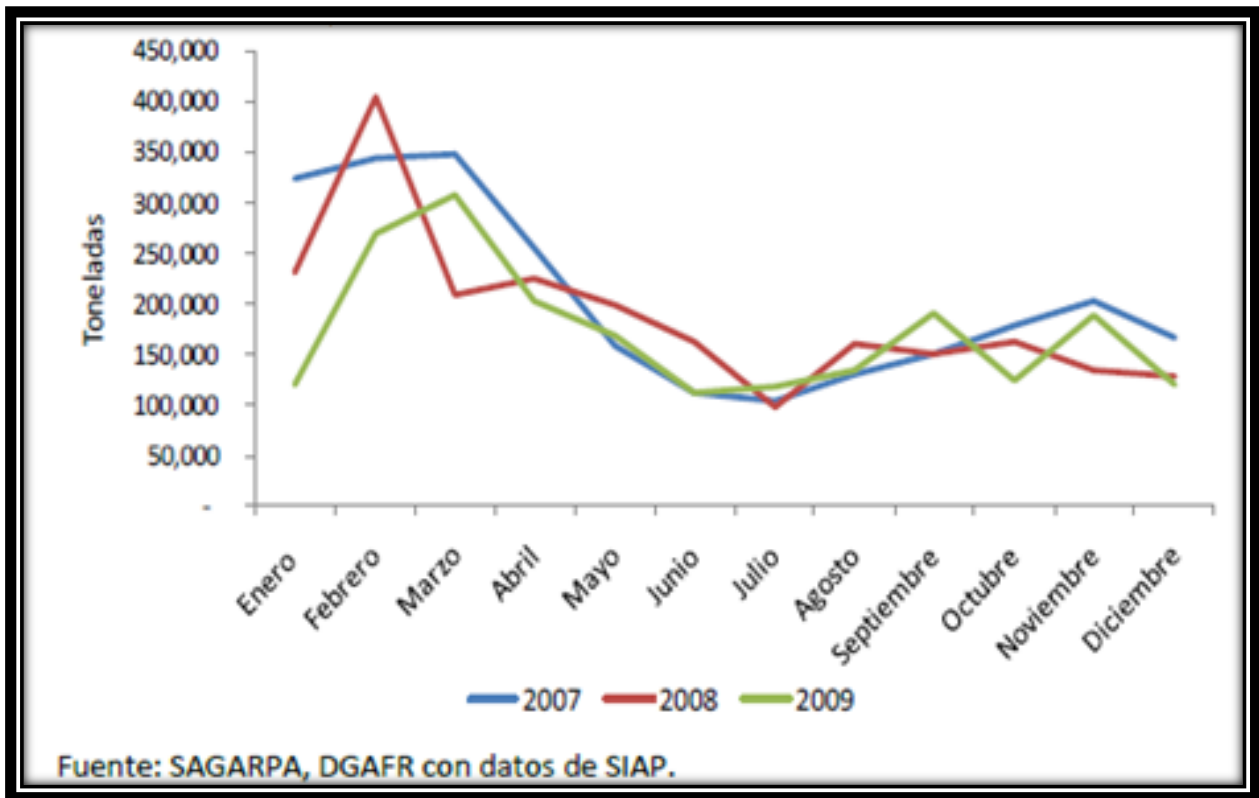


Figura 7. Producción estacional de jitomate en México (SAGARPA, 2010).

1.2. INGENIERÍA GENÉTICA EN LOS ALIMENTOS

1.2.1. Plantas y alimentos transgénicos

Según la Comisión Europea, los organismos genéticamente modificados (OGM), se definen como organismos en los que se ha alterado el material genético de una manera que no ocurre en el apareamiento y/o recombinación natural (European.Commission, 2001).

Es inadecuado llamar genéticamente modificados únicamente a aquellos que resultan de la Ingeniería Genética, para distinguirlos de los organismos modificados en forma convencional. Queda claro que el hombre empezó a modificar a los organismos vivos desde que se hizo sedentario y empezó a practicar la agricultura, por lo que, *in strictu sensu*, todas las especies en las que el hombre ha intervenido son genéticamente modificadas (Villalobos, 2008).



Una situación similar ocurre con el concepto de transgénicos, para referirse igualmente a los organismos modificados por medio de la Ingeniería Genética. Rigurosamente hablando, la transgenia hace referencia a la transferencia de genes, lo que ocurre permanentemente en condiciones tanto naturales como inducidas. Los fundamentos que sustentan las grandes diferencias entre individuos convencionales y transgénicos, son tres (Villalobos, 2008):

1. La transferencia de un gen específico y no de todo el genoma.
2. La posibilidad de transferir cualquier gen, indistintamente de que éste sea de la misma especie o no.
3. La reducción de los tiempos en la obtención de una nueva variedad o una raza pura una vez que se tenga identificado el gen de interés.

Por los argumentos anteriores, es claro que los conceptos organismos genéticamente modificados y transgénicos (considerados como sinónimos) son erróneos y no ayudan a entender la diferencia a ciencia cierta. Algunos autores consideran que el concepto “Genéticamente Mejorado” se adecua más que el de transgénico. Sin embargo, de adoptarlo, se caería en la misma confusión, pues hoy día todas las especies utilizadas en la agricultura son genéticamente mejoradas, independientemente del procedimiento empleado para tal fin. Otro concepto que se ha empleado es el de plantas con rasgos novedosos (del inglés *plants with novel traits*, PNT) que no ha sido un concepto muy utilizado internacionalmente, aun cuando pudiera ser más ilustrativo (Villalobos, 2008).

Para los objetivos del presente estudio se utilizará el término de transgénico cuando se refiera a los individuos modificados empleando la Ingeniería Genética, con objeto de que tanto el nombre como el producto sean comprendidos y evaluados en su justa dimensión, como resultado de la investigación científica que está llamada a jugar un papel importante en el desarrollo de la agricultura, de la sustentabilidad y la seguridad alimentaria (Villalobos, 2008).

1.2.2. Biotecnología

Como una forma moderna de hacer mejoramiento genético, la Biotecnología es un conjunto de herramientas tecnológicas que utiliza los mismos principios de la genética convencional y los



aplica igualmente a los organismos vivos o sustancias de esos organismos para hacer o cosechar un producto, mejorar plantas y animales o desarrollar microorganismos para usos específicos (Villalobos, 2008).

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 la década 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, 2004).

1.2.3. Mejora genética en plantas

La necesidad del ser humano de obtener diferentes fuentes que le proporcionen alimentos en diferentes regiones y ambientes dio lugar al nacimiento y desarrollo de la agricultura. Aun cuando la “biotecnología” es un término relativamente reciente, sus orígenes se pueden rastrear en los albores de la civilización humana, cuando para subsistir, los campesinos del neolítico empezaron a modificar su ecosistema al seleccionar de sus cosechas cierto tipo de semillas para sembrar en el siguiente periodo (Barahona, 2004; Jhonson, 2002).

La Ingeniería Genética es una forma novedosa de mejoramiento genético de plantas y animales que permite modificar a los organismos vivos en forma muy precisa, involucrando únicamente a uno, o a un limitado número de genes y no todo el genoma como ocurre con el mejoramiento genético convencional, donde se involucran todos los genes tanto deseables como no deseables. La Ingeniería Genética, sin embargo, tiene el mismo principio que sustenta la mejora genética convencional ya que, en ambos casos, los genes deseables,



seleccionados a criterio del hombre, son seleccionados y heredados a la siguiente generación (Villalobos, 2008).

En suma la Ingeniería Genética permite la mejora de plantas y animales manipulando únicamente el gen o los genes específicos, y dejando fuera a aquellos que a juicio del genetista no portan beneficio a las nuevas razas o variedades. Otra característica que la distingue es que no necesariamente se limita a los genes de la misma especie como en la mejora convencional, sino que hace uso de cualquier gen que existe en la naturaleza y que a criterio del científico mejorará a la especie en estudio. Consecuentemente, en muchos casos reduce los tiempos que tradicionalmente se requieren, empleando los métodos convencionales para liberar comercialmente una nueva variedad vegetal o una raza pura, tratándose de animales (Villalobos, 2008).

1.2.4. Cultivos transgénicos

Los adelantos biotecnológicos ocurridos en los últimos veinticinco años, en particular los que han resultado de la aplicación de la Biotecnología, la Ingeniería Genética y la Biología Molecular, permiten crear nuevas recombinaciones genéticas que no existían en la naturaleza y, en consecuencia, producir nuevos organismos, sean plantas, animales y microorganismos modificados genéticamente, conocidos más comúnmente como transgénicos (Villalobos, 2008).

Los transgénicos tienen características novedosas y han sido creados en forma intencional por los científicos, a través de la modificación genética de plantas, animales y microorganismos con el fin de conferirles atributos y habilidades que no tenían en condiciones naturales y con la intención de aportar un beneficio para la agricultura, la salud humana y la salud animal y el ambiente, empleando para ello el conocimiento científico que ofrecen la Biología Genética (Villalobos, 2008).

Gran parte de la inversión económica para financiar la investigación científica en la elaboración, evaluación y liberación de los transgénicos proviene del sector privado y, en



particular, de las empresas multinacionales líderes en la Biotecnología. Se estima que el gasto anual de las 10 empresas biotecnológicas más importantes del mundo es del orden de tres mil millones de dólares americanos. Específicamente, cinco empresas transnacionales se dedican a la producción de cultivos transgénicos: Novartis, Monsanto, Zeneca, Agroevo y Dupont. Estas empresas han desarrollado un mercado internacional muy importante y lucrativo a través de la venta de estos productos en todo el mundo, así como el cobro de regalías por el derecho de propiedad de los mismos (Villalobos, 2008).

Los fundamentos técnicos que han permitido el desarrollo de esta nueva revolución biológica comprenden dos grupos de herramientas tecnológicas que de alguna forma son independientes: el Cultivo de Tejidos Vegetales y la Ingeniería Genética (Villalobos, 2008).

Cultivo de tejidos vegetales

El Cultivo de Tejidos Vegetales consiste en un grupo de técnicas de laboratorio que aplicadas bajo condiciones asépticas (*in vitro*), y con los nutrientes adecuados y reguladores del crecimiento mezclados cuidadosamente en los medios de cultivo permiten que células, tejidos y órganos, puedan llegar a desarrollar una planta completa. Esta tecnología se basa en la totipotencia que tienen las células vegetales para diferenciar una planta completa, a diferencia de las células animales que no tienen esta capacidad regenerativa (en general, el cultivo de un tejido animal no regenera un individuo completo). De esta forma, el cultivo de tejidos permite producir plantas completas a partir de células previamente transformadas genéticamente y, bajo condiciones *in vitro*, obtener plantas transgénicas (Perera, 2002).

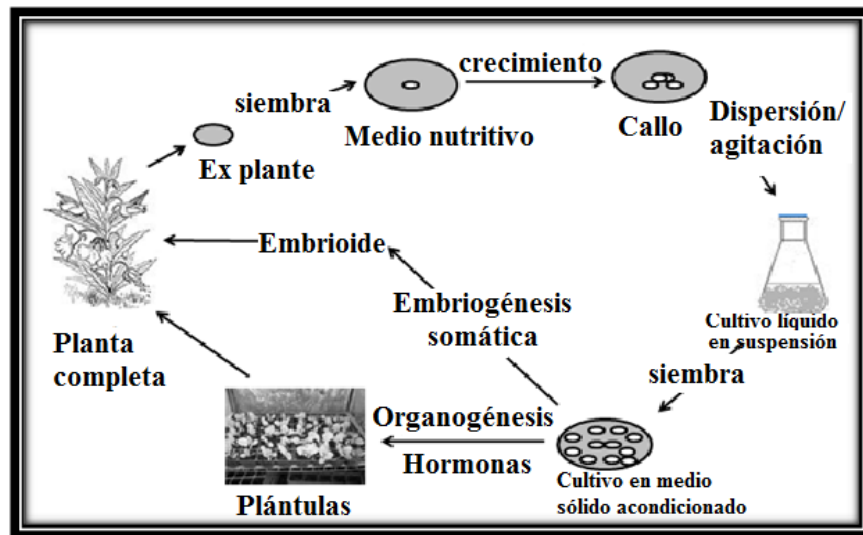


Figura 8. Tipos de manipulación y cultivos in vitro de sistemas vegetales (Perera, 2002).

En la Figura 8 se aprecian los pasos que se siguen para generar un organismo con características nuevas, además se observa que son diversos los métodos que se pueden ocupar para este fin, por lo que a continuación se explica brevemente lo que la Ingeniería Genética ha logrado hasta la actualidad.

- 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, 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, soya) forman callos poco compactos que se deshacen más fácilmente por agitación y que producen líneas celulares mucho más homogéneas (Perera, 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, 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, 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, 2002).

La Ingeniería Genética provee herramientas que permiten la inserción de un gen “extraño o ajeno” conocido como gen heterólogo, en el genoma de una célula huésped (sea vegetal, animal o de algún microorganismo), su expresión y la regeneración de un nuevo individuo (igual al que donó inicialmente la célula u tejido para su transformación), pero con la característica adicional que le confiere el gen insertado artificialmente. El individuo así transformado, o transgénico, es propiamente idéntico a su homólogo del cual se obtuvieron las células iniciales para su transformación (Villalobos, 2008).

En otras palabras, al comparar los dos individuos no es posible encontrar diferencias externas (fenotípicas) entre ellos. De haberlas, éstas se encontrarían a nivel molecular, mediante la realización de pruebas de laboratorio muy específicas (Villalobos, 2008).

Los cultivos transgénicos empleados en la agricultura son un producto más de la Biotecnología, pero tienen particular relevancia debido a sus implicaciones agrícolas, económicas, de salud y ambientales (Villalobos, 2008).

A continuación se mencionan algunos productos biotecnológicos y transgénicos que existen en el mercado y que son comercializados para diferentes fines, utilizándose tanto en países desarrollados como en desarrollo (Villalobos, 2008):



- Para la salud humana: la insulina para la diabetes; el interferón para el tratamiento del cáncer; la vacuna para hepatitis B; la reproducción de vacunas recombinantes y la terapia genética.
- Para el ambiente: el uso de microorganismos transgénicos para la degradación de plásticos y otros productos, incluyendo petróleo y metales pesados (bio-remediación), así como el uso de bacterias transgénicas para la descontaminación ambiental (fitoremediación) y la elaboración de plásticos biodegradables.
- Para cultivos agrícolas: los cultivos transgénicos tolerantes a insectos y a herbicidas; la clonación de individuos superiores; el mejoramiento genético asistido para acortarlos tiempos en la producción de nuevas variedades; paquetes de diagnóstico para enfermedades; la biosíntesis de ingredientes activos; la reducción de pérdidas en post-cosecha; la mejora en la calidad de los productos y la caracterización y conservación del germoplasma (variabilidad genética).
- Para producción animal: la caracterización del ganado por marcadores moleculares, la confirmación de paternidad, las hormonas de crecimiento, la manipulación de genes asociados a la calidad de la carne, el mejoramiento genético asistido, el transplante de embriones, la clonación de individuos superiores, el aumento de contenido de caseína de la leche y el desarrollo de vacunas recombinantes para Newcastle, Fiebre Porcina Clásica y Peste Bovina, la creación de animales transgénicos para la obtención de productos industriales, farmacéuticos u órganos para trasplantes.
- Para producción pesquera: la biotecnología aplicada al sector pesquero permite el incremento de las tasa de crecimiento de peces cultivados, mejorando su sistema de producción. La manipulación del juego de cromosomas para incrementar el tamaño, sabor, inducción de la esterilidad (para evitar cruzamientos entre peces transgénicos y no transgénicos); aplicación de hormonas de crecimiento en carpas, salmones, tilapias y otras especies; salmón transgénico con proteína anticongelante para ampliar su zona



de distribución (cabría destacar sin embargo, que a la fecha no existen peces transgénicos disponibles comercialmente) (Villalobos, 2008).

¿CÓMO SE CREAN LOS CULTIVOS TRANSGÉNICOS?

En general, la clave para introducir con éxito el material genético funcional en el genoma de la planta que se desea transformar implica no sólo transferir el gen responsable de la expresión del carácter de interés (que resultará en la síntesis de una proteína), sino también, la secuencia que promueva la expresión de dicho gen. En principio, lo que se hace comúnmente es primero aislar el gen de interés, que gobierna un evento o característica particular, como pudiera ser, por ejemplo, la resistencia a insectos, color del grano, etc. En segundo lugar se identifican las secuencias o regiones de genes que acompañarán al gen en cuestión, y que le ayudará en su expresión en el individuo huésped en el momento y lugar adecuados; estos elementos regulatorios se llaman promotores (Villalobos, 2008).

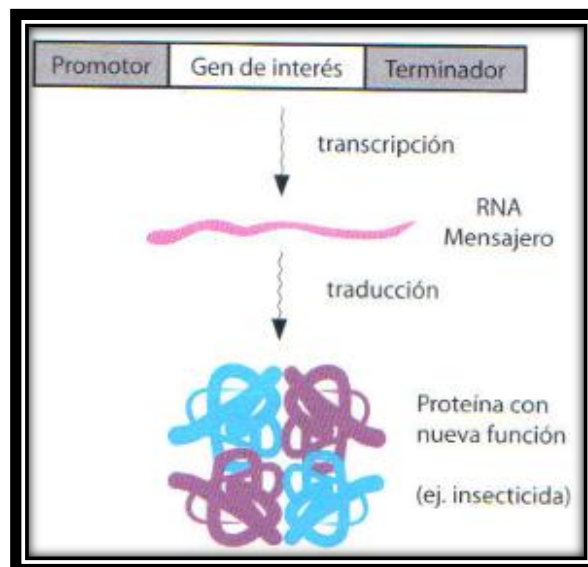


Figura 9. . Representación esquemática de un gen exógeno para la transformación genética de plantas (Villalobos, 2008).



Esta secuencia que suma a los promotores, más el gen que hará la transformación, se deberá multiplicar en millones de copias, lo que se hace al introducir la construcción referida a bacterias que posteriormente se cultivan y se multiplican rápidamente en grandes cantidades, conteniendo la construcción que habrá de emplearse para la transformación genética del organismo de interés. En otras palabras, las bacterias se usan como vehículo para clonar las construcciones. Las construcciones clonadas se recolectan y preparan para obtener una secuencia lineal de ADN (ácido desoxirribonucleico) y, así, estar listo para ser introducido en las células de la planta que se desea transformar (Villalobos, 2008).

Los conocimientos actuales sobre la Biología Molecular permiten seleccionar algunos controles para regular el funcionamiento del gen que se insertará en la planta. En algunos casos se requiere que éste se exprese de manera permanente o que su expresión esté condicionada a la presencia de la luz, de la oscuridad o de un compuesto químico en particular. Igualmente, se puede requerir que sólo se exprese en un tejido específico, como hojas, frutos, flor, raíz, debiéndose usar el promotor adecuado para cada una de estas situaciones (Villalobos, 2008).

Adicionalmente, dentro de la construcción se debe incluir un terminador que marque el final del gen; esto es muy importante para que la maquinaria de lectura e interpretación de la célula reconozca dónde termina cada gen y no se lean los subsiguientes (Villalobos, 2008).

Las técnicas más comunes que permiten la creación de las plantas transgénicas se explican a continuación:

Transformación genética con *Agrobacterium tumefaciens*

Esta técnica es muy eficiente y se considera el primer método a emplear cuando no se tienen antecedentes de transformación de una planta. *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria del suelo muy común e infecta las plantas en forma natural por medio de un mecanismo que es, de hecho una forma natural de Ingeniería Genética. El proceso por medio del cual la bacteria ataca a las plantas consiste en la inserción natural de un segmento de ADN de la propia bacteria (que se conoce como T-ADN) al genoma de la célula huésped. Este segmento de



ADN que viaja de la bacteria a la célula huésped es parte de un plásmido de la bacteria responsable de ocasionar un tumor en la planta cuando ésta tiene heridas y recibe el nombre de plásmido Ti (del inglés Tumor inducer) (Villalobos, 2008).

Lo interesante de este mecanismo de infección es que el segmento insertado es capaz de integrarse al genoma de la planta infectada y, una vez incorporado, puede procesarse en la célula huésped, promoviendo la división celular sin control y originar el tumor (Figura 10) (Villalobos, 2008).



Figura 10. Tumores causados por *Agrobacterium Tumefaciens* en plantas (Villalobos, 2008).

Una vez que los científicos entendieron este mecanismo de infección natural por intermediación de *Agrobacterium*, lo han utilizado como un vehículo eficiente para transformar plantas, respetando las señales que indican dónde se inicia y donde termina el segmento de ADN que se transfiere a la planta (bordes del T-DNA), pero removiéndole los factores (genes) responsables de la formación del tumor y sustituyéndolo por nuevas construcciones con pequeños segmentos de ADN que contienen genes de interés agrícola (Villalobos, 2008).

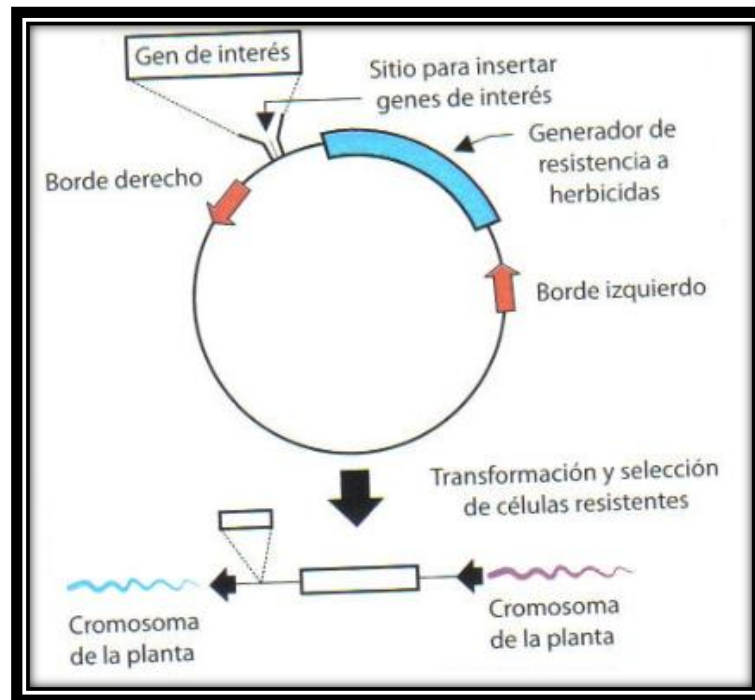


Figura 11. Representación esquemática de los prototipos de vectores que son usados para la transformación genética de plantas usando el sistema de *Agrobacterium tumefaciens* (Villalobos, 2008).

En la Figura 11 se representa un evento de transformación en el cual el T-ADN está unido a un cromosoma de la planta. Las flechas indican los extremos del ADN que será transferido a la planta. El vector contiene sitios de corte donde se puede insertar el gen de interés y un gen marcador que permite seleccionar las células transformadas.

A través de este proceso ha sido posible crear plantas transgénicas resistentes a insectos, al insertar un gen proveniente de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt), el cual codifica para una proteína insecticida que controla algunos tipos de insectos dañinos para los cultivos y respeta la vida de otros benéficos como la mariposa Monarca, las abejas y otros polinizadores (Villalobos, 2008).

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, 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, 2002). A continuación se resumen los pasos más importantes de estos métodos.

- **Transformación de protoplastos:** La eliminación de la pared celular 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 cinco 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, 2002).
- **Transformación de discos de hojas:** esta técnica es una buena alternativa a la regeneración de plantas a partir de protoplastos. Cuando, a partir de una hoja, se recortan pequeños discos (de algunos milímetros de diámetro), las células de su borde tienen una gran capacidad regenerativa (además de ser fácilmente transfectadas por el sistema más eficaz de transformación en plantas, el de *Agrobacterium tumefaciens*). Tras un periodo de dos a cuatro 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 cuatro a siete semanas, lo que es mucho más rápido que la regeneración a partir de un cultivo de protoplastos (Perera, 2002).

Se realizan mediante la acción física de introducir la construcción en la célula huésped, pudiéndose hacer diferentes maneras, que se describen a continuación:



Microinyección

Consiste en inyectar la construcción genética dentro del núcleo de la célula receptora o de un protoplasto, por medio de una aguja microscópica de vidrio (Figura 12) (Villalobos, 2008).

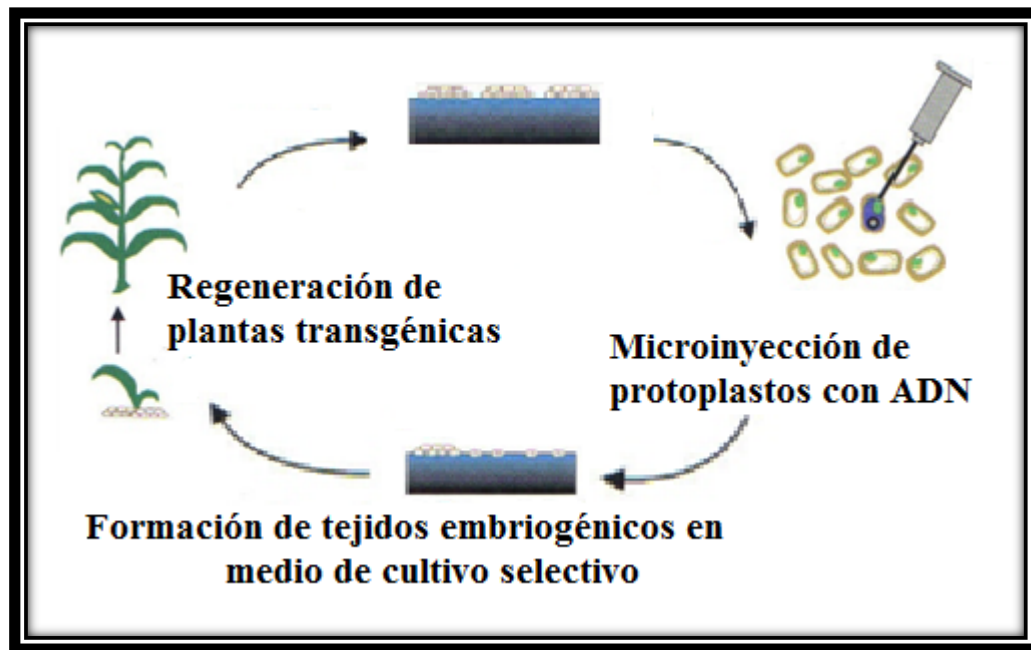


Figura 12. Transformación genética por microinyección (Villalobos, 2008).

Electroporación

Consiste en aplicar pulsos de electricidad que ocasionan cierta permeabilidad temporal en la membrana de las células huéspedes y de su núcleo, lo que permite la entrada de la suspensión que contienen miles de copias de la construcción que se pretende introducir. Durante este proceso las células a transformar están suspendidas en dicha solución (Figura 13) (Villalobos, 2008).

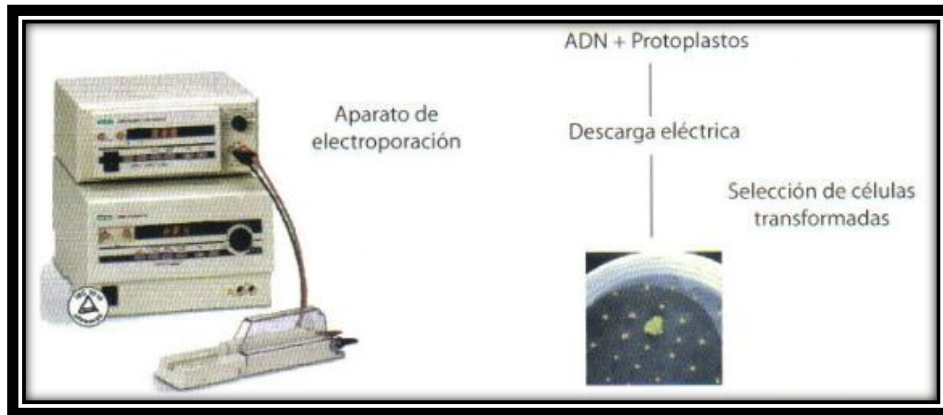


Figura 13. Transformación genética por electroporación (Villalobos, 2008).

Biobalística

Es un método muy común y consiste en preparar microproyectiles (generalmente de oro o tungsteno), que se impregnan en la solución que contiene la construcción genética y se bombardean las células dentro de una cámara de vacío conocida como cañón o acelerador de partículas. Los microproyectiles que contienen en la superficie la construcción, penetran las células suspendidas en un medio de cultivo; el ADN entra en solución y se promueve la inserción del material genético a los cromosomas de la célula en forma aleatoria (Figura 14) (Villalobos, 2008).

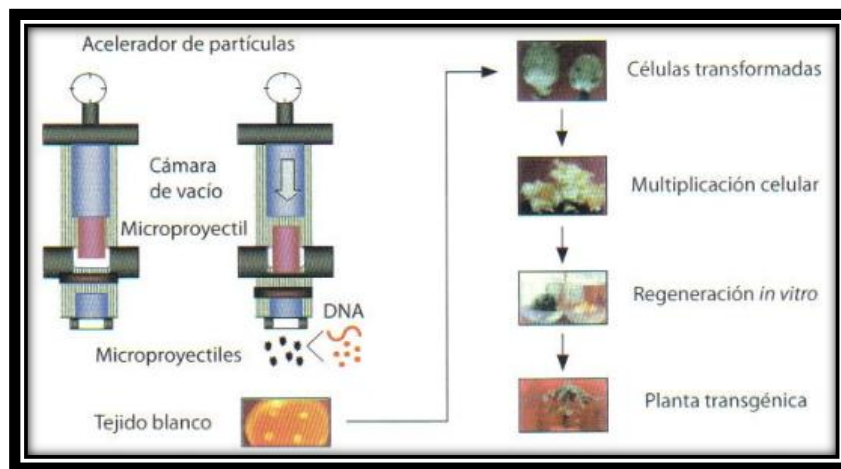


Figura 14. Transformación genética por biobalística (Villalobos, 2008).



Como resultado de la aplicación de cualquiera de los métodos de transformación descritos, se tendrá una línea de células transformadas (que han incorporado exitosamente la construcción), que deberán ser clonadas *in vitro* y posteriormente diferenciadas en plantas completas, empleando las técnicas de cultivo de tejidos (Villalobos, 2008).

Las plantas obtenidas a partir de estas células transformadas también contendrán una secuencia adicional de ADN en su genoma, lo que caracteriza a las plantas transgénicas. Con este principio, si la célula en cuestión es transgénica, las plantas diferenciadas a partir de ella también lo serán y heredarán este carácter las siguientes generaciones, como si este “nuevo gen” hubiera estado en la planta durante todo su proceso evolutivo (Villalobos, 2008).

El trabajo de transformación genética exitosa no termina con la incorporación de un gen exógeno en la célula transformada y se diferencie una planta adulta a partir de ella, esto es, que llegue a su reproducción sexual y que este carácter se herede a la siguiente generación (Villalobos, 2008).

Toda esta ingeniería no podría concluir sin la evaluación de las plantas transformadas a nivel de campo, en donde se analiza su comportamiento y se seleccionan, bajo estrictos criterios agronómicos, diferentes parámetros como pueden ser el grado y sitio correcto de expresión del gen. Además es necesario evaluar las características agronómicas de las plantas que se han obtenido con el fin de evitar que por la introducción aleatoria de la construcción se hayan interrumpido secuencias de genes de importancia para la estabilidad y competitividad de la planta transformada. Esta parte de la investigación se hace en el campo agrícola experimental, por medio de la selección, y bajo escrupulosos parámetros comparativos entre las plantas transformadas, con sus hermanas no transformadas y bajo pruebas de resistencia al factor para el cual se transformaron, como, por ejemplo, exponer experimentalmente las plantas a los insectos que se pretende controlar y estudiar su grado de tolerancia o resistencia a este ataque. Superadas estas pruebas y habiendo sido identificados los individuos con las características agronómicas programadas, se procederá a la multiplicación de las plantas seleccionadas por medio de semillas (reproducción sexual), manteniéndose la evaluación durante varios ciclos de cultivo hasta asegurar que los criterios agronómicos seleccionados, son heredados en forma



sexual a las generaciones subsiguientes. Las plantas transformadas y evaluadas agronómicamente pasan por otra serie de análisis igualmente esmerados que tienen que ver con su inocuidad, en función del destino final del producto de la transformación, sea para alimentación humana, animal o para la industria. Paralelamente se hacen los análisis de riesgo correspondientes para evaluar su impacto ambiental, con lo que se ha logrado obtener, por ejemplo, plantas resistentes a insectos (Villalobos, 2008).

Esta resistencia se basa en la expresión de la proteína de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt), que tiene propiedades insecticidas, ya que puede atacar a diferentes tipos de insectos. De hecho, esta bacteria se ha usado en forma convencional por muchos años como un mecanismo natural para el control de insectos específicos. La Ingeniería Genética ha permitido insertar eficientemente en el genoma de algunas especies agrícolas el gen que codifica para la síntesis de este insecticida, de modo tal que las plantas transformadas contienen, en forma endógena, su propio mecanismo para controlar determinado tipo de insectos que le son dañinos, sin afectar negativamente el ambiente, ni eliminar a los insectos benéficos. En otras palabras, las plantas transgénicas producen su propio bioinsecticida, el cual, por su origen, es orgánico y compatible con las técnicas de control biológico más modernas (Villalobos, 2008).

Concluidas todas las etapas referidas, las nuevas variedades son registradas y, si es el caso, se patenta la tecnología que permitió tal avance científico tecnológico (Villalobos, 2008).

1.2.5. La ingeniería genética molecular en la mejora de plantas

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". 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 (electro-transferencia) (Sector Agroalimentario, 2003). A continuación se explica en qué consiste cada una de estas técnicas:



- Southern Blot: el nombre de la técnica deriva en parte del apellido del investigador que la desarrolló (Edward M. Southern) y de la palabra inglesa Blot, que significa traspasar. El Southern Blot es una técnica que permite la identificación (presencia o ausencia) de secuencias específicas de DNA de diferentes fuentes e identificar el tamaño del fragmento de restricción que contiene la secuencia (Sector Agroalimentario, 2003).
- Northern Blot: es una técnica de laboratorio que se utiliza para identificar y localizar las secuencias de RNAm que son complementarias a un fragmento de DNA o RNA llamado sonda. Es básicamente una prueba para detectar la presencia del RNA mensajero en un tejido en particular y la cual permite también determinar el tamaño de la transcripción de ese RNA mensajero. El procedimiento se hace transfiriendo todo el RNA mensajero de un tipo determinado de tejido desde un gel a una membrana de nylon o nitrocelulosa. La presencia de un ARN en particular se detecta hibridizando esta membrana con una sonda de ácido nucleico, generalmente de cDNA o rRNA del gen de interés (Sector Agroalimentario, 2003).
- Western Blot: Es una técnica inmuno-enzimática que se utiliza para la detección de proteínas. Se basa en la separación de las proteínas de una muestra en función del tamaño mediante una electroforesis en condiciones desnaturalizantes y una detección posterior con anticuerpos específicos contra la proteína que se desea detectar, permite determinar el contenido relativo de proteínas presente en diferentes muestras (Sector Agroalimentario, 2003).
- Dot Blot: Es similar al Northern con la diferencia de que el RNA no es sometido a electroforesis sino que se sitúa directamente sobre la membrana. Este tipo de análisis requiere de un molde asociado a succión con vacío para colocar el RNA que puede producir círculos o puntos. Esta prueba es muy útil para estudiar un gran número de muestras, pero tienen la limitante de no ofrecer información sobre el tamaño de las bandas del RNA hibridado (Sector Agroalimentario, 2003).



1.2.6. Las secuencias 35S y T-NOS en eventos transgénicos

La detección cualitativa de los eventos transgénicos está basada en la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando primers que reorganicen regulatoriamente la región que se deriva de los promotores del Virus del Mosaico de Coliflor (CaMV) y del terminador de la Nopalina Sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens* (T-NOS), ambos elementos son secuencias de DNA natural en hortalizas y microorganismos (Vijayakumar, 2009; Khachatourians; 2002; Cankar, 2008).

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, 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, 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 deben probablemente a diferencias en la calidad y/o la cantidad de factores de regulación (Patent, 2010).

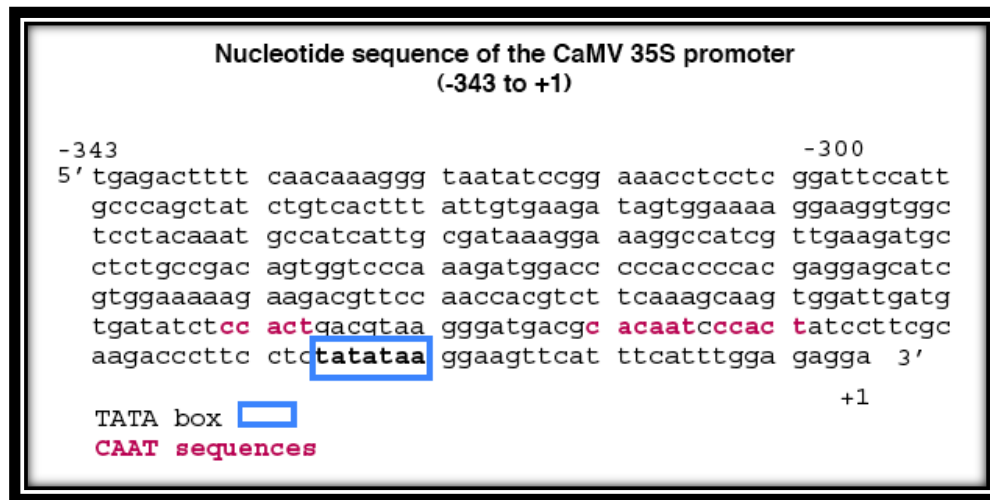


Figura 15. Secuencia de nucleótidos del promotor CaMv 35S (Patent, 2010).

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; Cankar, 2008).

1.2.7. Aspectos ecológicos

La agricultura de OGM es una categoría extensa y posee un rango amplio de aplicación por tal motivo se incluye una seguridad tanto ecológica como comestible. Ecológicamente se refiere al impacto de la agricultura de OGM en el ambiente, especialmente el impacto de la diversidad biológica, en cuanto a una seguridad comestible envuelve la influencia de OGM que no afecten la salud del ser humano (Deng, 2008; Margarit, 2006).

La ingeniería genética ha producido plantas de cultivo resistentes a las plagas, desde un cierto punto de vista el medio ambiente es el que sale ganando, porque se disminuye el uso de pesticidas; pero lo más paradójico es que las organizaciones que se han dedicado a proteger el medio ambiente han sido las que se han opuesto de forma más ruidosa a la introducción de estas plantas, a las que se denomina genéticamente modificadas. Como en el caso de la ingeniería genética en animales, la dificultad del primer paso en biotecnología vegetal consiste



en lograr introducir el fragmento deseado de ADN (el gen útil) en la célula vegetal y, después, en el genoma de la planta (Watson, 2003). Tal como los biólogos moleculares descubren con frecuencia, la naturaleza inventó un mecanismo para realizar esta tarea siglos antes de que los biólogos pensarán siquiera en ello (Gutiérrez Rosati, 2008).

1.2.7.1. Beneficios y riesgos de plantas transgénicas

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: evaluación, manejo y 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 (Ortíz, 2002; Ortega, 2010).

Algunos de los factores que van a influir en los niveles de riesgo se relacionan con la modificación genética y cómo se llevó ésta a cabo, con el organismo modificado y con el ambiente en donde se pretende liberar. Por lo anterior el análisis de riesgo debe hacerse “caso por caso” y “paso por paso”, considerando en todo momento el trinomio “modificación genética, organismo receptor y medio ambiente de liberación” (Ortíz, 2002; García, 2008).

La evaluación del riesgo considera sistemáticamente las siguientes cuestiones: ¿cuáles son los daños o efectos adversos que pueden ocurrir?, ¿cuál es la probabilidad de que los daños o efectos adversos ocurran? – con su grado de incertidumbre asociado –, si los daños o efectos adversos ocurren ¿cuáles son las consecuencias? y, con base en la detección de los posibles daños y efectos adversos, su probabilidad de ocurrencia y sus consecuencias, ¿cuál es el riesgo total?. Es difícil poder identificar todos los daños o efectos adversos que pueden ocurrir, en parte porque nos enfrentamos aún a niveles de incertidumbre considerables (Engels, 2002).



Sin embargo, resulta un ejercicio ilustrativo identificar y medir algunos de los atributos que pueden estar asociados a posibles efectos adversos, en los diferentes niveles de complejidad biológica (Ortíz, 2002).

1.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN LA DETECCIÓN DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

1.3.1. Descripción

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), desarrollada en 1983, es un método enzimático *in vitro* que permite amplificar fragmentos de DNA mil millones de veces en unas pocas horas. Puede utilizarse con cantidades extremadamente pequeñas de DNA original, incluso con una sola molécula. La reacción en cadena de la polimerasa ha revolucionado la biología molecular y es en la actualidad una de las técnicas moleculares más utilizadas. Es un método simple, rápido, flexible, al que pueden aplicarse un gran número de variaciones que dependen del propósito al que se aplica (Pierce, 2011).

1.3.2. Fundamento

La base de la PCR es la replicación catalizada por una DNA polimerasa. En éste caso, la replicación tiene dos requisitos fundamentales: 1) un molde de DNA monocatenario a partir del cual puede copiarse una nueva cadena de DNA y 2) un cebador con un grupo 3'-OH al que puedan agregarse los nuevos nucleótidos (Pierce, 2011).

Debido a que una molécula de DNA consta de dos cadenas de nucleótidos, cada una de ellas puede servir como molde para producir una nueva molécula y la cantidad de DNA se duplica con cada replicación. Los cebadores utilizados en la PCR son fragmentos cortos de DNA, generalmente de 17 a 25 nucleótidos de longitud, que son complementarios a secuencias conocidas en el molde (Pierce, 2011).



Esta técnica de amplificación *in vitro* se fundamenta en la repetición cíclica de tres procesos importantes:

1. La desnaturalización de las dos cadenas de DNA a una temperatura elevada (cerca de 95°C) para producir moléculas de DNA monocatenarias.
2. La hibridación (*annealing*) de cebadores oligonucleicos (o *primers*) complementarios a las secuencias de los extremos del DNA a amplificar (para ello se disminuye la temperatura a valores normalmente comprendidos entre 40 y 65°C).
3. La reacción de elongación a partir de los cebadores usando una DNA polimerasa termoestable (para la *Taq* polimerasa la temperatura óptima es de 72°C) (Tagu, 2006).

Los productos de la elongación se desnaturalizan de nuevo por acción del calor y se repite el proceso, de manera que a cada ciclo el número de copias de DNA se dobla, obteniéndose 2^n moléculas después de n ciclos (Tagu, 2006).

1.3.3. Etapas de la PCR

Para llevar a cabo la PCR se comienza con una solución que incluye el DNA diana, la DNA polimerasa, los cuatro desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP: los sustratos para la DNA polimerasa), los cebadores, iones magnesio y otras sales necesarias para que se produzca la reacción. Una reacción en cadena de la polimerasa típica incluye tres pasos (Pierce, 2011).

En el paso 1, la solución con DNA se calienta a temperatura elevada (por lo general, entre 90 y 100°C) para romper los puentes de hidrógeno entre las dos cadenas de nucleótidos y producir así los moldes monocatenarios necesarios (Pierce, 2011).

En el paso 2, la solución de DNA se enfría con rapidez a una temperatura de entre 30 y 65°C, lo que permite a los cebadores adherirse a sus secuencias complementarias en las cadenas molde (Pierce, 2011).

En el paso 3, la polimerasa puede sintetizar cadenas nuevas de DNA. Al finalizar este ciclo, dos nuevas moléculas de DNA bicatenario se han producido por cada molécula original de DNA (Pierce, 2011).



Luego se repite el ciclo completo. Con cada ciclo, la cantidad de DNA se duplica. Una molécula de DNA aumenta a más de 1000 moléculas en 10 ciclos de PCR, a más de un millón de moléculas en 20 ciclos a más de mil millones de moléculas en 30 ciclos. Cada ciclo se completa en el término de unos pocos minutos; por lo tanto, en unas pocas horas se obtiene una amplificación grande del DNA. Una innovación importante que facilitó el uso de la PCR en el laboratorio fue el descubrimiento de una DNA polimerasa que es estable a las temperaturas elevadas utilizadas en el paso 1 de la reacción. La DNA polimerasa proviene de *E. coli*, utilizada en la PCR original, se desnatura a 90°C. Por esta razón, en cada ciclo debería agregarse enzima nueva a la mezcla de reacción. Este obstáculo se superó cuando se aisló la DNA polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus*, que vive en los manantiales de aguas calientes en el Yellowstone National Park. Esta enzima, apodada Taq Polimerasa, tiene una notable estabilidad a temperaturas elevadas y no se desnatura durante el paso de separación de las cadenas en la PCR; por esto puede agregarse a la mezcla al principio del proceso y continua activa durante muchos ciclos (Pierce, 2011).

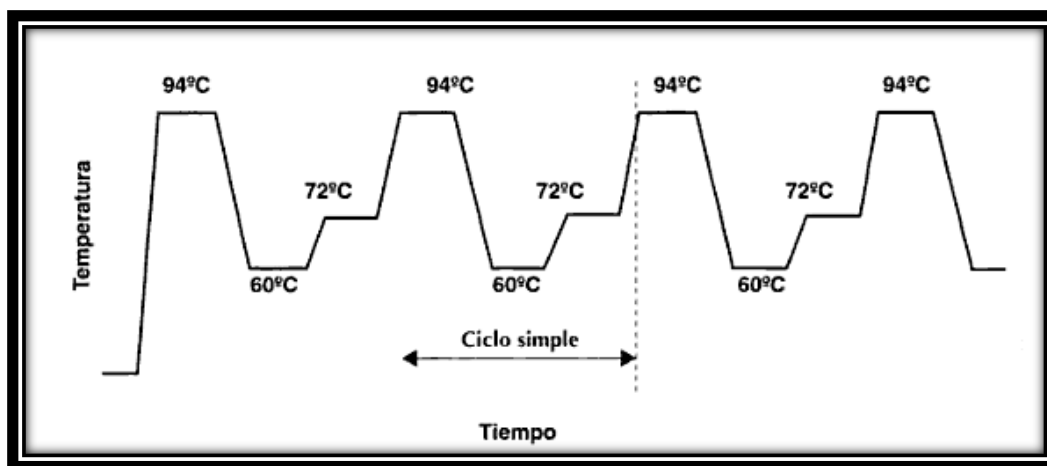


Figura 16. Etapas de temperatura que se realizan en cada ciclo de la PCR convencional

Todo el ciclo de la reacción comprende tres etapas principales. Éstas son:

1. **Desnaturalización** del DNA para separar la doble cadena y obtener cadenas o hebras sencillas, esto se obtiene a 94°C.



Un comportamiento característico observado en las disoluciones de DNA, cuando son calentadas a partir de 80° o sometidos a pH ácido o alcalino, es una repentina pérdida de viscosidad, acompañada de un aumento de la absorbancia a 260 nm; éste fenómeno se denomina desnaturalización o fusión por que tiene lugar bruscamente, a partir de una temperatura determinada. Se produce a causa de la ruptura de los enlaces de hidrógeno que mantiene apareadas a las bases nitrogenadas y de la alteración de las interacciones hidrofóbicas entre ellas, lo que conduce a una separación total o parcial, de los filamentos de DNA, obteniéndose hebras separadas en toda su extensión (desnaturalización total) o en parte (desnaturalización parcial), sin que se vea alterado el esqueleto covalente formado por los enlaces entre el ácido fosfórico y la desoxirribosa (Terjón, 2005).

No todas las moléculas de DNA experimentan el fenómeno de la desnaturalización de igual manera, ya que depende de la composición de las bases. Las cadenas con una alta proporción de pares G-C (guanina-citosina) muestran una temperatura de fusión más elevada que las poseen proporciones inferiores. La temperatura de fusión del DNA, en la mayoría de las especies, varía entre 70°-100°C, cuando la proporción de G-C sobre el total de nucleótidos aumenta entre el 20%-80%. De ello se deduce que las regiones en la cadena de DNA, ricas en pares A-T (adenina-timina), son las primeras en desnaturalizarse (Terjón, 2005).

- 2. Hibridación, templado o anillamiento (annealing)** específico de cada hebra sencilla con un oligonucleótido predeterminado, generalmente se da a los 60°C (González, 2006). Cuando la desnaturalización se completa, la hibridación tiene lugar en dos fases, una primera muy lenta que forma al azar un fragmento corto en doble hélice y, posteriormente una segunda fase más rápida de apareamiento a partir del fragmento inicial, reproduciendo finalmente la doble cadena completa. El apareamiento de hebras complementarias responde a un proceso cooperativo en el que intervienen interacciones hidrofóbicas y establecimiento de puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas, siguiendo una ley de complementariedad, pero en ningún caso tiene carácter específico siendo independiente de la procedencia del DNA (Terjón, 2005).



3. Replicación, elongación, extensión o polimerización de la hebra sencilla por una DNA polimerasa a partir del oligonucleótido específico llamado cebador o primer, para *Taq* polimerasa se observa a los 72°C (González, 2006).

Llevando la disolución a una temperatura adecuada y en presencia de un gran exceso molar de los cuatro dNTPs, la polimerasa elonga el sustrato cebado. En los primeros ciclos se sintetizan largas moléculas, pero en repeticiones posteriores, la elongación empezará a encontrarse limitada por la longitud del molde que, a su vez, aparecerá fijada por el segundo cebador. A medida que se repite el ciclo, la mezcla de productos se enriquece progresivamente en la especie molecular que incorpora en sus extremos a ambos fragmentos cebadores (Perera, 2002).

1.3.4. Componentes para llevar a cabo la PCR

La reacción de PCR se prepara mezclando algunos componentes y añadiendo agua desionizada, hasta alcanzar el volumen deseado y la concentración requerida de cada componente. Existen kits comerciales que taren los componentes premezclados, lo que simplifica notablemente el proceso (González, 2006).

Para la realización práctica se precisan en la mezcla de la reacción los siguientes reactivos:

- Los cuatro dNTP's, como sustrato para la síntesis de copias del DNA, deben ir acompañados de Mg_2^+ (ClMg) para ser reconocidos por la polimerasa.
- Dos oligonucleótidos de cadena sencilla, generalmente sintéticos de 18 a 30 nucleótidos. Sus secuencias deben de ser complementarias, respectivamente, a los dos extremos 3' de la región diana, uno en cada hebra, de modo que los oligonucleótidos puedan actuar como cebadores para la replicación de las dos hebras en la región diana. Por ello, no se puede amplificar una región de DNA si no se conoce la secuencia de sus dos extremos. De hecho, es la posición donde hibridan los cebadores la que define la longitud del fragmento que se amplifica (secuencia diana). La composición de bases de los cebadores es importante por el efecto que tiene sobre la estabilidad del híbrido; lo



ideal es que tengan un 50% de GC. Si el porcentaje es inferior interesa que tenga una mayor longitud, para evitar una baja temperatura de fusión (Perera, 2002).

Deben evitarse secuencias con bases repetidas (más de tres o cuatro seguidas), para dificultar uniones no correctas. Hay que reducir la posibilidad de formación de estructuras bicatenarias no productivas, bien intramoleculares (cebadores con estructura secundaria) o intermoleculares (cebadores parcialmente complementarios entre sí). Los cebadores han de estar presentes en la reacción a una concentración adecuada. Su ausencia detiene el proceso de amplificación, pero en cantidad excesiva puede provocar su unión inespecífica y la amplificación de secuencias no deseadas (Perera, 2002).

- Una enzima DNA polimerasa termoestable, es decir, enzimáticamente activa a temperaturas relativamente altas. Esto permite que actúe en ciclos cortos sucesivos sin inactivarse; además, la replicación a temperaturas elevadas impide la formación de híbridos parcialmente dispares y contribuye a la especificidad y rendimiento del proceso. La enzima más utilizada es la *Taq DNA polimerasa*, que procede de la bacteria *Thermophilus aquaticus*. Tiene como inconveniente el carecer de actividad correctora de pruebas, por lo que la frecuencia de errores es superior a la de la replicación (tasa de 1 error por cada 500 mil nucleótidos incorporados); de ahí que en ciertas ocasiones es sustituida por otra enzima DNA polimerasa termoestable (González, 2006).

1.3.5. Evaluación de PCR por electroforesis

La acción de una enzima de restricción sobre una molécula de DNA genera lo que se conoce como fragmentos de restricción. Estos fragmentos pueden separarse en función de su tamaño en geles de agarosa o acrilamida. La mezcla de fragmentos resultante de la digestión se deposita en un extremo del gel y se somete a un campo eléctrico (Tagu, 2006).

Las moléculas de DNA (cargadas negativamente debido a los grupos fosfato presentes) migran en el campo eléctrico hacia el ánodo. Al pasar a través de la red de agarosa o acrilamida, se



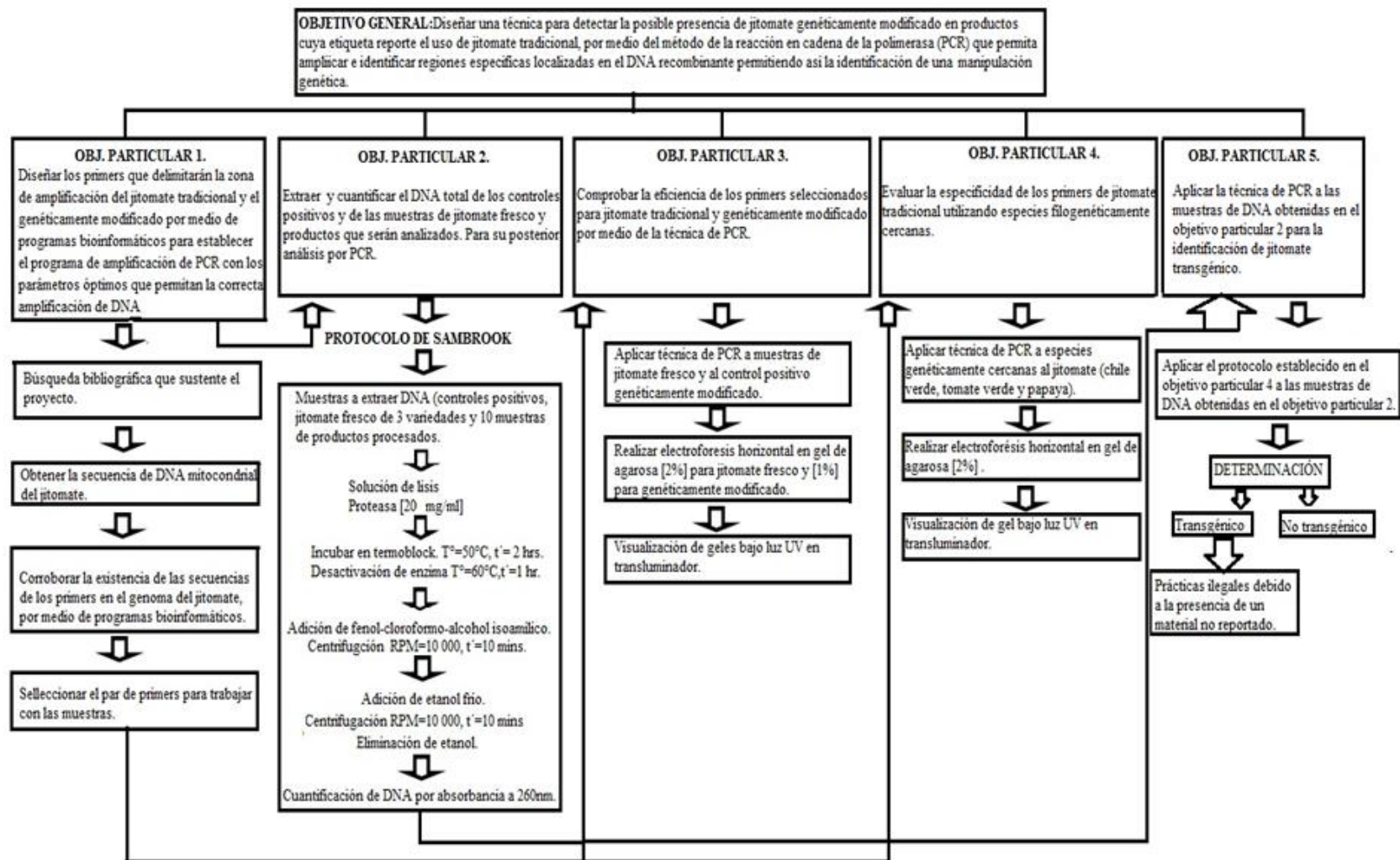
separan según su tamaño: las moléculas mayores se retienen más que las moléculas pequeñas y migran más lentamente en el gel. La acrilamida tiene una capacidad separadora superior, sin embargo, dada su toxicidad su uso es más delicado (Tagu, 2006).

Para visualizar los fragmentos de DNA después de la electroforesis, el gel se sumerge en una solución que contiene bromuro de etidio. Esta molécula se intercambia entre las bases de los ácidos nucleicos y emite fluorescencia roja-naranja cuando se excita con luz ultravioleta. Una vez teñido, el gel se analiza bajo una lámpara U.V. y las moléculas de DNA complejas al bromuro de etidio se vuelven visibles. Dado que las distancias de migración son proporcionales al logaritmo del número de bases, se puede determinar el tamaño de los fragmentos de restricción comparando su movilidad electroforética con la de fragmentos de DNA de tamaño conocido (marcadores de peso molecular). Existen también marcadores que permiten estimar la cantidad de DNA de cada fragmento de restricción (Tagu, 2006).

En algunos casos el DNA se marca, antes de la electroforesis, por incorporación de un isótopo radioactivo, lo que permite una fácil detección por autorradiografía: las partículas energéticas emitidas por el radio-isótopo impresionan una película fotográfica colocada sobre el gel. El revelado de la película es el de una película fotográfica normal y se obtienen señales (bandas) negras correspondientes a las moléculas radioactivas (Tagu, 2006).

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. Cuadro metodológico





2.1.1. Descripción del cuadro metodológico

OBJETIVO GENERAL

Diseñar una técnica para detectar la posible presencia de jitomate genéticamente modificado en productos cuya etiqueta reporte el uso de jitomate tradicional, por medio del método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permita amplificar e identificar regiones específicas localizadas en el DNA recombinante permitiendo así la identificación de una manipulación genética.

OBJETIVO PARTICULAR 1

Diseñar los primers que delimitarán la zona de amplificación del jitomate tradicional y el genéticamente modificado por medio de programas bioinformáticos para establecer el programa de amplificación de PCR con los parámetros óptimos que permitan la correcta replicación de DNA.

ACTIVIDAD 1. Obtener la secuencia de DNA mitocondrial del jitomate.

La secuencia de DNA mitocondrial se obtendrá en las bases de datos del Gen Bank.

ACTIVIDAD 2. Corroborar la existencia de las secuencias de los primers en el genoma del jitomate.

Se realizará una alineación de secuencias por medio del programa bioinformático BLAST.

ACTIVIDAD 3. Seleccionar el par de primers para analizar las muestras, con programas bioinformáticos por medio de los cuales se selecciona una región específica de la especie en estudio para el diseño de PRIMERS frontal y reverso que permitirán la amplificación de la



zona de interés. El programa que permite el diseño de PRIMERS proporciona las condiciones adecuadas para el programa de amplificación.

ACTIVIDAD 4. Calcular la T_m (temperatura media) de hibridación, debido a que el programa proporciona una T_m para cada primer frontal y reverso, y se necesita una sola para programar el termociclador. La fórmula para este cálculo se muestra a continuación:

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

Cuando la temperatura media calculada excede los 65°C es ampliamente recomendable utilizar temperaturas con 1-5°C por debajo de la calculada, tomando como límite máximo una temperatura de 65°C, ya que temperaturas superiores podrían causar otras hibridaciones en la prueba de PCR.

OBJETIVO PARTICULAR 2

Extraer y cuantificar el DNA total de los controles positivos y de las muestras de jitomate fresco y productos que serán analizados, para su posterior análisis por PCR.

La extracción se llevará a cabo por medio del método fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (protocolo propuesto por Sambrook) el cual se basa en la disolución del tejido de la muestra usando detergentes y proteinasa K, desnaturalización de proteínas y polisacáridos con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, seguido de la precipitación de DNA con etanol frío y su solubilización con agua libre de nucleasas, para posteriormente cuantificarlo por medio de un espectrofotómetro evaluando la absorbancia a 260nm.

ACTIVIDAD 1. Extracción de DNA a las muestras por medio del protocolo propuesto por Sambrook.



Figura 17. Método de Sambrook para la extracción de DNA.

ACTIVIDAD 2. Cuantificar el DNA mediante un espectrofotómetro a una absorbancia de 260 nm. El equipo utilizado y su software de trabajo proporcionan con 2µl de muestra la absorbancia a 260/280nm y además calcula la concentración de DNA en ng/µl.

OBJETIVO PARTICULAR 3

Comprobar la eficiencia de los primers seleccionados para jitomate tradicional y genéticamente modificado por medio de la técnica de PCR.

ACTIVIDAD 1. Aplicar la técnica de PCR a las muestras de jitomate fresco y al control positivo genéticamente modificado. Se llevará a cabo en un termociclador, dicho equipo realiza los cambios de temperatura necesarios para que pueda llevarse a cabo la reacción. Los



primers para el genéticamente modificado no serán diseñados ya que se cuenta con ellos en el laboratorio.

ACTIVIDAD 2. Realizar electroforesis horizontal a 60V en gel de agarosa [2%] para jitomate tradicional y [1%] para genéticamente modificado.

ACTIVIDAD 3. Visualización de geles bajo luz UV en transluminador. Se esperan amplificadores de 384 pb para jitomate tradicional y para el genéticamente modificado de 195 pb para CaMv y 180 pb para T-NOS.

OBJETIVO PARTICULAR 4

Evaluar la especificidad de los primers de jitomate tradicional utilizando especies filogenéticamente cercanas.

ACTIVIDAD 1. Aplicar técnica de PCR a especies genéticamente cercanas al jitomate: chile verde, tomate verde y papaya.

ACTIVIDAD 2. Realizar electroforesis horizontal a 60V en gel de agarosa [2%].

ACTIVIDAD 3. Visualización del gel bajo luz UV en transluminador. Se espera un amplificado de 384 pb solamente en el carril del gel en donde esté situada la muestra con DNA de jitomate, es importante que el único amplificado que se obtenga sea el de jitomate, de no ser así los primers no son específicos para esta especie y tendrán que ser diseñados nuevamente.

OBJETIVO PARTICULAR 5

Aplicar la técnica de PCR a las muestras de DNA obtenidas en el Objetivo particular 2 para la identificación de jitomate transgénico.

ACTIVIDAD 1. Aplicar el protocolo establecido en el Objetivo particular 4 a las muestras obtenidas en el Objetivo particular 2.



Para jitomate fresco se realizara la PCR con los primers para amplificar el promotor CaMv y T-NOS, los amplificados que se esperan son 195 pb y 180 pb respectivamente.

Para las muestras de productos se realizarán dos PCR: La primera se realizará con los primers de jitomate para asegurar que el DNA extraído pertenece a esta especie, una vez confirmado lo anterior se llevará a cabo la segunda PCR con los primers de CaMv y T-NOS para identificar la presencia de alguna modificación genética mediante la amplificación de estas secuencias.

ACTIVIDAD 2. Una vez realizado lo anterior se podrá determinar cuáles de las muestras tanto de jitomate fresco como procesado han sido modificadas genéticamente. El factor para hacer está determinación será el amplificado de las secuencias CaMv y T-NOS. Es importante mencionar que la metodología planteada en este trabajo, es solo para identificar la presencia de organismos genéticamente modificados usando CAMV y T-NOS para la correcta expresión del gen o genes introducidos, sin embargo la metodología no identifica que gen o genes han sido insertados.

2.2. MATERIALES Y METODOS

2.2.1. Muestras requeridas

Para llevar a cabo lo planteado en el cuadro metodológico se requerirán de dos tipos de muestras la primera será material biológico en estado fresco: Se estudiarán 3 variedades diferentes (bola, cherry y saladet) obtenidas en 3 lugares diferentes (SAMS Club, COSTCO y Walmart) dando un total de 9 muestras; y la segunda 10 productos procesados que contengan el material en estudio (2 salsas tipo cátsup de diferente marca, salsa tipo barbecue, jugo clamato, 2 purés de jitomate de diferente marca, jitomate enlatado, sazónador de jitomate, jitomate machacado envasado, salsa orgánica de jitomate) procedentes de diversos centros de distribución. Está división es para llevar a cabo las actividades y estudios pertinentes de una manera más concreta y sencilla.



- Material biológico

Tabla 2. Muestras de jitomate fresco analizadas.

DESCRIPCIÓN	NOMBRE DE LA MUESTRA
Jitomate fresco de un mercado sobre ruedas. (control interno)	J₁
Jitomate fresco de un mercado sobre ruedas. (control interno)	J₂
Jitomate variedad “bola” comprado en COSTCO.	J₃
Jitomate variedad “bola” comprado en Sams Club.	J_{3,1}
Jitomate variedad “bola” comprado en Walmart.	J_{3,2}
Jitomate variedad “cherry” comprado en COSTCO.	J₄
Jitomate variedad “cherry” comprado en Sams Club.	J_{4,1}
Jitomate variedad “cherry” comprado en Walmart.	J_{4,2}
Jitomate variedad “saladet” comprado en COSTCO.	J₅
Jitomate variedad “saladet” comprado en Sams Club.	J_{5,1}
Jitomate variedad “saladet” comprado en Walmart.	J_{5,2}
Maíz genéticamente modificado (control interno)	MT
Chile verde (prueba de especificidad)	Ch
Papaya (prueba de especificidad)	P
Tomate verde (prueba de especificidad)	T



- Productos procesados

Tabla 3. Muestras de productos derivados de jitomate analizadas.

NOMBRE DE LA MUESTRA	DESCRIPCIÓN	MARCA	LOTE
M₁	Salsa de jitomate para pasta	Hunts	2123120003 HTA 1 12:12
M₂	Salsa de jitomate cátsup	Heinz	1L15 17:23
M₃	Jugo Clamato	Grupo peñañiel	#B5 120506 13:21
M₄	Salsa Barbecue	Hunts	21022215100T 02:58K2
M₅	Puré de jitomate	La costeña	L14PC08:11 OP
M₆	Salsa orgánica de jitomate	ClassicoOrganic	G01G18 2010 A8
M₇	Jitomate frito	Deliciosos CIDACOS	032803 12:5701
M₈	Caldo de jitomate	Knorr	2242A1 22:29
M₉	Jitomate entero pelado enlatado	Deliciosos CIDACOS	027003 19:2701
M₁₀	Jitomate pelado machacado	La costeña	L15TT 12:050P



2.2.2. Reactivos, material de laboratorio y equipos

REACTIVOS

- Agarosa
- Agua libre de nucleasas
- Blue orange
- Bromuro de Etidio
- Enzima proteinasa K a concentración de 20 mg/MI
- Etanol frío
- Marcador de peso molecular
- Master Mix
- Mezcla Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico, en proporción 12:24:1
- Primers
- Solución de lisis (Tris base 50Mm, p H =8, EDTA 0.1M, SDS 0.5%)
- Soluciones de DNA
- TAE 1X

MATERIAL DE LABORATORIO

- Espátula
- Gradilla
- Kit de micropipetasRainin de 0.5 – 1000 µl
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Mortero con pistilo
- Puntas para micropipetas esterilizadas
- Plumón de punto fino
- Sevitoallas
- Tubos eppendorff esterilizados
- Tubos para PCR esterilizados



EQUIPO

- Agitador VortexGenie K-55-G
 - Balanza analítica electrónica, Cole parmer PR410 Equipar
 - Cámara de electrophoresis
 - Fuente de poder, Bio-Rad PowerPac 200
 - Horno de microondas marca Panasonic
 - Microcentrífuga, Minispin plus eppendorf 14 000 rpm
 - Nanoespectrofotómetro, Accesolab Nano Drop ND-1000.
 - Termoblok, Thermomixer compact Eppendorf
 - Termociclador
 - 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).

2.2.3. Metodología

2.2.3.1. Extracción de DNA por el método de Sambrook

Para la extracción de DNA se empleó el protocolo clásico de Sambrook, J. Este protocolo se basa en la disolución del tejido de la muestra usando detergentes y proteinasa, desnaturalización de proteínas y polisacáridos con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, seguido de la precipitación de DNA con etanol frío (Sambrook, 2001). A continuación se describe el protocolo completo:

- Disgregación del tejido

Para ello se trituraron las muestras con la ayuda de un mortero, se pesaron 125mg de cada muestra triturada en un tubo eppendorff, se adicionaron 1250µl de solución de lisis y se



agitaron los tubos en vortex hasta que se visualizaron fragmentos más pequeños, se adicionaron 7µl de enzima Proteinasa K a cada tubo y se pusieron a incubar a 50°C en termoblock por dos horas, finalmente se elevó la temperatura a 60°C por una hora con la finalidad de desactivar la enzima.

Al salir las muestras del baño seco se tomó aproximadamente la mitad de cada tubo y se colocó en otro tubo eppendorff nuevo, por lo tanto se obtuvieron dos tubos con la misma muestra, con la única finalidad de tener una réplica de la extracción.

- Desnaturalización de proteínas y polisacáridos

Una vez divididas todas las muestras en dos tubos, se adiciono a cada tubo 2500µl de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico para desnaturalizar y desprender las proteínas y polisacáridos de la pared celular, para esto fue necesario agitar los tubos suavemente para que dicha mezcla pudiera interactuar de forma adecuada con los demás componentes. Enseguida se centrifugaron las muestras en la microcentrífuga a 10 000 rpm durante diez minutos a temperatura ambiente para obtener dos fases: una fase formada principalmente de lípidos y proteínas y una fase acuosa en la que el componente de interés fue el DNA. Se recuperaron las fases acuosas situadas en la parte superior de cada tubo y se trasladaron a tubos eppendorff esterilizados.

- Precipitación de DNA

Se adicionaron 1500µl de etanol frío a cada tubo que contenía la fase acuosa recuperada, se agitaron suavemente y se centrifugaron a 10 000 rpm durante diez minutos para precipitar el DNA por la diferencia de densidad con el etanol. Enseguida se decantó el etanol y se dejó secar el DNA en la incubadora a 37°C, y se pudo visualizar pegado en cada tubo en la parte posterior como una mancha blanca muy tenue. Finalmente se adiciono agua libre de nucleasas para re-suspender el DNA y se agito suavemente el tubo hasta diluir totalmente el DNA.



2.2.3.2. Cuantificación de la concentración de DNA por absorbancia

Este método es útil para preparaciones de ácidos nucleicos altamente puras, pues se detecta cualquier compuesto que absorbe la luz significativamente a 260nm, lo cual incluye, por ejemplo: DNA, RNA, EDTA y fenol. La relación de absorbancia 260/280nm se utiliza como prueba de contaminación de una preparación de DNA y RNA con proteína, puesto que los aminoácidos aromáticos absorben la luz a 280 nm. En este caso, sólo un nivel significativo de proteína en la preparación puede causar un cambio significativo en la relación de absorbancia de ambas longitudes de onda (Sambrook, 2001).

Para cuantificar la cantidad de DNA, las lecturas se toman a 260/280 nm. La lectura de 260 nm permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Una unidad de densidad óptica corresponde a aproximadamente 50 µg/mL de DNA de doble hebra. La relación entre las lecturas a 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, 2001). La cuantificación se llevó a cabo de la siguiente manera:

En primer lugar se encendió el espectrofotómetro Nanodrop y se colocaron 2µl de agua libre de nucleasas en el sensor para iniciar el equipo. Este equipo se encuentra conectado a una computadora, y el programa utilizado fue “Nanodrop” en la opción de ácidos nucleicos. Antes de realizar la medición a las muestras se colocaron nuevamente 2µl de agua libre de nucleasas en el sensor y se seleccionó la opción “blanco”, se dejó que el equipo realizará la lectura y todos los valores fueron cero, lo cual indicó que el equipo estaba listo para realizar la lectura de las muestras. Una vez realizado lo anterior se limpió el sensor equipo con una servitoalla y se colocaron 2µl de cada muestra para que el equipo realizara la medición. El equipo



proporcione diferentes valores, siendo los de interés la relación $260/280 = 1.8$ el valor ideal y la concentración de DNA expresada en $\text{ng}/\mu\text{l}$.

2.2.3.3. PCR

Es un método enzimático *in vitro* que consiste en amplificar determinadas secuencias del ADN por medio de pares de secuencias cortas que bordean el fragmento de ADN diana. La técnica de la PCR se basa en la estructura molecular y en el modo de síntesis del ADN (Ducauze, 2006).

La preparación de las muestras para la reacción se preparó de acuerdo con el protocolo que precisa Promega kit de PCR (Tabla 4).

Tabla 4. Componentes de la PCR, preparación de la reacción.

COMPONENTE	CANTIDAD (μl)
Master Mix	12.5
Primer F	0.5
Primer R	0.5
DNA	1-5
H ₂ O libre de nucleasas	La necesaria para completar 25 μl

La reacción se preparó en un solo tubo de acuerdo a lo especificado en la tabla 4, con todas las cantidades requeridas según el número de muestras analizadas (excepto el DNA), se mezcló con un pulso en la microcentrífuga y se repartió equitativamente entre el número de tubos para cada muestra. Enseguida se agregó a cada tubo su cantidad correspondiente de DNA o agua en el caso del blanco y se marcó cada tubo con un plumón de punto fino, se mezcló en la microcentrífuga y se llevó al termociclador.



PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR

Se programó según la temperatura media de los cebadores (“PRIMERS”) y la enzima del “Master Mix”, los tiempos y números de ciclos según la referencia bibliográfica base o los resultados obtenidos según la experimentación.

Los primers para identificar jitomate fueron diseñados por medio de un programa bioinformático, y en base a eso se diseñó el programa de amplificación de PCR, el tiempo de este programa fue de 2 horas y 30 minutos (Figura 18).

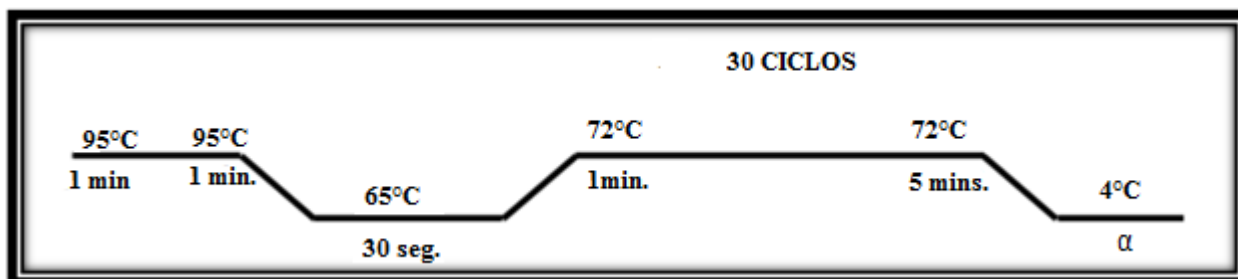


Figura 18. Programa de amplificación para jitomate fresco

Para las parejas de primers para detectar jitomate transgénico, se ocupó un programa de amplificación que ya había sido diseñado en trabajos anteriores (Figura 19), ambos se trabajaron con una temperatura media de 60°C debido a que en ambos casos se presenta una temperatura inferior y una superior por lo cual se adaptó a la temperatura óptima, este programa se llevó a cabo en un tiempo de 3 horas y 30 minutos, ya que se trabajó con 40 ciclos.

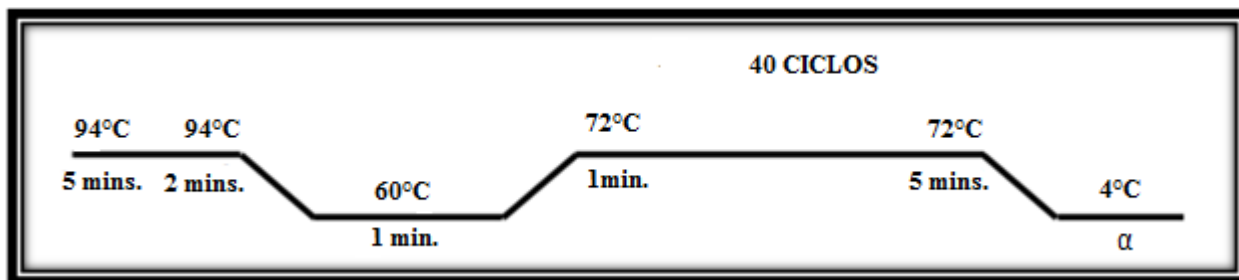


Figura 19. Programa de amplificación para jitomate transgénico

2.2.3.4. Electroforesis horizontal en gel de agarosa

Preparación del gel de agarosa

La concentración de los geles preparados fue de acuerdo al tamaño de amplificado de la muestra, a fragmentos grandes les corresponden concentraciones bajas y viceversa a fragmentos pequeños les corresponden altas concentraciones. Los geles utilizados fueron preparados de la siguiente manera:

Se pesó la cantidad de agarosa según la concentración del gel, se vertió en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se adiciono la cantidad necesaria de TAE 1X. Después se calentó en microondas hasta lograr una solución translúcida y sin grumos cuidando que la solución no llegará al punto de ebullición. Se dejó enfriar la solución y se agregó una gota de bromuro de etidio. Se colocó el peine en la caja para el gel y se vertió la solución cuidadosamente y sin formar burbujas, una vez llena la caja se dejó solidificar el gel. Finalmente se colocó el gel en la cámara de electroforesis y se cubrió con solución TAE 1X.

Carga y corrida del gel de agarosa por electroforesis horizontal

En un trozo de parafilm se colocó por número de muestras lo siguiente:

Colorante blue orange+ marcador de peso molecular (solo en el primer carril del gel +bromuro de etidio+ blanco o muestra de DNA

**Tabla 5. Cantidades para cargar el gel de electroforesis.**

COMPONENTE	CANTIDAD (μ l)
Blue orange	3
Bromuro de Etidio	3
Marcador de peso molecular (solo para el primer carril)	5
Muestra	5

El tiempo que se dejó correr cada gel, fue de acuerdo al tamaño de banda de los “PRIMERS” utilizados.

Se cargó cada gel poniendo 3 μ L de Bromuro de Etidio, 3 μ L de Blue orange y 5 μ L del marcador de peso molecular solo para el primer carril y 5 μ L de muestra en el resto de los pocillos.

El Bromuro de Etidio es un colorante fluorescente altamente tóxico esencial para la tinción de DNA en el gel. Esta molécula se intercala entre las bases apiladas del DNA creando una unión del tipo Vander Waals con las bases de la cadena. Después de la inserción dentro de la hélice, el colorante permanece perpendicular al eje helicoidal teniendo contacto con la base superior e inferior. La posición arreglada de la molécula y su proximidad a las bases causa que el colorante exhiba un campo fluorescente (Benitez, 2004).

El colorante Blue orange es el buffer de carga del gel, que se mezcla con las muestras antes de cargarlas. Tiene 3 propósitos: 1) Incrementar la densidad de la muestra, 2) Asegurar que el DNA descienda uniformemente dentro del pocillo y 3) Añadir color a la muestra, con lo que se simplifica el proceso de carga. Este compuesto contiene colorantes que migran hacia el ánodo en un campo eléctrico (Benitez, 2004).

1. Tapar y conectar los electrodos (- +)
2. Programar la fuente de poder a 60V y correr.



2.2.3.5. Visualización de los geles

Una vez transcurrido el tiempo de la electroforesis, se sacaron y escurrieron los geles con cuidado de no romperlos, enseguida se colocaron los geles cuidadosamente dentro del transluminador, se cerró la puerta y se encendió el equipo. Finalmente se enfocaron los geles y se tomaron las fotografías a cada gel.



Figura 20. Cámara fotográfica y transluminador



CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados por objetivo:

OBJETIVO PARTICULAR 1. Diseño de primers.

La pareja de primers seleccionada para amplificar el citocromo b del mtDNA (DNA mitocondrial) del jitomate se muestra en la figura 21. Los detalles de este diseño se muestran en el anexo 1.

Primer pair 44									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	T _m	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGCAGCCATCCGCATCTGGTT	Plus	22	274	295	59.41	54.55	4.00	0.00
Reverse primer	TGTCAGCTGTCCCACAAAGCAT	Minus	23	657	635	58.75	52.17	6.00	2.00
Product length	384								

Figura 21. Par de primers seleccionados para amplificar jitomate

La figura 21 muestra el par de primers seleccionados. De lado izquierdo se observan las secuencias de ambos primers frontal (F) y reverso (R), el porcentaje de guanina-citosina (G-C) es de 54.55% para el frontal y de 52.17 para el reverso. El producto amplificado tiene un tamaño de 384 pb. El cálculo de la temperatura media T_m para establecer el programa de PCR se muestra a continuación:

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



Para primer frontal (F):

Secuencia 5' a 3': TGCAGCCATCCGCATCTGGTTT

$$T_F = 4(12) + 2(10)$$

$$T_F = 68^\circ\text{C}$$

Para primer reverso (R):

Secuencia 5' a 3': TGTCAGCTGTCCCCACAAAGCAT

$$T_R = 4(12) + 2(11)$$

$$T_R = 70^\circ\text{C}$$

Para temperatura media:

$$T_m = \frac{T_F + T_R}{2} = \frac{68^\circ\text{C} + 70^\circ\text{C}}{2}$$

$$T_m = 69^\circ\text{C}$$

En este caso como la temperatura calculada es de 69°C para el programa de PCR se utilizará una temperatura 5°C por debajo es decir 65°C .

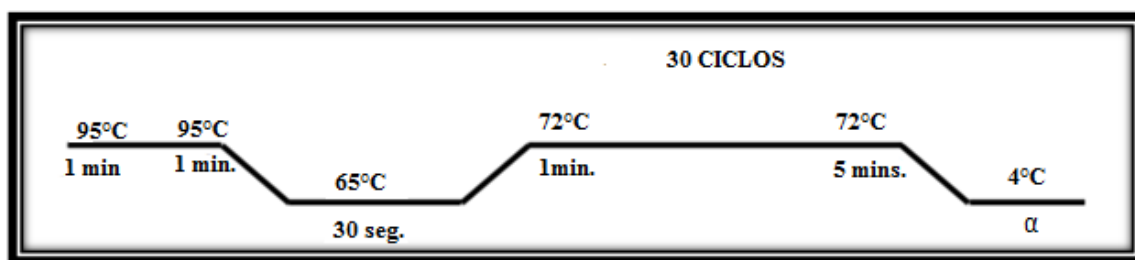


Figura 22. Programa de PCR establecido para jitomate

OBJETIVO PARTICULAR 2. Extracción y cuantificación de DNA.

Se realizó la extracción de DNA a las siguientes muestras:

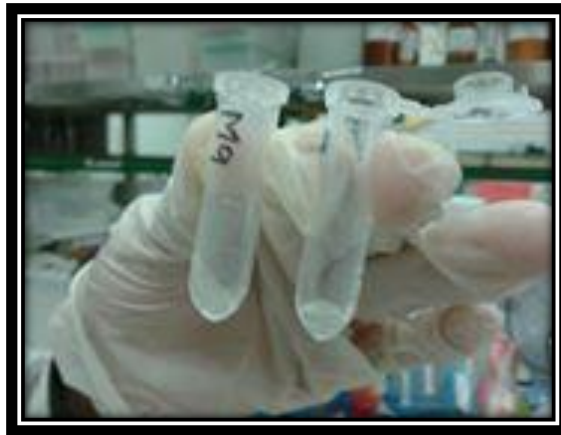


Figura 23. DNA extraído de productos derivados de jitomate

Después de la extracción de DNA de las muestras se cuantificó el DNA, para las muestras con concentraciones altas de DNA se realizaron diluciones con agua libre de nucleasas para ajustar la concentración a 60 ng/μl o a valores lo más cercano posible. Los resultados obtenidos fueron:

Tabla 6. Cuantificación de DNA en muestras de jitomate fresco.

NOMBRE DE LA MUESTRA	[ng/μl]	Relación 260/280	[ng/μl] dilución	Relación 260/280 dilución
J ₁	977.12	1.784	59.77	1.75
J ₂	1114.76	1.87	64.06	1.82
J ₃	3310.3	1.98	62.12	1.81
J _{3.1}	2180.9	1.89	61.05	1.81
J _{3.2}	3122.5	1.99	59.92	1.83
J ₄	2787.5	1.91	62.23	1.81



J_{4.1}	2126.3	1.85	61.79	1.82
J_{4.2}	2551.3	1.92	60.08	1.80
J₅	2111.4	1.85	58.95	1.84
J_{5.1}	2515.2	1.93	62.14	1.81
J_{5.2}	2799.2	1.95	64.72	1.85
MT	2169.0	2	60.8	1.87
Ch	2239.5	1.84	61.79	1.81
T	1158.1	1.86	58.05	1.83
P	2229.0	1.86	60.03	1.81

En la tabla 6 se presentan las concentraciones de DNA extraído a las diferentes variedades de jitomate, así como la relación 260/280nm, la cual indica la pureza del DNA; siendo el valor óptimo 1.8. Se obtuvieron concentraciones altas de DNA y valores para la relación 260/280 superiores a 1.8, esto indicó la presencia de una contaminación por RNA por lo que se ajustó la concentración realizando diluciones con agua libre de nucleasas.

Tabla 7. Cuantificación de DNA en muestras de productos derivados de jitomate.

NOMBRE DE LA MUESTRA	[ng/μl]	Relación 260/280nm	[ng/μl] dilución	Relación 260/280 dilución
M₁	1610.0	1.84	66.4	1.81
M₂	1653.0	1.92	58.4	1.84
M₃	1973.6	1.88	50.8	1.81
M₄	2085.5	1.85	62.2	1.82
M₅	2026.1	1.88	65.7	1.82
M₆	3028.9	1.92	61.2	1.84



M₇	2524.8	1.86	63.5	1.83
M₈	1441.8	2.51	63.1	1.79
M₉	3712.6	1.95	61.93	1.83
M₁₀	2808.0	1.86	59.96	1.82

En la tabla 7 se presentan las concentraciones de DNA extraído a los diferentes productos derivados de jitomate, así como la relación 260/280nm, la cual indica la pureza del DNA; siendo el valor óptimo 1.8. Se obtuvieron concentraciones altas de DNA y valores para la relación 260/280 superiores a 1.8, esto indica la presencia de una contaminación por RNA. Se ajustó la concentración para poder llevar a cabo la PCR a [60 ng/ml], realizando diluciones con agua libre de nucleasas; con estas diluciones también se logró llevar los valores de la relación 260/280 lo más cercanos posible al valor óptimo.

OBJETIVO PARTICULAR 3. Eficiencia de primers.

Para este objetivo se realizó la técnica de PCR a las muestras de DNA de jitomate fresco, para corroborar que los primers diseñados realmente amplificarán la región deseada. El diseño se realizó solamente para los primers de jitomate y fue la primera vez que se usaron, los primers para la identificación de OGM ya se encontraban en el laboratorio y habían sido probados satisfactoriamente en trabajos anteriores.

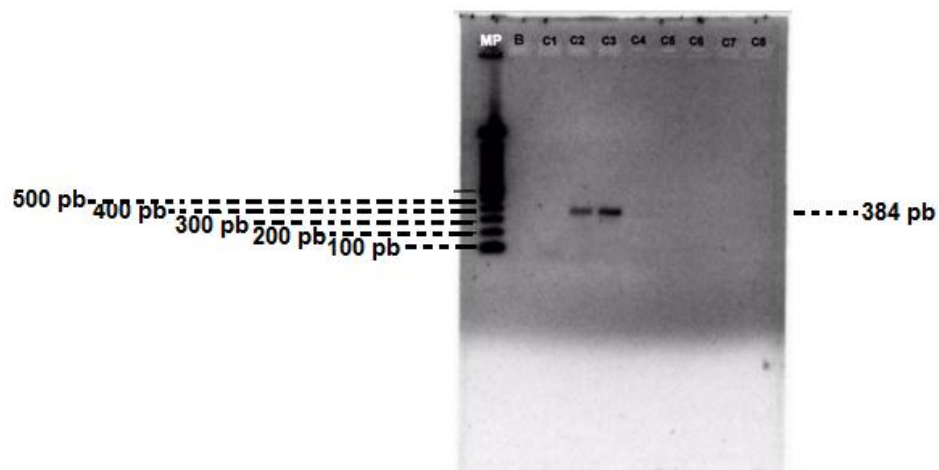


Figura 24. Amplificación de jitomate fresco visualizado en gel de agarosa al [1%].

Carriles de los pocillos: MP: Marcador de peso molecular, B: blanco, C2: Muestra de DNA J1 y C3: Muestra de DNA J2.

En la figura 24 se observa un amplificado con un peso molecular de 384 pb en los carriles de los pocillos C2 y C3 ambos contenían muestras con DNA de jitomate fresco, esto indica que los primers diseñados en el laboratorio fueron eficientes para amplificar esta especie. El carril del blanco se observa sin ningún amplificado, lo cual indica que no hubo ninguna contaminación durante la prueba.

OBJETIVO PARTICULAR 4. Especificidad de primers.

Para este objetivo se realizó la prueba de PCR a otras especies genéticamente cercanas al jitomate como chile verde, papaya y tomate verde, y posteriormente se realizó su análisis mediante una electroforesis horizontal a 60 V para probar la especificidad de los primers; y se obtuvo lo siguiente:

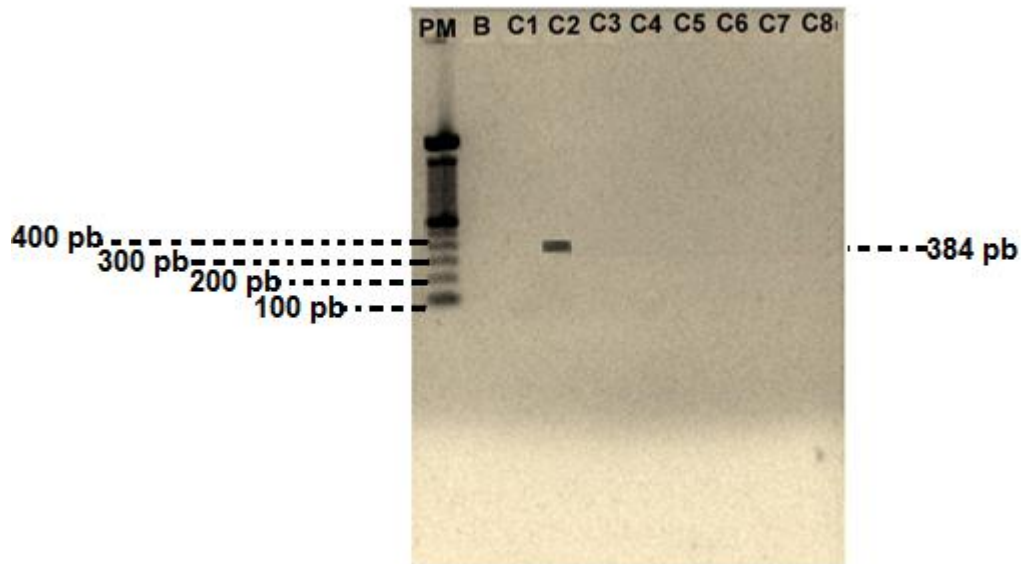


Figura 25. Especificidad de primers visualización en gel de agarosa al [1%].

Carriles de los pocillos: PM: Marcador de peso molecular, B: blanco, C2: Muestra de DNA de jitomate fresco, C3: Muestra de DNA de chile verde, C4: Muestra de DNA de papaya y C5: muestra de DNA de tomate verde.

En la figura 25 se muestra una sola banda amplificada perteneciente al pocillo del carril C2 que contenía DNA de jitomate fresco, con un peso molecular de 384 pb, las especies genéticamente más cercanas no amplificaron, esto significa que los primers diseñados funcionan específicamente para jitomate.

OBJETIVO PARTICULAR 5. Identificación de OGM.

En este objetivo se siguió la misma metodología que en los objetivos 3 y 4. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

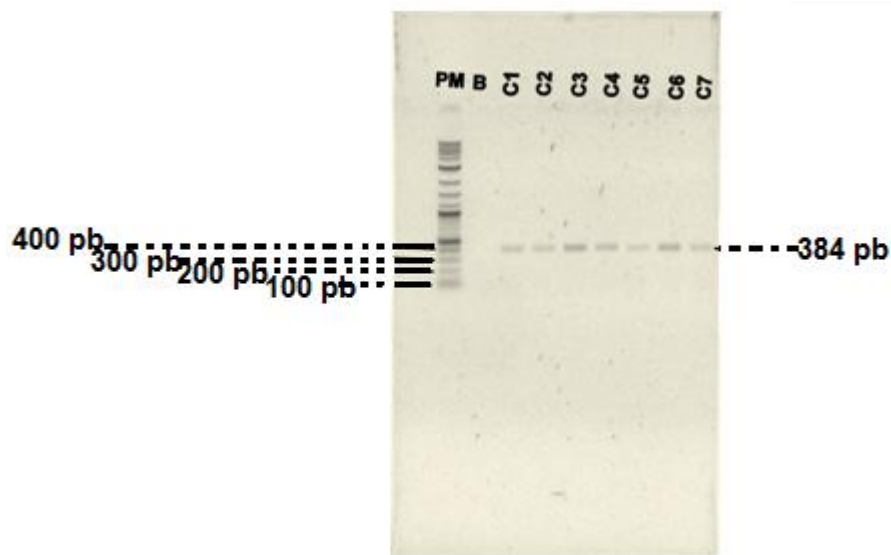


Figura 26.Amplificación de jitomate en productos, visualizado en gel de agarosa al [1%].

Carriles de los pocillos: PM: Marcador de peso molecular, B: blanco, C1: Control interno J₁, C2: Muestra de DNA de M₁, C3: Muestra de DNA de M₂, C4: Muestra de DNA de M₃, C5: Muestra de DNA de M₄, C6: Muestra de DNA de M₅ y C7: Muestra de DNA de M₆.

En la Figura 26 se observan siete bandas con amplificado, con un peso molecular de 384 pb. La primera de ellas correspondiente al carril C1 pertenece a un control interno con DNA de jitomate fresco, esto para garantizar la amplificación de jitomate. Los carriles C2, C3, C4, C5, C6 y C7 para las muestras M₁-salsa para pasta “Hunts”, M₂-Salsa cátsup “Heinz”, M₃-Clamato “Grupo peñafiel”, M₄-Salsa Barbecué “Hunts”, M₅-Puré de tomate “La costeña” y M₆-Salsa orgánica “Classico Organic”, respectivamente; amplificaron en el número de pares de bases esperado (384), lo que indica que el DNA extraído a cada producto pertenece a jitomate, con esto se procedió al análisis para la identificación de OGM.

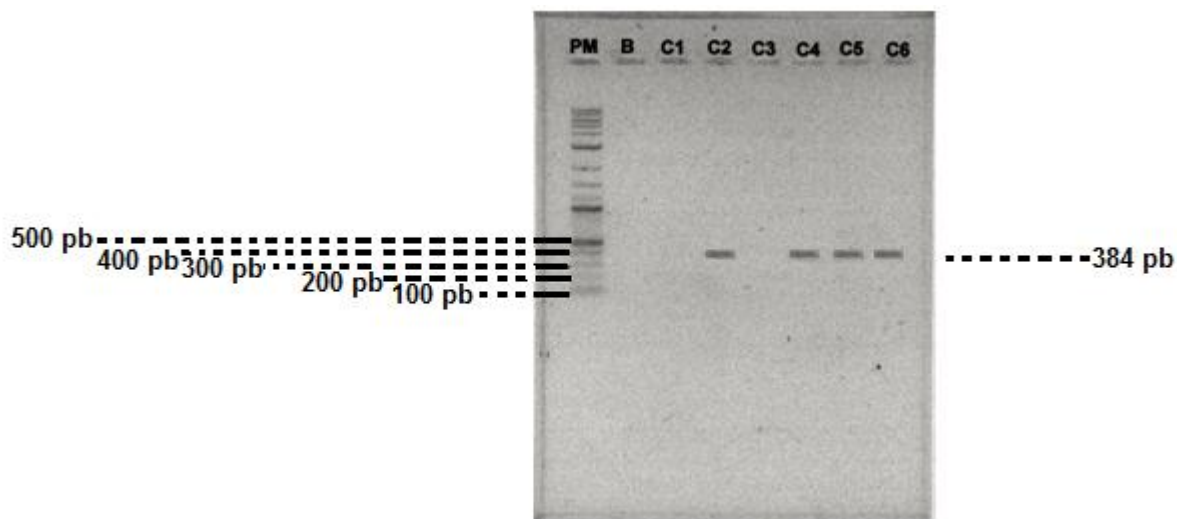


Figura 27. Amplificación de jitomate en productos, visualizado en gel de agarosa al [1%].

Carriles de los pocillos: PM: Marcador de peso molecular, B: blanco, C2: Muestra de DNA de M7, C3: Muestra de DNA de M8, C4: Muestra de DNA de M9, C5: Muestra de DNA de M10 y C6: Control interno J₂.

En la Figura 27 se observan cuatro bandas con un peso molecular de 384 pb. La última de ellas correspondiente al carril C6 pertenece a un control interno con DNA de jitomate fresco, esto para garantizar la amplificación de jitomate, los carriles C2, C3, C4, y C5 para las muestras M₇-Jitomate frito “Deliciosos CIDACOS”, M₈-Caldo de jitomate “Knorr”, M₉-Jitomate entero pelado enlatado “Deliciosos CIDACOS” y M₁₀-Jitomate pelado machacado “La costeña” de la PCR, respectivamente amplificaron en el número de pares de bases esperado (384), lo que indica que el DNA extraído a cada producto pertenece a jitomate, con esto se puede proceder el análisis para la identificación de OGM.

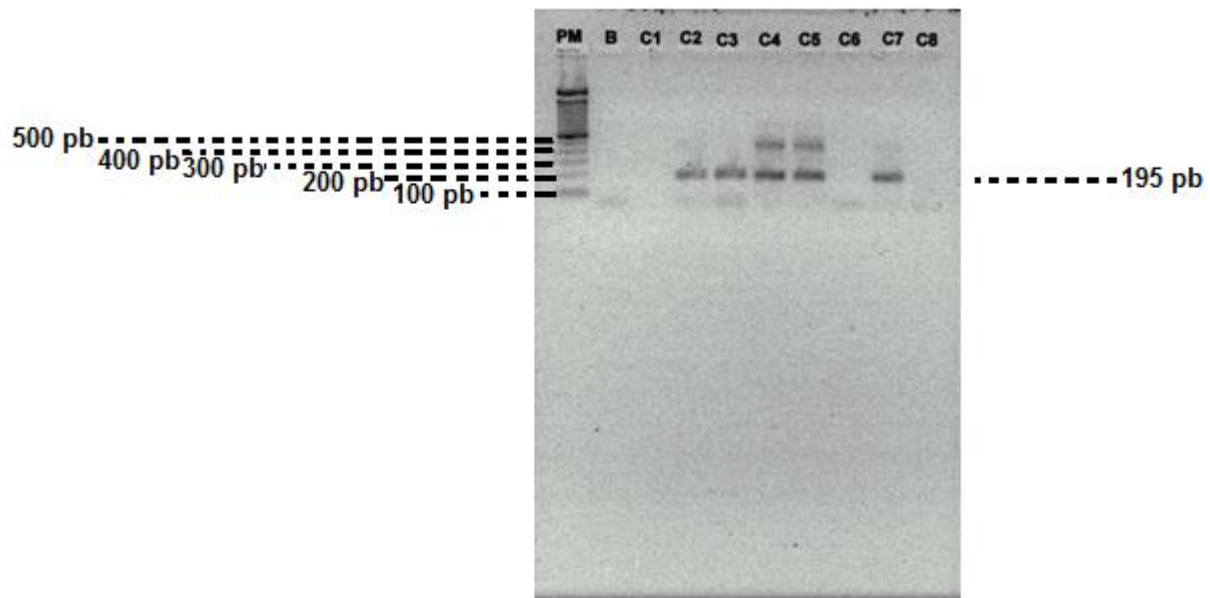


Figura 28. Amplificación de CaMv en jitomate fresco, visualizado en gel de agarosa al [2%].

Carriles de los pocillos: PM: Marcador de peso molecular, B: blanco, C2: Control interno MT, C3: Control interno MT1, C4: Muestra de DNA de J₃, C5: Muestra de DNA de J_{3,1}, C6: Muestra de DNA de J_{3,2}, C7: Muestra de DNA de J₄, C8: Muestra de DNA de J_{4,1}.

En la Figura 28 se observa el amplificado con un peso molecular de 195 pb en 5 carriles, los dos primeros C2 y C3 contienen muestra de DNA de maíz transgénico con CaMv como promotor, estas muestras solo fueron utilizadas como un control interno para garantizar el amplificado de CaMv. Los carriles C4, C5 y C6 contenían muestras de jitomate fresco J₃-variedad bola “Costco”, J_{3,1}-variedad bola “Sams club” y J_{3,2}-variedad bola “Walmart” respectivamente, los carriles C7 y C8 contenían muestras de jitomate fresco J₄-variedad cherry “Costco” y J_{4,1}-variedad cherry “Sams club”. Respecto a la variedad bola, solamente se observa amplificado para las muestras provenientes de Costco y Sams club; y para la variedad cherry se aprecia amplificado en la muestra proveniente de Costco. Dichos amplificados pertenecen a una región específica del virus del mosaico de la coliflor (CaMv), lo que indica una modificación genética usando esta secuencia como promotor para la expresión del gen insertado.

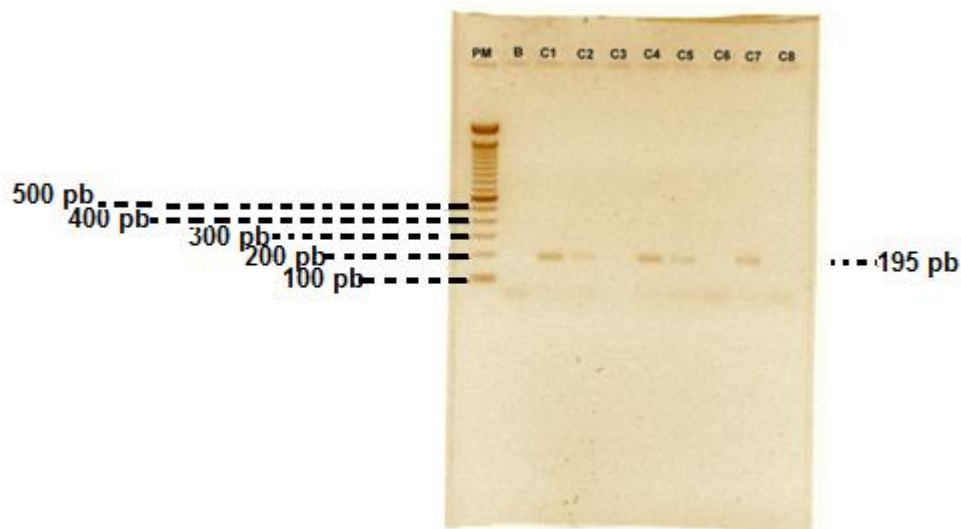


Figura 29. . Amplificación de CaMv en jitomate fresco, visualizado en gel de agarosa al [2%].

Carriles de los pocillos: PM: Marcador de peso molecular, B: blanco, C1: Control interno MT, C2: Control interno MT1, C4: Muestra de DNA de J_{4,2}, C5: Muestra de DNA de J₅, C6: Muestra de DNA de J_{5,1}, C7: Muestra de DNA de J_{5,2}.

La Figura 29 muestra el amplificado de cinco carriles con un peso molecular de 195 pb. Los carriles C1 y C2 contienen muestra de DNA de maíz transgénico con CaMv como promotor, estas muestras solo fueron utilizadas como un control interno para garantizar el amplificado de CaMv. Los carriles C4, C5, C6 y C7 contenían muestras de jitomate fresco J_{4,2}- variedad cherry “Walmart”, J₅-variedad saladet “Costco”, J_{5,1}-variedad saladet “Sams club” y J_{5,2}-variedad saladet “Walmart”, respectivamente. En cuanto a la variedad cherry se observa amplificado para la muestra proveniente de Walmart; y para la variedad saladet se aprecia amplificado en las muestras provenientes de Costco y Walmart. Dichos amplificados pertenecen a una región específica del virus del mosaico de la coliflor (CaMv), lo que indica una modificación genética usando esta secuencia como promotor para la expresión del gen insertado.

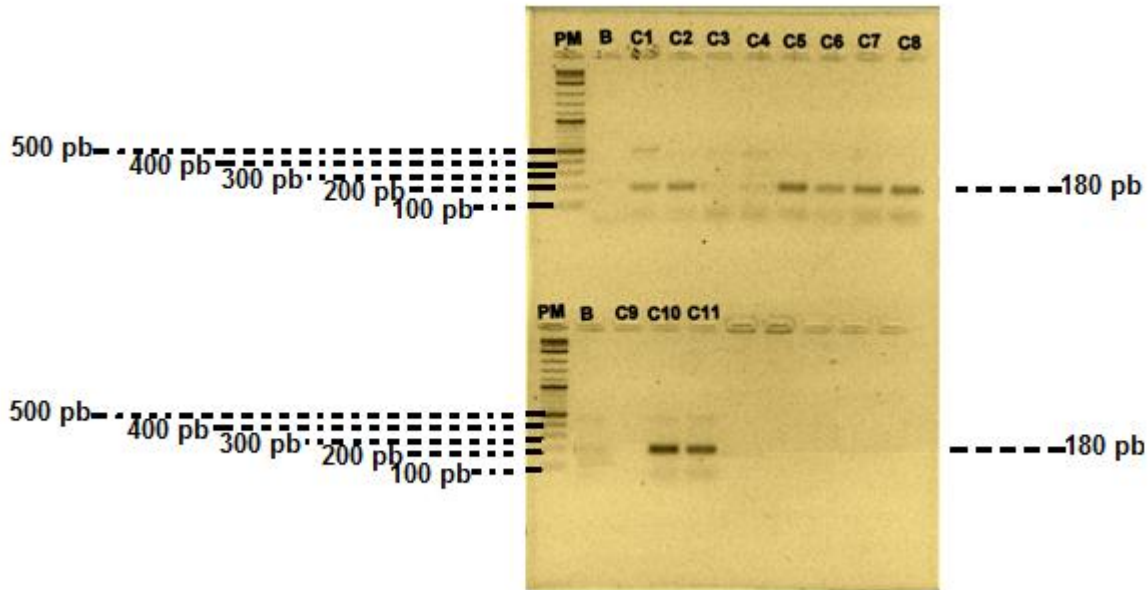


Figura 30. Amplificación de T-NOS en jitomate fresco, visualizado en gel de agarosa al [2%].

Carriles de los pocillos: PM: Marcador de peso molecular, B: blanco, C1: Control interno MT, C2: Control interno MT1, C3: Muestra de DNA de J₃, C4: Muestra de DNA de J_{3.1}, C5: Muestra de DNA de J_{3.2}, C6: Muestra de DNA de J₄, C7: Muestra de DNA de J_{4.1}, C8: Muestra de DNA de J_{4.2}, C9: Muestra de DNA de J₅, C10: Muestra de DNA de J_{5.1}, C11: Muestra de DNA de J_{5.2}.

En la Figura 30 se aprecia el amplificado de ocho bandas con un peso molecular de 180 pb. Los carriles C1 y C2 contienen muestra de DNA de maíz transgénico con T-NOS como terminador, estas muestras solo fueron utilizadas como un control interno para garantizar el amplificado de T-NOS. Los carriles C3, C4, C4, C5, C6, C7, C8, C9 C10 y C11 contenían muestras de jitomate fresco J₃- variedad bola “Costco”, J_{3.1}-variedad bola “Sam’s club”, J_{3.2}-variedad bola “Walmart”, J₄-variedad cherry “Costco”, J_{4.1}- variedad cherry “Sam’s club”, J_{4.2}-variedad cherry “Walmart”, J₅-variedad saladet “Costco”, J_{5.1}-variedad saladet “Sam’s club” y J_{5.2}-variedad saladet “Walmart” respectivamente. En cuanto a la variedad bola se observa amplificado para la muestra proveniente de Walmart; para la variedad cherry se aprecia



amplificado para las tres muestras provenientes de Costco, Sam's club y Walmart; y para la variedad saladet se observa amplificado en las muestras provenientes de Sam's club y Walmart. Dichos amplificados pertenecen a una región específica del terminador de la nopalina sintetasa (T-NOS), lo que indica una modificación genética usando esta secuencia como terminador para la expresión del gen insertado.

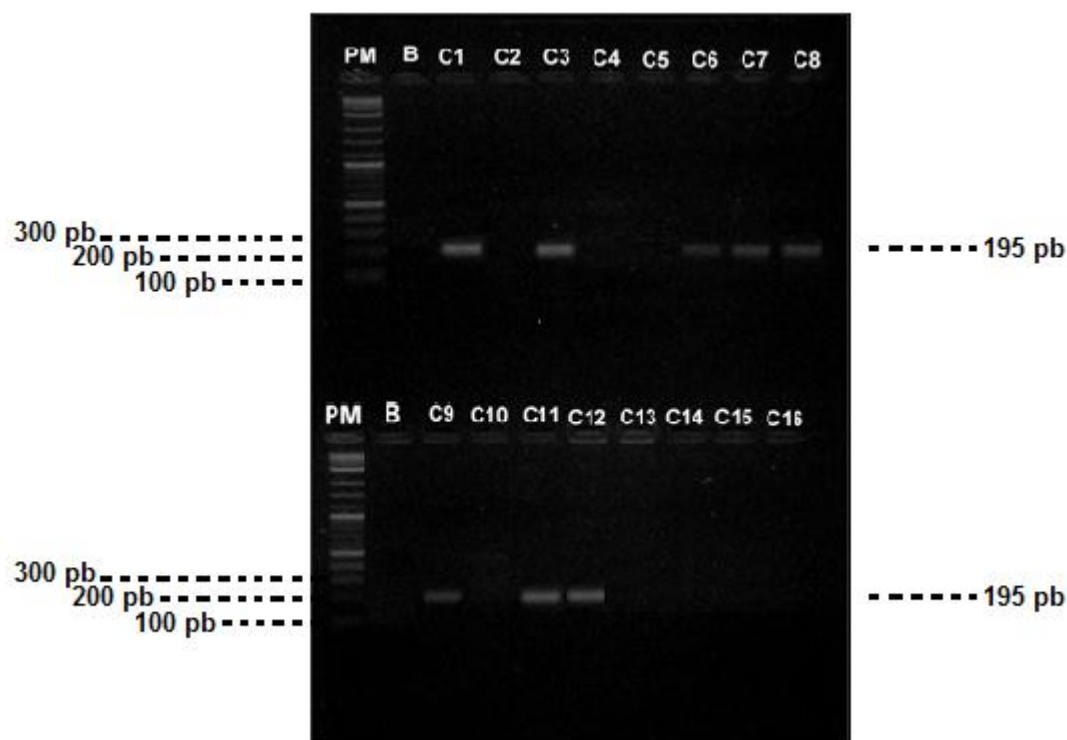


Figura 31. Amplificación de CaMv en productos de jitomate, visualizado en gel de agarosa al [2%].

Carriles de los pocillos: PM: Marcador de peso molecular, B: blanco, C1: Control interno MT, C2: Muestra de DNA de M₁, C3: Muestra de DNA de M₂, C4: Muestra de DNA de M₃, C5: Muestra de DNA de M₄, C6: Muestra de DNA de M₅, C7: Muestra de DNA de M₆, C8: Muestra de DNA de M₇, C9: Control interno MT, C10: Muestra de DNA de M₈, C11: Muestra de DNA de M₉, C12: Muestra de DNA de M₁₀.

En la Figura 31 se muestra el amplificado de 8 bandas con un peso molecular de 195 pb. El carril C1 contiene muestra de DNA de maíz transgénico con CaMv como promotor, esta muestra sólo fue utilizada como un control interno para garantizar el amplificado de CaMv. El



carril C2 contenía muestra de DNA de M₁- Salsa para pasta “Hunts”, C3 muestra de DNA de M₂- Salsa cátsup “Heinz”, C4 muestra de DNA de M₃- Jugo clamato “Grupo peñañiel”, C5 muestra de DNA de M₄- Salsa barbecue “Hunts”, C6 muestra de DNA de M₅- Puré de jitomate “La costeña”, C7 muestra de DNA de M₆- Salsa orgánica de jitomate “Classico organic”, C8 muestra de DNA de M₇- Jitomate frito “Deliciosos CIDACOS”, C9 control interno, C10 muestra de DNA de M₈- Caldo de jitomate “Knorr”, C11 muestra de DNA de M₉- Jitomate entero pelado enlatado “Deliciosos CIDACOS” y C12 muestra de DNA de M₁₀- Jitomate pelado machacado “ La costeña”. Estos amplificados pertenecen a una región específica del virus del mosaico de la coliflor (CaMv), lo que indica la presencia de una modificación genética usando esta secuencia como promotor para la correcta expresión del gen insertado.

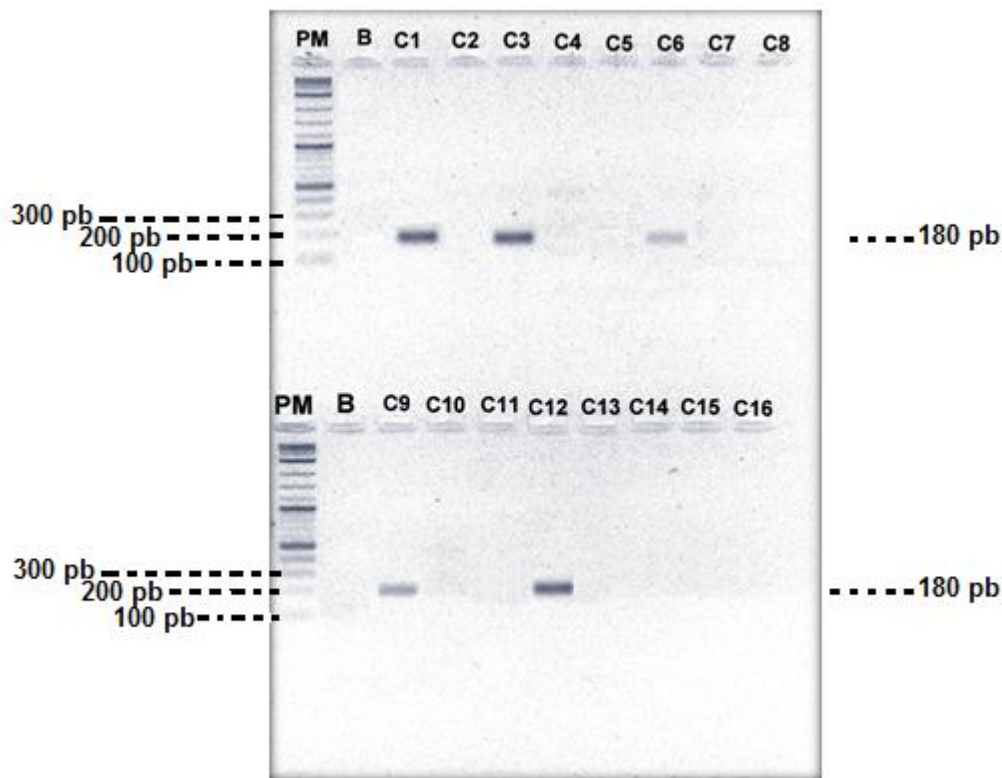


Figura 32. Amplificación de T-NOS en productos de jitomate, visualizado en gel de agarosa al [2%].



Carriles de los pocillos: PM: Marcador de peso molecular, B: blanco, C1: Control interno MT, C2: Muestra de DNA de M₁, C3: Muestra de DNA de M₂, C4: Muestra de DNA de M₃, C5: Muestra de DNA de M₄, C6: Muestra de DNA de M₅, C7: Muestra de DNA de M₆, C8: Muestra de DNA de M₇, C9: Control interno MT, C10: Muestra de DNA de M₈, C11: Muestra de DNA de M₉, C12: Muestra de DNA de M₁₀.

La Figura 32 muestra el amplificado de cinco bandas con un peso molecular de 180 pb. El carril C1 contiene muestra de DNA de maíz transgénico con T-NOS como terminador, esta muestra solo fue utilizada como un control interno para garantizar el amplificado de T-NOS. El carril C2 contenía muestra de DNA de M₁- Salsa para pasta “Hunts”, C3 muestra de DNA de M₂- Salsa cátsup “Heinz”, C4 muestra de DNA de M₃- Jugo clamato “Grupo peñañiel”, C5 muestra de DNA de M₄- Salsa barbecue “Hunts”, C6 muestra de DNA de M₅- Puré de jitomate “La costeña”, C7 muestra de DNA de M₆- Salsa orgánica de jitomate “Classico organic”, C8 muestra de DNA de M₇- Jitomate frito “Deliciosos CIDACOS”, C9 control interno, C10 muestra de DNA de M₈- Caldo de jitomate “Knorr”, C11 muestra de DNA de M₉- Jitomate entero pelado enlatado “Deliciosos CIDACOS” y C12 muestra de DNA de M₁₀- Jitomate pelado machacado “ La costeña”. Estos amplificados pertenecen a una región específica del terminador de la nopalina sintetasa (T-NOS), lo que indica la presencia de una modificación genética usando esta secuencia como terminador para la correcta expresión del gen insertado.

Tabla 8. Identificación de las secuencias CaMv y T-NOS en las muestras analizadas.

NOMBRE DE LA MUESTRA	PRESENCIA DE CamV	PRESENCIA DE T-NOS
J ₃	✓	✗
J _{3.1}	✓	✗
J _{3.2}	✗	✓



J₄	✓	✓
J_{4.1}	✗	✓
J_{4.2}	✓	✓
J₅	✓	✗
J_{5.1}	✗	✓
J_{5.2}	✓	✓
M₁	✗	✗
M₂	✓	✓
M₃	✗	✗
M₄	✗	✗
M₅	✓	✓
M₆	✓	✗
M₇	✓	✗
M₈	✗	✗
M₉	✓	✗
M₁₀	✓	✓

En la Tabla 8 se presentan los resultados obtenidos para cada muestra analizada tanto de jitomate fresco como de productos derivados. Se puede observar que en las muestras J₃, J_{3.1}, J₄, J_{4.2}, J₅, J_{5.2}, M₂, M₅, M₆, M₇, M₉ y M₁₀ la presencia de la secuencia promotora CaMv fue positiva. Para las muestras J_{3.2}, J₄, J_{4.1}, J_{4.2}, J_{5.1}, J_{5.2}, M₂, M₅ y M₁₀ la secuencia terminadora T-NOS estuvo presente; sin embargo las muestras J₄, J_{4.2}, J_{5.2}, M₂, M₅, y M₁₀ fueron las únicas en las que ambas secuencias estuvieron presentes. La presencia de al menos una de las dos secuencias indica la existencia de una manipulación genética, por lo cual se puede afirmar que las muestras que resultaron positivas para cualquiera de las dos secuencias o para ambas, son OGM. En el caso de las muestras en las que solo se identificó una secuencia, no implica que



no sean genéticamente modificadas, sino que se usó una secuencia distinta a las estudiadas en este trabajo como promotor o terminador.



CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir en primer lugar, que la metodología planteada para la identificación de organismos genéticamente modificados (OGM) fue adecuada, debido a que se encontraron fragmentos de DNA pertenecientes al virus del mosaico de la coliflor (CaMv) y al terminador de la nopalina sintetasa (T-NOS), dichas secuencias son prueba de una manipulación genética al ser estas totalmente ajenas al genoma del jitomate; y de gran uso para la producción de organismos genéticamente modificados (OGM).

En el segundo término es de suma importancia mencionar que, aunque existen leyes que exigen a las industrias alimentarias reportar en el etiquetado de sus productos el uso de estos organismos; no se cumplen en su totalidad, lo cual se demostró en el presente trabajo al detectar e identificar secuencias de genes foráneos tanto en jitomate fresco y productos derivados del mismo. Una gran razón y probablemente la más importante de dicha irregularidad es la falta de información acerca de los organismos transgénicos, generalmente los consumidores al tener conocimiento de que un producto contiene ingredientes genéticamente modificados optan por no adquirirlo, siendo esto una causa de pérdidas para la industria. A pesar de que la Ley de Bioseguridad se encarga de monitorear los productos que declaren el uso de transgénicos, en México se comercializan productos que no reportan el uso de dichos organismos.

Con la técnica de PCR se logró identificar la presencia de jitomate en los diferentes productos, sin embargo en uno de ellos no se obtuvo el amplificado esperado que garantizará la presencia de dicha especie, esto puede deberse a dos razones principales: 1) el tipo de proceso que se llevó a cabo para la obtención del producto, en el cual el DNA puede degradarse debido al uso de altas temperaturas o bien dañar su estructura por el uso de fuerzas mecánicas a lo largo de proceso; y 2) los aditivos contenidos en el producto pueden inhibir algún (os) reactivos en la PCR o bien desde el proceso de extracción de DNA.



Los primers utilizados para identificar jitomate, se diseñaron mediante programas bioinformáticos (ver anexo 1), a los cuales se realizaron pruebas de especificidad tanto en programas bioinformáticos como de manera experimental, para garantizar que los amplificados obtenidos fueran específicamente de esta especie. Los primers para CaMv y T-NOS se encontraban ya en el laboratorio debido a la existencia de trabajos precedentes relacionados con el tema.

Finalmente los genes CaMv y T-NOS son de los más utilizados para introducir genes foráneos en vegetales, sin embargo muchas ocasiones no siempre se usa esta combinación, lo cual se demostró en este trabajo con resultados favorables, al encontrar en nueve muestras de jitomate fresco al menos una de las dos secuencias en cada una de las muestras, sin embargo solo en 3 de ellas se encontraron ambas secuencias. En el caso de los productos de jitomate, en 6 de 10 productos se logró identificar al menos una de estas dos secuencias, y sólo en tres de ellos ambas secuencias.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Badui S. (2006) *Química de los alimentos*, Pearson, México.
2. Barahona E., Herrera E., Martínez T., Covarrubias R., Ribeiro S., López M., Muñoz R., Padilla A., Olivé M., Solleiro R., Toledo M., Alvarez R., Gálvez M., Covantes T., De Ita R., Bolívar Z., Fuentes M., Levidow L. (2004). *Alimentos transgénicos: ciencia, ambiente y mercado (un debate abierto)*. Siglo XXI Editores. Argentina.
3. Beltiz H., Grosch W. (2004) *Química de los alimentos*, Acribia, Zaragoza.
4. Benitez E. (2004) Tesis "Autenticación de especies de Salmon en productos comerciales amplificando regiones específicas del mt DNA, por medio de la Reacción en Cadena de la polimersa (PCR)" UNAM, México.
5. Berg P. (2004) Summary statment of the asilomar conference on recombinant DNA, Proc Natl Acad Sci, U.S.A.
6. Cankar K., Chauvensky A., Fortabat M., Gruden K., Kobilinsky A., Zel J., Bertheau Y. (2008) Detection of unanauthorized genetically modified organisms using differential quantitative polymerase chain reaction: application to 35S in maize, *Analytical Biochemistry*, 189-199 U.S.A.
7. Código Alimentario Español (1991) Colección de textos legales, Boletín Oficial del Estado, Madrid.



8. Deng P., Zhou X., Zhou P., Du Z., Hou H., Yang D., Tan J., Wu X., Zhang J., Yang Y., Liu, J., Liu, G., Li, Y., Liu, J., Yu, L., Fang, S., Yang, X. (2008) Edible safety requirements and assessment standards for agricultural genetically modified organisms, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1414 - 1436, U.S.A.
9. Engels J., Ramanatina R., Brown A., Jackson M. (2002) Managing plant genetic diversity, CABI Publishin, 380-384, United States of America.
10. European Commission (2001) Deliberate release into the enviroment of genetically modiified organisms and repealing Council Directive. *Official Journal of the European Communities*, 1-38, Europa.
11. Fellows A. y Hulland E. (2004) *Conservas alimenticias*, Acribia S.A., Zaragoza.
12. Fox B. y Camerón A. (2002) *Ciencia de los alimentos, nutrición y salud*, Limusa, México.
13. Frizzi A. (2010) *Tapping RNA silencing pathways for plant biotechnology*, Plant Biotechnology, U.S.A.
14. Gafo, J. (2001) *Aspectos científicos, jurídicos y éticos de los alimentos transgénicos*, Universsidad Pontificia, Madrid.



15. García V., Cifuentes A., (2008) Simultaneous confirmatory analysis of different transgenic maize (*Zea mays*) lines using multiplex polymerase chain reaction-restriction analysis and capillary gel electrophoresis with laser induced fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 820-828, United States.
16. González F. (2006) Ensayos médicos sobre Genética. La Genética Molecular en la Medicina Ecuatoriana, Noción, Quito.
17. Gutiérrez A. (2008) Obtención e Identificación de Organismos Vivos Modificados – OGM's (transgénicos), 11-12, 1-79. *Uso sustentable de la biotecnología*, Perú.
18. Heiss R. (1970) Principios de envasado de los alimentos, Acribia S.A., Zaragoza.
19. Holst A. (2012) Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials, *Biotechnology Advances* , 1-18, U.S.A.
20. Johnson P. (2002). *Introduction to food Biotechnology*, CRS Press LLC, 103-115, United States of America.
21. Khachatourians G. (2002), *Transgenics plants and crops*, Marcel Dekker, Inc, 637-654, United States of America.
22. Laboratory Press Rodríguez J. (2008) *Perspectivas de la información biomedica y farmacéutica en España*, Real Academia de Farmacia, Madrid.,



23. López A. (1987) Processing procedures for canned food products, The Canning Trade, Inc., Baltimore, U.S.A.
24. Margarit E., Reggiardo M., Vallejos R., Permingeat, H. (2006) Detection of BT transgenic maize in foodstuffs, Food Research International, 39, 250-255, U.S.A.
25. Mondoñedo J. (2000) Manual para Tomates, Trillas, México.D.F.
26. National Food Processors Association (2001) Alimentos enlatados: Principios de control del procesado térmico, acidificación y evaluación del cierre de los envases, The Food Processors Institute.
27. Ortega R. (2010) Maíz transgénico: riesgos y beneficios, Universidad de Sonora, 41-43, Hermosillo.
28. Pengue A. (2000) Cultivos transgénicos, ¿Hacia donde vamos?, Impresiones Sudamérica, Buenos Aires.
29. Perera J., Tormo A., García J. (2002) Ingeniería genética: preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA volumen I, Síntesis, 40-48, España.
30. Perera J., Tormo A., García J., (2002) Ingeniería genética: expresión de DNA en sistemas heterólogos volumen II, Síntesis, 41-55, España.



31. Pierce A. (2011) Fundamentos de genética conceptos y relaciones, Médica Panamericana, Buenos Aires.
32. Rees J. y Bettinson J. (1994) Procesado térmico y envasado de los alimentos, Acribia S. A., Zaragoza.
33. Rodríguez J. (2008) Perspectivas de la información biomedica y farmacéutica en España, Real Academia de Farmacia, Madrid.
34. Sambrook J. y Russel D. (2001) Molecular cloning. A laboratory Manual, Cold Spring Harbor, United States of America.
35. Sector Agroalimentario (2003) Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria. Agenda Española de Seguridad Alimentaria, Sector Agroalimentario, 1 – 78, Genoma España.
36. Sielaff H. (2000) Tecnología de la fabricación de conservas, Acribia S.A., Zaragoza.
37. Souci F. (2001) Tablas de composición de alimentos, Acribia S.A., Zaragoza.
38. 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, U.S.A.



39. Tagu D. (2006) Fundamentos de las técnicas de biología molecular, Acribia S.A, Zaragoza.
40. Teijón R., Garrido P., Villaverde G., Blanco G., Mendoza O., Ramírez R., (2005) Fundamentos de bioquímica estructural, Tébar, 34-51, México.
41. Vijayakumar K., Martin A., Gowda R., Prakash V. (2009) Detection of genetically modified soya and maize: impact of heat processing, Food Chemistry, 117, 514 – 521, U.S.A.
42. Villalobos A. (2008) Los transgénicos oportunidades y amenazas, Mundi Prensa, México, D.F.
43. Watson J. (2003) ADN, el secreto de la vida, Taurus, 22-49, España.

RECURSOS ELECTRÓNICOS

44. Biosafety Clearing House (BCH) (2011) Living Modified Organism (LMO) Consultado (15/03/2012) de <http://bch.cbd.int/database/lmo-registry>.
45. Center for Environmental Risk Assessment (CERA) (2000). GM crop database, Consultado el 15/03/2012 de <http://www.cera-gmc.org/cropdatabase>



46. Genetically Modified Organisms (GMO) COMPASS (2008), Consultado el 15/03/2012 de <http://www.gmo-compass.org>

47. Monografías (2010) Métodos y aplicaciones de la biología molecular en Biomedicina (en línea), Consultado el 4/04/2012, de <http://www.monografias.com/trabajos20/biologia-molecular/biologia-molecular.shtml>

48. Ortiz S. (2002) Los organismos genéticamente modificados y el análisis de riesgos (en línea), Consultado el 2/05/12 de <http://www.nappo.org/PRA-Symposium/PDF-Final/Ortiz.pdf>

49. Patent L. (2010) TheCaMV 35S promoter (en línea), Consultado 15/04/2012 de <http://www.patentlens.net/daisy/promoters/242/g1/250.html>

50. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (2010) Jitomate Monografía de cultivos (en línea), Consultado el 12/04/2012 de <http://www.sagarpa.gob.mx>

51. National Center for Biotechnology Information (NCBI) (1992) Base de datos genómica, Consultado el 12/05/12 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>



GLOSARIO

- **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 complementario (cDNA):** Es una hebra de ADN que constituye una secuencia totalmente complementaria de doble cadena a (se sintetiza a partir de una hebra simple de) un ARN mensajero (ARNm). Suele utilizarse para la clonación de genes propios de células eucariotas en células procariontas, debido a que, dada la naturaleza de su síntesis, carece de intrones.
- **DNA diana:** Región de DNA que se desea amplificar.
- **RNA mensajero (RNAm):** Es el ácido ribonucleico que contiene la información genética (el código genético) procedente del ADN del núcleo celular a un ribosoma en el citoplasma, es decir, el que determina el orden en que se unirán los aminoácidos de una proteína y actúa como plantilla o patrón para la síntesis de dicha proteína. Se trata de un ácido nucleico monocatenario, al contrario del ADN, que es bicatenario (de doble hebra helicoidal).

Todos los ARNmeucarióticos son monocistrónicos, es decir, contienen información para una sola cadena polipeptídica, mientras que en los organismos procariontas los ARNm son con frecuencia policistrónicos, es decir, codifican más de una proteína.



- **RNA ribosomal (rRNA):** Es el tipo de ARN más abundante en las células y forma parte de los ribosomas. Estos se encargan de la síntesis de proteínas según la secuencia de nucleótidos presente en el ARN mensajero. Está formado por una sola cadena de nucleótidos (aunque presenta regiones de doble hélice intracatenaria).
- **Amplificación:** Producción de copias adicionales de un secuencia de DNA.
- **Biodiversidad:** Variabilidad total en y entre las especies de organismos vivos y sus hábitats. El término, utilizado por primera vez en 1986 para designar la diversidad biológica, se refiere usualmente a la totalidad de la variedad heredable en todos los niveles y suele dividirse en tres niveles: genética (genes en una población local o especie), taxonómica (las especies que conforman toda o parte de una comunidad local) y ecológica (las comunidades que integran las partes vivas de los ecosistemas).
- **Bioseguridad:** El propósito de garantizar que el desarrollo y uso de plantas transgénicas y otros organismos genéticamente modificados (y productos de 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.
- **Blanco:** Preparación con los componentes para la PCR excepto el DNA, se utiliza para garantizar que no existe contaminación alguna con otro DNA.



- **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.
- **Empalado:** Proceso que se realiza en siembras en la época de lluvias o en zonas secas donde, debido al problema de la baja infiltración de los suelos, casi siempre se mantiene una lámina o espejo de agua en los surcos. El empalado normal consiste en colocar estacas o varas verticales cada 1.5 a 2 m sobre el camellón, donde van colocadas varas horizontales: la primera entre 40 y 50 cm y las siguientes cada 40 cm. El material utilizado para empalar es maguey, caña brava y varas de café.
- **Especie:** Categoría taxonómica de las formas vivas que comprende a organismos sexualmente compatibles que, en condiciones naturales, se cruzan libremente entre sí o pueden ser creados. 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:** Es en relación con los organismos manipulados mediante ingeniería genética, proceso por el cual 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, por lo general, distintas. 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.
- **Gen:** Unidad funcional de la herencia (es decir, la base física para la transmisión de caracteres de los progenitores a sus descendientes), y unidad básica de la diversidad biológica.
- **Gen marcador (o marcador genético):** Todo segmento de DNA que pueda identificarse o cuya localización en el cromosoma sea conocida, de manera que resulte posible usarlo como punto de referencia para ubicar otros genes.
- **Genoma:** Todo el material hereditario de una célula o virus, incluida la dotación completa de genes funcionales y no funcionales. En los organismos superiores el genoma abarca el conjunto entero de cromosomas contenidos en el núcleo celular.
- **Germoplasma:** Es el conjunto de genes que se transmiten por la reproducción a la descendencia por medio de gametos o células reproductoras.
- **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.
- **Organismos Genéticamente Modificados o transgénicos (OGM):** Se caracterizan 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.
- **Primer o cebador:** Pequeña cadena de oligonucleótidos a partir de la cual la DNA polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de DNA.
- **Protoplasto:** Célula de planta, bacteria u hongo desprovista o bien que ha perdido total o parcialmente su pared celular.
- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Método empleado para amplificar una secuencia específica de DNA *in vitro* mediante ciclos repetidos de síntesis, usando cebadores específicos y DNA polimerasa.
- **Recombinación:** Unión de genes (es decir, segmentos de DNA), conjuntos o partes de genes para dar lugar a nuevas combinaciones, ya sea biológicamente o por medio de la manipulación en laboratorio.
- **Recursos genéticos:** Material genético que sirve como fuente para el aprovechamiento humano actual y futuro.
- **Secuenciación de DNA:** Determinación del orden de nucleótidos o bases en una muestra pura de moléculas de DNA.



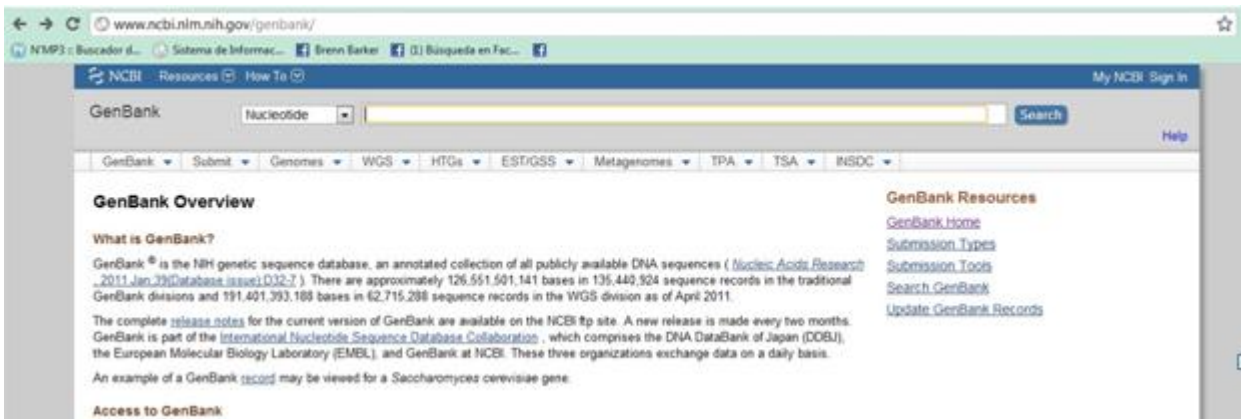
- **Solanáceas:** Familia de plantas herbáceas o leñosas con las hojas alternas, simples y sin estípulas pertenecientes al orden Solanales, de las dicotiledóneas.
- **Totipotencia:** Es la capacidad que tiene cualquier célula vegetal para regenerar una planta completa.
- **Transformación genética:** Proceso por el que se transfiere directamente DNA libre (es decir, no cromosómico y asociado a un vector) de un organismo donador a una célula receptora capaz de producir un organismo transgénico.
- **Transgén:** “Paquete” de material genético (DNA) que se inserta en el genoma de una célula mediante técnicas de empalme incluida la transferencia de especies distintas en el genoma de una organismo huésped. Un transgén puede consistir en uno o más genes de un organismo distinto (es decir, DNA extraño) o bien genes creados artificialmente.
- **Transgénico:** Organismo que contiene material genético (DNA) nuevo, derivado de un organismo distinto o añadido al material genético progenitor, el término incluye a la progenie de un organismo genéticamente modificado.
- **Tumor:** Daño físico causado por una enfermedad.
- **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.



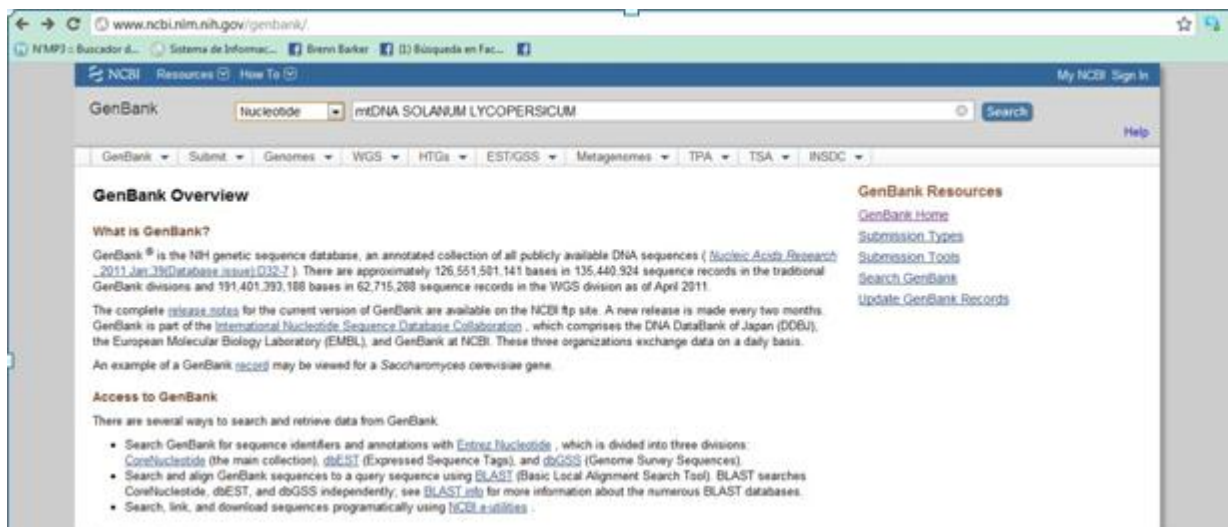
ANEXO 1

SELECCIÓN DE PRIMERS PARA IDENTIFICAR JITOMATE

1. Ingresar a la página del GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>



2. Seleccionar la base de datos perteneciente a nucleótidos.



3. Escribir en la barra de búsqueda el nombre científico de la especie que se desea conocer.



www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss?term=mtDNA%20SOLANUM%20LYCOPERSICUM

NCBI Resources How To My NCBI Sign In

GSS Search

Display Settings: Summary, 20 per page, Sorted by Default order

The following term was not found in GSS: mtDNA.

Results: 1 to 20 of 413571

1. [Solanum lycopersicum cultivar Heinz 1706 GSS, clone TD387-CR317, genomic survey sequence](#)
540 bp linear DNA
Accession: HE805210.1 GI: 387156813
[GSS](#) [GenBank](#) [FASTA](#)
2. [Solanum lycopersicum cultivar Ferum GSS, clone TD386-CR003, genomic survey sequence](#)
400 bp linear DNA
Accession: HE805209.1 GI: 387156812
[GSS](#) [GenBank](#) [FASTA](#)
3. [Solanum lycopersicum cultivar Heinz 1706 GSS, clone TD385-CR317, genomic survey sequence](#)
639 bp linear DNA
Accession: HE805208.1 GI: 387156811
[GSS](#) [GenBank](#) [FASTA](#)

4. Dar clic en uno de los enlaces proporcionados.
5. Copiar el # de identificación “gi” en la barra de búsqueda y dar clic en el botón “buscar”

www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/HE805210.1

NCBI Resources How To My NCBI Sign In

GSS Search

Display Settings: GSS

Solanum lycopersicum cultivar Heinz 1706 GSS, clone TD387-CR317, genomic survey sequence

GenBank: HE805210.1
[GenBank](#) [FASTA](#)

IDENTIFIERS

dbGSS Id:	34391981
GSS name:	HE805210
GenBank Acc:	HE805210
GenBank gi:	387156813

CLONE INFO

Clone Id:	TD387-CR317
DNA type:	Genomic

PRIMERS

PCR forward:	gaaaatgcaggaggaaacca
PCR backward:	atgtgaatccogtagcaaca

SEQUENCE

```
TTTCCTGATCAAGCTCTGAAGTGGAAATAGGCTAGACCTGCTCTCTAACTTTTCAGTT
TCACCCGAGGACGGTCCCTTGTTCATTAAACCAATCACTTTTCATAGTCAATGTCGAAAG
```

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

LinkOut to external resources

Gramene [Gramene]

Related information

BioSample

Taxonomy

Recent activity

Solanum lycopersicum cultivar Heinz 1706 GSS, clone TD387-CR317, genomic sun gss

mtDNA SOLANUM LYCOPERSICUM

6. Dar clic en el enlace FASTA.



www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/387156813

NCBI Resources How To My NCBI Sign In

GSS GSS Search Limits Advanced Help

Display Settings: GSS Send to:

Solanum lycopersicum cultivar Heinz 1706 GSS, clone TD387-CR317, genomic survey sequence

GenBank: HE805210.1
[GenBank](#) [FASTA](#)

IDENTIFIERS

dbGSS Id: 34391981
 GSS name: HE805210
 GenBank Acc: HE805210
 GenBank gi: 387156813

CLONE INFO

Clone Id: TD387-CR317
 DNA type: Genomic

PRIMERS

PCR forward: gaaaatgaggaggaaaccca
 PCR backward: atgtgaatcccgatagcaaca

SEQUENCE

TTTCCTGATCAAGCTCTGAAGTGGAAATAGGCTAGACCTGCTCTCTAACTTTGCAAGTTTCAACCCGAG
 TCAACCCGAGGACGGTCCCTTGTTCATTAACCAATCACTTTTCATAGTCAITGTCAAGGGCCGAAATTTTCAGTTGC

Analyze this sequence
 Run BLAST
 Pick Primers

LinkOut to external resources
 Gramene [Gramene]

Related information
 BioSample
 Taxonomy

Recent activity
 Turn Off Clear

Solanum lycopersicum cultivar Heinz 1706 GSS, clone TD387-CR317, genomic sun.gss

mDNA SOLANUM LYCOPERSICUM

7. Seleccionar la secuencia de DNA proporcionada y dar clic en el enlace “RUN BLAST”.

www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/387156813?report=fasta

NCBI Resources How To My NCBI Sign In

GSS GSS Search Limits Advanced Help

Display Settings: FASTA Send to:

Solanum lycopersicum cultivar Heinz 1706 GSS, clone TD387-CR317, genomic survey sequence

GenBank: HE805210.1
[GSS](#) [GenBank](#)

>gi|387156813|gb|HE805210.1|HE805210 HE805210 Solanum lycopersicum cultivar Heinz 1706 library Solanum lycopersicum genomic clone TD387-CR317, genomic survey sequence

TTTCCTGATCAAGCTCTGAAGTGGAAATAGGCTAGACCTGCTCTCTAACTTTGCAAGTTTCAACCCGAG
 GACGGTCCCTTGTTCATTAACCAATCACTTTTCATAGTCAITGTCAAGGGCCGAAATTTTCAGTTGC
 TTTGGCCCAAACCTTTCCAAATCTGCAATGGGGAGCTTGACATTGACCTTGACATTCAATGAGGCT
 TGTAAATACCTTAATCCGATTTTGTGAGGACAAGGAAACCAAGTAGATCCACTGCTAGACATGGCAGCA
 TTGAGAGAAACCAAGCTTGTCTTTGGTAGCCATGCCAATTCCTTCACTGCTTTGGTATTTCTTGTA
 GGTGAGGAGAAAGCTTAACCAATATGTTGGTATCAACCAAGACTACCTTGTCTTGACTTTTTCAGAGAC
 AGCTGCAATTTGTGCTATAGAAACTGTCAACCAATGTGAGATTCTCTATAGGAATTTGCTGACTATT
 GGAATTTGCTATCATCAACCTTGTCCAGGTCAGACACTTGTAAAG

Analyze this sequence
 Run BLAST
 Pick Primers

LinkOut to external resources
 Gramene [Gramene]

Related information
 BioSample
 Taxonomy

8. Copiar en el campo libre la secuencia de DNA antes proporcionada y dar clic en el enlace BLAST.



Standard Nucleotide BLAST

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)

GGCAAGAC
AGCTGCAGTTGTGGCTATAGAAGCTGTCAAACCATGTGTAGATCTTCTATAGGAATTGTTTC
TGACTATT
GGAGTTTTGGCTATCATCAATAACCTTGTCCAGGTCAGACACATTGTAAAG

Or, upload file

Seleccionar archivo No se ha seleccionado ningun archivo

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

Program Selection

Optimize for

Highly similar sequences (megablast)

More dissimilar sequences (discontiguous megablast)

Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm

BLAST Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)

Show results in a new window

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow and marked with + sign

9. La página proporcionará un cuadro con las especies de posible hibridación, corroborar que todas estas pertenezcan a la misma especie en estudio. Dar clic en el enlace BLAST.

Nucleotide Sequence (540 letters)

Query ID |cl|43089
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 540

Database Name nr
Description All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
Program BLASTN 2.2.26+ > Citation

Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
JF284846.1	Solanum lycopersicum clone Le_HBa0139K19 genomic sequence, co	998	998	100%	0.0	100%	
AC215392.2	Solanum lycopersicum chromosome 2 clone C02HBa0130B04, compl	998	998	100%	0.0	100%	
JF285031.1	Solanum lycopersicum RFLP marker TG463-T7 genomic sequence	660	660	75%	0.0	96%	
AC226503.1	Solanum lycopersicum chromosome 2 clone C02HBa0044J01, comple	494	936	100%	4e-136	84%	

10. Dar clic en el enlace PRIMER BLAST



11. Introducir la secuencia de DNA seleccionada en el campo libre, seleccionar el tamaño del producto de PCR requerido así como el número de primers que se desean y establecer las temperaturas.

12. Seleccionar la base de datos perteneciente a “todos los organismos” y dar clic en el botón “GET PRRIMERS”.



Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Database Refseq mRNA

Organism Refseq mRNA
 Genome (reference assembly from selected organisms)
 Genome (chromosomes from all organisms) *highlighted in yellow*
 Refseq RNA (refseq_ma)
 nr

Exclusion (optional) Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) Exclude uncultured/environmental sample sequences

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end. Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer.

Misprimed product size deviation 4000

Splice variant handling Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

Get Primer Show results in a new window Use new graphic view

Advanced parameters

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

13. Seleccionar el par de primer de acuerdo al porcentaje de guanina-citosina, este debe estar alrededor del 50%. Las temperaturas de hibridación no deben diferir en más de 2°C.