



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Detección de arroz tradicional (*Oryza sativa*) y
genéticamente modificado en productos comerciales
en México aplicando la Reacción en Cadena de la Polimerasa”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

ANA PAOLA SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

**ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA
COASESORA: M. EN C. JOSEFINA MORENO LARA**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

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


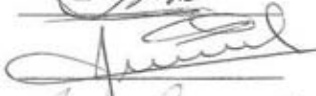

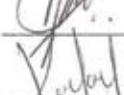
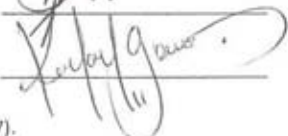
Detección de arroz tradicional (*Oryza sativa*) y genéticamente modificado en productos comerciales en México aplicando la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Que presenta la pasante: Ana Paola Sánchez Rodríguez
Con número de cuenta: 410011669 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 06 de Octubre de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Ernesto Moreno Martínez	
VOCAL	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
SECRETARIO	Dra. Carolina Moreno Ramos	
1er. SUPLENTE	Dra. Elsa Gutiérrez Cortez	
2do. SUPLENTE	I.A. Karla Mariana García Banda	

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

HMI/iac

DEDICATORIAS

Dedico la culminación de este trabajo de tesis y en consecuencia una etapa más de mi vida...

A mis papás, por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi trayectoria escolar, en la vida y por la excelente formación que me dieron, pero especialmente a mi mamá; porque este último año tuvimos que aprender muchas cosas estando separadas. Los quiero mucho.

A mi hermano, por sus consejos, las pláticas, las enseñanzas y por todas las “playlist” que hicimos y que seguiremos haciendo.

A Angie, Vicky, Brian, Jorge Luis, Marino, Adilene, Maggy, Fanny, Gaby, Yane, Tiaré, Rosa, Chucho y Valeria, fue increíble haberlos conocido y compartido con ustedes tantas experiencias, hicieron de estos 5 años algo ¡inolvidable!

A Omar, mi cadena complementaria, por darle sentido a mi vida de 5’- 3’ ☺.

A Daniela, Vania, Jozz, Óscar Daniel, Kevin, Carlos Andrés, Karen, Raciél, Isaac y Mich, pues aunque cada uno tomó caminos muy diferentes, siempre estuvieron conmigo, mostrándome su apoyo pero sobre todo su AMISTAD.

A Miri, Pato, Amparo, Adry, Sophy, Jime, Orne, Manu y Dani, mi querida Mafia Ferro, solo ustedes saben porque “cuando el fin se acerque solo será el principio”.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Francisco Montiel Sosa, por su asesoría y gran apoyo para la realización de este proyecto, así como su buena disposición y tiempo.

A la M. en C. Josefina Moreno Lara, por su apoyo incondicional, por haber hecho más ameno el trabajo en el laboratorio, sus consejos, asesoría, así como el tiempo y la confianza brindados.

A mis sinodales por el tiempo que dedicaron a la revisión de esta tesis, sus recomendaciones, observaciones, experiencia y orientación, que me permitieron culminar este proyecto de la mejor manera.

A la UNAM, pero sobre todo a la FES Cuautitlán y sus profesores: Antonio Trejo Lugo, Saturnino Maya Ramírez, Laura Margarita Cortazar Figueroa, Francisco Javier López Martínez, Edgar Arechavaleta Vázquez, Dolores Molina Jasso y Victor Manuel Ávalos Ávila, por la formación académica y personal que me brindaron ya que son parte esencial de este logro.

**Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación
Tecnológica (PAPIIT) IN211413**

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES.....	4
1.1 Generalidades del arroz.....	4
1.1.1 Origen e historia.....	4
1.1.2 Descripción taxonómica y morfológica del arroz (<i>Oryza sativa</i>).....	5
1.1.2.1 Estructura y clasificación del grano de arroz.....	7
1.1.3 Valor nutricional.....	8
1.1.4 Distribución geográfica mundial del arroz.....	8
1.1.4.1 Importancia del cultivo a nivel nacional.....	10
1.1.5 Productos derivados de arroz.....	11
1.2 Organismos Genéticamente Modificados (OGM).....	12
1.2.1 Arroz transgénico.....	13
1.2.1.1 Enzimas de restricción y plásmidos.....	13
1.2.1.2 Promotores y terminadores.....	15
1.2.2 Métodos para la transformación genética del arroz.....	17
1.2.2.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
1.2.2.2 Biobalística (bombardeo de partículas).....	19
1.2.2.3 Protoplastos y electroporación.....	21
1.2.3 Transgenes de importancia agronómica.....	22
1.2.3.1 Resistencia a herbicidas.....	22
1.2.3.2 Resistencia a insectos.....	23
1.2.3.3 Resistencia a virus, bacterias y hongos.....	24
1.2.3.4 Tolerancia a factores abióticos.....	25
1.2.3.5 Otras aplicaciones.....	25
1.2.4 Situación actual de los OGM.....	27
1.2.4.1 Marco regulatorio.....	32

1.3 Técnicas biotecnológicas para la identificación de transgenes.....	36
1.3.1 Técnicas basadas en el análisis de proteínas.....	36
1.3.2 Técnicas genéticas.....	38
1.3.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	39
1.3.2.2 Fundamento y componentes de la PCR.....	40
1.3.2.3 Etapas de la reacción.....	42
1.3.2.4 Consideraciones para el diseño de “primers”.....	45
1.3.2.5 Factores que afectan la PCR.....	47
1.3.2.6 Análisis del producto de la PCR.....	48
1.3.2.7 Tipos de PCR.....	50
1.3.2.8 Aplicaciones de la PCR.....	52
1.3.3 Extracción de ADN.....	53
CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	55
2.1 Cuadro metodológico.....	56
2.1.1 Descripción del cuadro metodológico.....	56
2.2 Materiales y métodos.....	58
2.2.1 Material biológico.....	58
2.2.2 Diseño de “primers”.....	59
2.2.3 Extracción de ADN.....	60
2.2.3.1 Extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.....	61
2.2.3.2 Extracción con “kit” comercial.....	62
2.2.4 Cuantificación de ADN por medio de absorbancia.....	63
2.2.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	63
2.2.5.1 PCR con Master Mix®.....	63
2.2.5.2 PCR directa.....	66
2.2.6 Electroforesis en gel de agarosa.....	67
2.2.6.1 Visualización de los geles de agarosa.....	68
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
3.1 Objetivo particular 1.....	69
3.1.1 “Primers” diseñados para la identificación de arroz (<i>Oryza sativa</i>).....	69

3.2 Objetivo particular 2.....	70
3.2.1 Extracción y cuantificación de ADN de las muestras de arroz.....	70
3.2.1.1 Integridad del ADN.....	72
3.2.2 Amplificación de arroz mínimamente procesado (control positivo).....	74
3.2.3 Prueba de especificidad de “primers” para arroz tradicional.....	75
3.2.4 Amplificación de arroz mínimamente procesado y productos derivados.....	77
3.3 Objetivo particular 3.....	81
3.3.1 Amplificación de arroz genéticamente modificado.....	81
3.3.1.1 Amplificación del gen CaMV35S.....	81
3.3.1.2 Amplificación del gen T-NOS.....	83
CONCLUSIONES.....	86
RECOMENDACIONES.....	87
GLOSARIO.....	88
REFERENCIAS.....	90
ANEXO 1.....	95
ANEXO 2.....	98
ANEXO 3.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Partes de la planta de arroz.....	6
Figura 2.	Partes del grano de arroz.....	7
Figura 3.	Producción mundial de arroz.....	9
Figura 4.	Comparación de la existencia de arroz blanco en el mundo respecto a su oferta, demanda y exportación.....	10
Figura 5.	Superficie sembrada y cosechada de arroz en México.....	11
Figura 6.	Construcción de una molécula de ADN recombinante.....	14
Figura 7.	Plásmido recombinante usando EcoR1.....	15
Figura 8.	Estructura del gen <i>bar</i> en un plásmido.....	17
Figura 9.	Transformación de plantas por infección con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
Figura 10.	Transformación de plantas transgénicas por biobalística.....	20
Figura 11.	Planta transgénica resistente a insectos mediante <i>A. tumefaciens</i>	24
Figura 12.	Panorama mundial de cultivos biotecnológicos en 2013.....	29
Figura 13.	Estructura del ADN.....	40
Figura 14.	Etapas de desnaturalización (PCR).....	42
Figura 15.	Etapas de hibridación o alineamiento (PCR).....	43
Figura 16.	Etapas de elongación (PCR).....	43
Figura 17.	Representación gráfica del ciclo de PCR.....	44
Figura 18.	Cuadro metodológico.....	55
Figura 19.	Etapas y condiciones programadas en el termociclador para la identificación de arroz tradicional.....	65
Figura 20.	Etapas y condiciones programadas en el termociclador para la identificación de OGM.....	65
Figura 21.	Etapas y condiciones programadas en el termociclador para PCR directa.....	66
Figura 22.	Secuencia de ADN amplificado con el uso de los “primers” diseñados a partir de un gen del cromosoma 11 del arroz que codifica para una proteína.....	69
Figura 23.	Secuencia de ADN amplificado con el uso de los “primers” diseñados a partir de un gen del cromosoma 14 del arroz que codifica para una proteína.....	70
Figura 24.	Electroforesis en gel de agarosa al 1% a 90 V para comprobar la presencia,	

	integridad y pureza del ADN extraído con el protocolo de Sambrook.....	72
Figura 25.	Electroforesis en gel de agarosa al 1% a 90 V para comprobar la presencia, integridad y pureza del ADN extraído con a) protocolo de Sambrook b) “kit” comercial.....	73
Figura 26.	Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% a 90 V con ambas parejas de “primers” para la amplificación de arroz mínimamente procesado.....	74
Figura 27.	Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% a 90 V para especificidad de “primers” diseñados a partir de un gen del cromosoma 11 del arroz que codifica para una proteína.....	75
Figura 28.	Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% a 90 V para especificidad de “primers” diseñados a partir de un gen del cromosoma 4 del arroz que codifica para una proteína.....	76
Figura 29.	Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% a 90 V para identificación de arroz tradicional.....	77
Figura 30.	Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% a 90 V para identificación de arroz tradicional mediante PCR directa.....	78
Figura 31.	Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% a 90 V para identificación de arroz tradicional mediante PCR directa.....	79
Figura 32.	Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% a 90 V para identificación de arroz tradicional mediante PCR directa.....	80
Figura 33.	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 65 V para amplificación del gen de CaMV35S.....	82
Figura 34.	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 65 V para amplificación del gen de CaMV35S mediante PCR directa.....	82
Figura 35.	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 65 V para amplificación del gen de T-NOS.....	83
Figura 36.	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 65 V para amplificación del gen de T-NOS mediante PCR directa.....	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del arroz por 100 g de muestra	8
Tabla 2. Arroz transgénico con genes de importancia agronómica.....	27
Tabla 3. Transgénicos disponibles en el mercado	30
Tabla 4. Estatus regulatorio en México de OGM	34
Tabla 5. Comparación entre las técnicas utilizadas para la identificación de transgenes....	38
Tabla 6. Consideraciones para el diseño de “primers”	46
Tabla 7. Generalidades de las muestras de arroz mínimamente procesado.....	58
Tabla 8. Generalidades de los productos derivados de arroz.....	59
Tabla 9. Temperatura de hibridación para los “primers” diseñados.....	60
Tabla 10. Secuencia de “primers” para la identificación de transgénicos.....	64
Tabla 11. Componentes de la reacción para PCR.....	64
Tabla 12. Componentes de la reacción para PCR directa.....	66
Tabla 13. Secuencias de “primers” diseñados para la identificación de arroz	69
Tabla 14. Concentración de ADN de arroz mínimamente procesado	71
Tabla 15. Concentración de ADN de productos derivados de arroz	71
Tabla 16. Muestras de ADN para la prueba de especificidad de “primers”	75
Tabla 17. Controles positivos para CaMV35S y T-NOS	81

RESUMEN

El uso de Organismos Genéticamente Modificados (OGM) o transgénicos como productos alimenticios ha tomado mayor importancia en los últimos años, tan solo en México, ya sea por implicaciones sociales o culturales aún no se acepta en su totalidad el consumo, venta o cultivo de éstos. Los consumidores demandan información en el etiquetado, pues finalmente ellos son los que pueden decidir que se está comprando, por ello, evaluar la presencia de transgénicos con evidencia científica ha sido necesario. Partiendo de eso, el presente trabajo de tesis fue realizado con el objetivo de identificar la presencia de arroz genéticamente modificado, no reportado en el etiquetado, en productos comerciales de consumo en México. Para lograr esto, se utilizó la técnica biomolecular conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de las secuencias parciales del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV35S) y el Terminador de la Nopalina Sintetasa (T-NOS). Se evaluaron 21 productos en total, 7 pertenecían a arroz mínimamente procesado y 14 correspondían a productos derivados de éste, sometidos a diversos procesos industriales, se diseñaron 2 parejas de “primers” con ayuda de programas bioinformáticos para la identificación de arroz en los productos evaluados, se extrajo el ADN de todas las unidades experimentales siguiendo el protocolo de Sambrook; así como con un “kit” comercial especial para alimentos procesados, se amplificó el ADN mediante PCR punto final y PCR directa para la detección de arroz tradicional, así como genéticamente modificado, y se visualizaron los resultados mediante electroforesis. Finalmente, se comprobó la especificidad de una de las parejas de “primers” para la identificación de arroz tradicional, de las 21 muestras analizadas, 10 amplificaron con el uso de los “primers” diseñados, 5 de esas muestras amplificaron para los genes de CaMV35S y T-NOS asegurando así la presencia de arroz genéticamente modificado, ya que ambas secuencias controlan la expresión de genes exógenos en especies vegetales y por ello se utilizan para producir muchos de los OGM que se encuentran actualmente en el mercado. Cabe mencionar que de todos los productos analizados, solo uno presentaba la etiqueta de “libre de transgénicos”.

Palabras clave: arroz, genéticamente modificado, transgénico, PCR, CaMV35S, T-NOS

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa*) es una de las cosechas más importantes en el mundo y es el alimento básico de más de la mitad de la población mundial (Chen et al., 2009). En México, el arroz ocupa el cuarto lugar de los granos alimenticios (después del maíz, trigo y frijol) que se destinan a la alimentación humana; proporcionando en promedio 15 % de las calorías de la dieta de los mexicanos (SAGARPA, 2010a).

Sin embargo, la producción de arroz se enfrenta a serios desafíos debido a una población mundial creciente, disminuyendo la disponibilidad de la tierra arable, además del daño severo ocasionado por parásitos y enfermedades, el empleo extenso de fertilizantes químicos, así como la escasez de agua y la frecuente presencia de sequía (Chen et al., 2009). Es por ello que los métodos tradicionales de cultivo de arroz han tenido que ser complementados mediante Biotecnología moderna para superar estos retos, a esto se le conoce como Tecnología Genética, que es cualquier técnica para la modificación o transferencia de genes de un organismo a otro (microbios, plantas, animales) para otorgarle características deseables, dicha modificación puede incluir el intercambio de un gen, cambio en la secuencia, o la transferencia de genes entre organismos, conocida ésta última como tecnología del ADN recombinante (Upadhyaya et al., 2000).

En éste ámbito, la transformación genética del arroz ha tenido una gran aceptación desde la producción del primer arroz transgénico reportado en 1988 (Song et al., 2011) pues ahora es considerada como rutina en muchos laboratorios de todo el mundo. Las técnicas de transferencia de genes tales electroporación de protoplastos, biobalística y la transformación mediada por *Agrobacterium* son los métodos más ampliamente utilizados para la introducción de genes extraños en el arroz (Giri y Laxmi, 2000).

Actualmente, sólo pocas variedades de arroz transgénico han sido aprobadas para el cultivo comercial, tales como los eventos: LLRICE 62, LLRICE 06 y LLRICE 601 en Estados Unidos y LLRICE 62 en la Unión Europea (Song et al., 2011). Si se considera que el 90 % de las importaciones de arroz provienen de EUA, existe una alta posibilidad de que el arroz genéticamente modificado esté presente en el mercado mexicano, donde está prohibida la comercialización de cualquier evento transgénico de arroz (Schoel et al., 2007).

En la Lista de Evaluación de Inocuidad caso por caso de los Organismos Genéticamente Modificados según la COFEPRIS se encuentra que para la especie de Arroz (*Oryza sativa*) solo ha sido aprobada, desde marzo del 2007 a cargo de la empresa Bayer de México S.A de C.V una sola especie tolerante al herbicida glufosinato de amonio (evento Liberty Link LL62) con la introducción del gen *bar* mediante el uso de CaMV35S como promotor (COFEPRIS, 2012).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica *in vitro* utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN basada en la síntesis de millones de copias de un fragmento específico determinado por el apareamiento de dos moléculas cebadoras sintéticas o “primers” con la molécula de ADN original , dicho procedimiento se ha hecho indispensable para identificar especies genéticamente modificadas teniendo así conocimiento de la presencia de genes extraños para poder identificar y reportar las irregularidades en la producción y comercialización de diversos alimentos (Somma y Querci, 2007).

CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES

1.1 Generalidades del arroz

Los cultivos de cereales constituyen más del 60 % de la producción agrícola mundial, en este sentido el arroz es uno de los cultivos comestibles más importantes en el mundo junto con el maíz, el trigo y el frijol, por su parte, el arroz es el alimento básico de más de la mitad de la población mundial, ya que aproximadamente 1/3 de ésta depende de dicho cereal al proporcionar a la dieta poco más del 50 % de la ingesta calórica diaria. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) considera al arroz como un sistema de seguridad alimentaria que mitiga la pobreza y mejorar el sustento, ya que los sistemas de producción basados en el arroz y las actividades posteriores a su cosecha, emplean cerca de mil millones de personas de las zonas rurales de los países emergentes; alrededor del 80% del cereal mundial es cultivado por pequeños productores en países de escasos ingresos. Existen miles de variedades o cultivos de arroz en el mundo debido a que éste se ha diversificado notablemente desde el punto de vista de la genética, morfología y propiedades (Goff et al., 2005; Ohtsubo y Nakamura 2007; SAGARPA, 2010a).

1.1.1 Origen e historia

El arroz es uno de los cultivos más antiguos, actualmente no es posible determinar el lugar preciso de su domesticación pero probablemente ocurrió en India o China ya que el cultivo de este cereal en Asia posee referencias prehistóricas (Ross, 2005). Se cree que los orígenes del arroz datan de hace 10 mil años, creciendo de manera silvestre en diversas regiones de Asia debido a sus terrenos húmedos, años más tarde el arroz fue llevado cerca del mar Mediterráneo y a Europa, se debe a los Moros la introducción de dicho cereal a España durante la conquista de la península Ibérica (año 700 d.C). En la época conocida como de los “grandes descubrimientos” se llevó a todos los continentes y fue hasta el siglo XVII cuando el arroz fue traído a América por los españoles. Actualmente, la producción mundial de arroz se concentra en Asia, en donde China, India, Pakistán, Indonesia, Bangladesh y Vietnam se han constituido como los principales productores, sin embargo es un cultivo que se siembra en todo el mundo constituyendo la base alimenticia de la población (SAGARPA, 2010b).

Hoy en día las variedades que se cultivan en la mayoría de los países pertenecen al tipo *Oryza*, que cuenta con diversas especies, de las cuales solamente dos presentan un interés agrícola para los productores.

- *Oryza sativa*: Arroz común asiático que se caracteriza por su plasticidad y su cualidad gustativa, presente en la mayoría de los países, originario del Extremo Oriente al pie del Himalaya, en China predomina la subespecie *O. sativa japonica* (granos medianos y pequeños) mientras que en la India la subespecie *O. sativa indica* (granos alargados, delgados y planos) es la más consumida.
- *Oryza glaberrima*: Especie anual originaria de África Occidental, que abarca una vasta zona localizada entre Nigeria y Senegal (CONAPAMEX, 2013).

1.1.2 Descripción taxonómica y morfológica del arroz (*Oryza sativa*)

El arroz es una planta angiosperma monocotiledónea anual que pertenece a la familia de las gramíneas o poáceas (Poaceae), a la sub-familia de las Panicoideas y a la tribu Oryzae, su nombre científico es *Oryza sativa* (indicando el género y la especie respectivamente). El número de cromosomas de la especie *O. sativa* es de 12, el genoma del arroz está totalmente descifrado ya que dentro de las gramíneas es uno de los menos complicados, pues su genoma está constituido por 50 mil genes, sumando unos 430 millones de pares de bases (pb) de ácido desoxirribonucleico (ADN) (SAG, 2003; Vallardes, 2010).

Morfológicamente, es una planta de gran talla que crece con mayor facilidad en los climas tropicales, inicialmente el arroz era una planta cultivada en seco pero actualmente es semi-acuática, en general puede crecer en medios bastante diversos aunque crecerá más rápidamente en un medio caliente y húmedo. Esta planta posee tallos muy ramificados y puede medir entre 0.6 y 1.8 metros de altura, dichos tallos terminan en una inflorescencia o panícula de 20 a 30 cm de largo, cada panícula se compone de entre 50 y 300 flores o espiguillas, a partir de las cuales se formarán los granos (CONAPAMEX, 2013).

Las partes de la planta del arroz, representadas en la Figura 1 se clasifican en 2 grupos:

- 1) Órganos vegetativos: Raíz, tallo y hoja
- 2) Órganos reproductivos: Flor y semilla

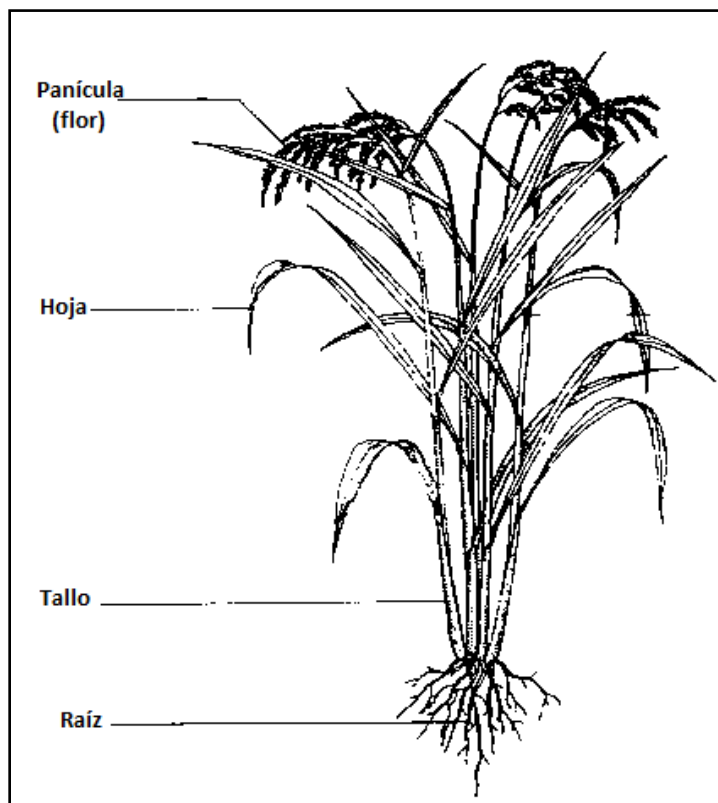


Figura 1. Partes de la planta de arroz. Fuente: FAO, 2013

- **Raíz:** Las raíces son delgadas, fibrosas y ramificadas. Posee dos tipos: seminales (temporales) que son poco ramificadas y se pierden tras la germinación y las adventicias secundarias, que tienen una libre ramificación y sustituyen a las raíces seminales.
- **Tallo:** Se forma de nudos y entrenudos, es erguido, cilíndrico y mide de 60 – 120 cm de altura dependiendo de la variedad y las condiciones del clima.
- **Hoja:** Se encuentran distribuidas en forma alterna a lo largo del tallo, en cada nudo se forma una hoja, de donde se distinguen las siguientes partes: vaina, cuello y lámina.
- **Flor:** Es de color verde blanquecino, dispuesta en espiguillas; cuyo conjunto constituye una panícula grande terminal y colgante a medida que se llena el grano. La flor consta de 6 estambres y un pistilo, los estambres son filamentos delgados que sostienen las antenas que contienen los granos de polen.
- **Semilla (grano):** La semilla de arroz es un ovario maduro, seco y no es capaz de abrirse espontáneamente (CIAT, 2005).

1.1.2.1 Estructura y clasificación del grano de arroz

La Figura 2 muestra las partes del grano de arroz, constituido por una cubierta protectora exterior; la cáscara o casco, compuesta a su vez por la lema y la pálea (segmento interior de la cáscara) y la carióspside o fruto de arroz. Cuando se quita la cáscara se convierte en arroz integral o marrón, formado por el pericarpio, tegumento o cubierta seminal y nucela; por el germen o embrión; y por el endospermo, este último se compone aleurona, subaleurona y endospermo amiláceo interior. La capa de aleurona contiene al embrión, que es la parte reproductiva del arroz, ésta es removida a fin de obtener el arroz blanco. Las células del endospermo son de pared delgada y están envueltas en amiloplastos que contienen gránulos de almidón compuesto, las 2 capas de células exteriores abundan en proteínas y lípidos (IRRI, 1994).

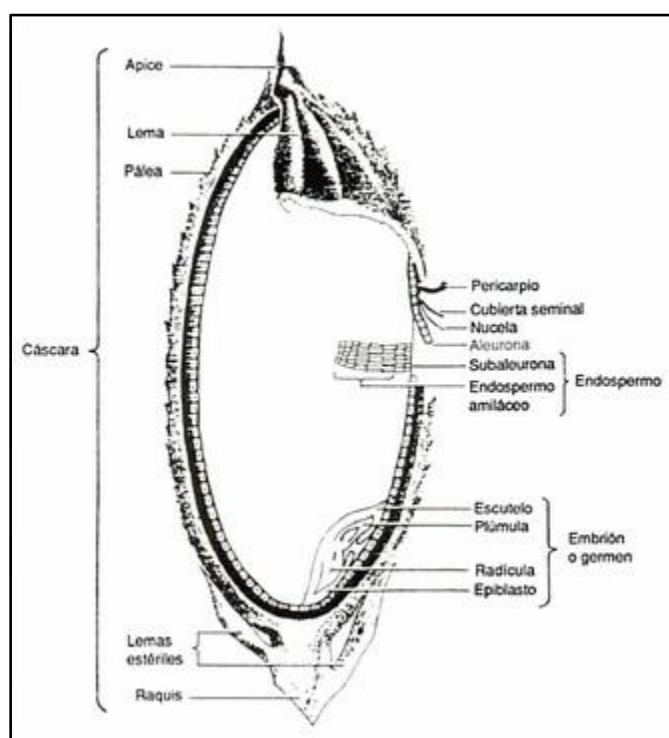


Figura 2. Partes del grano de arroz. Fuente: IRRI, 1994

En los cultivos existen tres tipos de arroz: el arroz de grano largo, que es 3 veces más largo que ancho (superior a 6 mm); es ligero y se separa fácilmente, el arroz de grano medio que es entre 2 y 3 veces más largo que ancho (5-6 mm), más corto y más inflado que el arroz de

grano largo y el arroz de grano corto o redondo que es casi tan largo como ancho (entre 4-5 mm de largo y 2.5 mm de espesor) (CONAPAMEX, 2013).

1.1.3 Valor nutricional

Una de las cuestiones más importantes en el consumo de cualquier alimento es la cantidad de nutrientes que éste proporcionará al ser humano; en la Tabla 1 se muestra el valor nutricional en gramos (g) de componente por cada 100 gramos de muestra, tanto del arroz integral como del arroz blanco.

Tabla 1. Composición química del arroz por 100 g de muestra

	Arroz integral (g)	Arroz blanco (g)
Agua	12	15.5
Proteínas	7.5	6.2
Grasa	1.9	0.8
Carbohidratos	77.4	76.9
Fibra	0.9	0.3
Cenizas	1.2	0.6
Calcio	32 mg	6 mg
Fósforo	221 mg	150mg
Hierro	1.6 mg	0.4 mg
Sodio	9 mg	2 mg
Potasio	214 mg	-
Vitamina B1 (Tiamina)	0.34 mg	0.09 mg
Vitamina B2 (Riboflavina)	0.05 mg	0.03 mg
Niacina (Ácido nicotínico)	4.7 mg	1.4 mg
Calorías	360	351

Fuente: CONAPAMEX, 2013

1.1.4 Distribución geográfica mundial del arroz

En el contexto mundial los granos básicos o de consumo directo (maíz, frijol, trigo y arroz) representan una de las principales fuentes nutricionales en la dieta humana, sobre todo para los asiáticos, africanos y latinoamericanos, cuyo consumo de carbohidratos llega a representar hasta el 80% del total en algunos países, por lo que la demanda de granos se relaciona directamente con el crecimiento poblacional, urbanización y cambios en el ingreso. La producción mundial de arroz desde el 2012 se ha mantenido estable si se compara con la de los años anteriores y ha tenido un crecimiento desde el 2007. En el

mundo cada habitante consume en promedio 65 kg de arroz blanco al año por lo que este cultivo se ubica como uno de los de mayor consumo a nivel internacional (Catón, 2013).

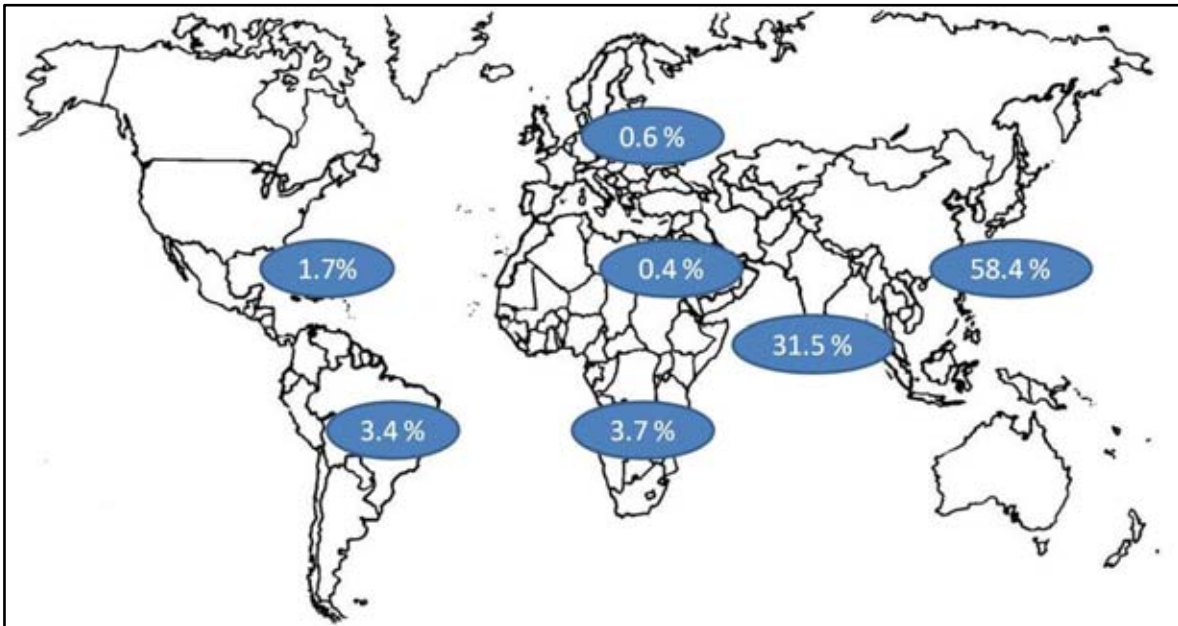


Figura 3. Producción mundial de arroz. Fuente: Catón, 2013

La producción de arroz se muestra en la Figura 3, ésta se centra en Asia principalmente en China (58.43%), una menor producción en la India se compensa con una mayor producción en China seguido de África y finalmente América, en donde entre México y EU ocupan el 1.7 % (Catón, 2013).

De acuerdo a Catón (2013) la demanda de arroz presenta un crecimiento sostenido como se aprecia en la Figura 4, al ser uno de los cereales mas consumidos en el mundo, la producción de éste ya no es suficiente para satisfacer las necesidades internas de cada país, dando como resultado que se consume más de lo que se está produciendo; por lo mismo la existencia de dicho cereal ha disminuido drásticamente en los últimos años teniendo como consecuencia que ya no haya exportación, pues todo el arroz es consumido internamente.

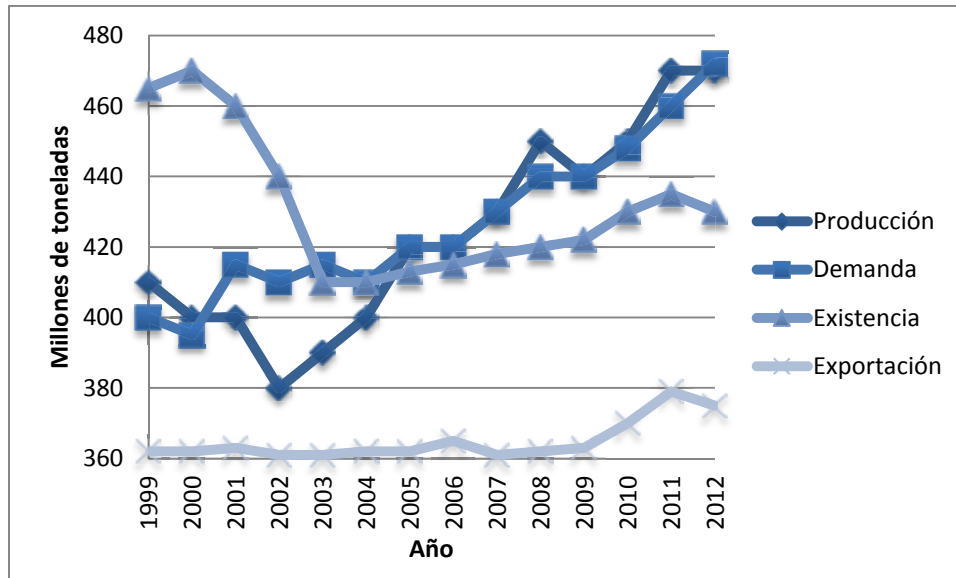


Figura 4. Comparación de la existencia de arroz blanco en el mundo respecto a su oferta, demanda y exportación. Fuente: Catón, 2013

1.1.4.1 Importancia del cultivo a nivel nacional

Para el caso específico de México, el arroz es uno de los alimentos considerados dentro de la dieta básica del pueblo mexicano, esto después del maíz, frijol y trigo, estimándose un consumo per cápita de 6 kg al año. Existen tres tipos de arroz que se consumen nacionalmente: el tipo Sinaloa, el Milagro Filipino y el tipo Morelos, siendo el primero el más barato en el mercado (AgroBioMéxico, 2013).

México ocupa el lugar 53 en la producción de cultivo de arroz, generando 224,371 toneladas anualmente, lo que equivale al 0.1% de la producción mundial, las principales zonas productoras de arroz se localizan principalmente en el Noreste (Sinaloa), Sureste (Campeche, Tabasco y Veracruz) y Centro (Michoacán y Morelos) (SAGARPA, 2009).

En la Figura 5 se muestra la superficie sembrada y cosechada de arroz en México, habiendo una disminución en los últimos años manteniéndose casi constante, es por ello el lugar que se ocupa en el mundo en cuanto a producción de arroz.

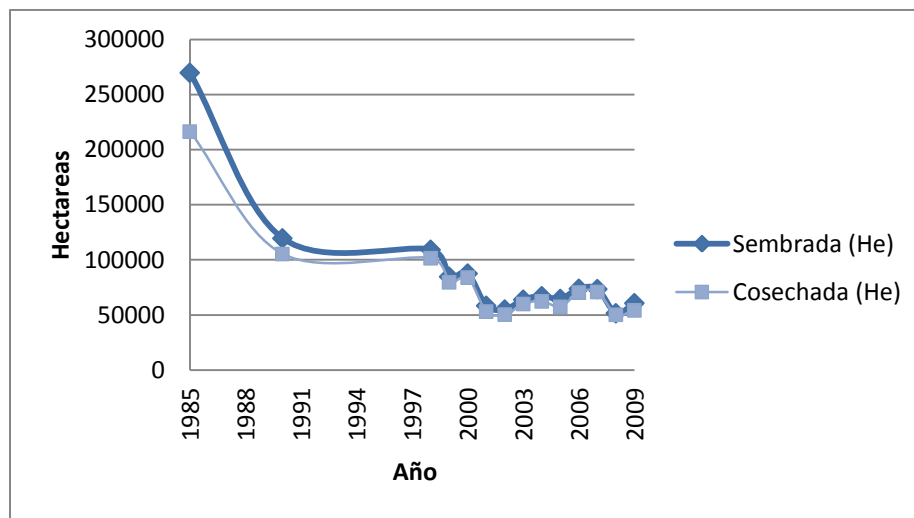


Figura 5. Superficie sembrada y cosechada de arroz en México. Fuente: CONAPAMEX, 2013

1.1.5 Productos derivados de arroz

El proceso de transformación de arroz palay a pulido ocurre a través de una serie de etapas bien definidas. Para que el arroz palay sea recibido en las plantas procesadoras debe cubrir un cierto número de lineamientos establecidos en la norma NMX-FF-059-SCFI-2000, la cual establece que el arroz deberá estar limpio, sano, libre de plagas y contaminación, así como de putrefacción o mal olor, el contenido de humedad no deberá rebasar un máximo de 24%, el porcentaje de impurezas aceptado no deberá ser mayor al 2%. La utilización del cultivo del arroz ya industrializado depende de los diferentes productos que se obtengan durante el proceso de pulimiento.

La demanda derivada del cultivo de arroz se presenta en cinco tipos de industrias, la más importante es la del beneficio de arroz que comprende establecimientos dedicados al descascarado, limpieza, pulido, blanqueado y selección de arroz, esta industria representa el 83% de la demanda total, con cifras menores; que representan entre el 3% y el 5% se encuentra el beneficio de otros productos agrícolas que incluye establecimientos que a través de procesos como selección, secado, descascarado, limpieza, lavado y pulido, entre otros benefician cereales, frutas y leguminosas, la elaboración de botanas y productos de arroz que se dedican a la limpieza, descascarado, selección, tostado, fritura, sazonado de granos y semillas; molienda, amasado, laminado, troquelado, rebanado, condimentado;

texturizado e insuflación, entre otros, elaboran y envasan cereales para el desayuno, botanas y frituras, la industria de la cerveza y la malta y finalmente la preparación y mezcla de alimentos para animales (SAGARPA, 2009).

1.2 Organismos Genéticamente Modificados (OGM)

La Biotecnología es una actividad multidisciplinaria sustentada en el conocimiento de disciplinas más tradicionales como la Microbiología, la Genética, la Bioquímica, la Ingeniería Bioquímica y de algunas más recientes como la Genómica y la Bioinformática. Con el uso de estas disciplinas, la Biotecnología ha ayudado a satisfacer demandas en la solución de problemas relevantes en diversos sectores como el de la salud, el agropecuario, el industrial y el del medio ambiente (Bolívar, 2012).

La Tecnología Genética, como todo lo que se refiere a la Biotecnología, utiliza organismos vivos para hacer productos o materiales mediante la modificación o transferencia de genes de un organismo a otro (estos pueden ser bacterias, plantas o animales) a fin de otorgarle características deseables para tener nuevos y variados alimentos así como eficiencia en ingredientes y aditivos, la modificación puede incluir el intercambio de un gen, cambio en la secuencia o la transferencia de genes, a esto se le conoce como tecnología del ADN recombinante (Upadhyaya et al., 2000).

Los genes son segmentos de ADN, material genético de todos los seres vivos, con estos genes es posible construir Organismos Genéticamente Modificados (OGM) con el propósito de desarrollar mejores sistemas biológicos y tecnología biológica respetuosa del medio ambiente para la producción de medicamentos, alimentos y para la misma protección de nuestro hábitat (Bolívar, 2012).

Legalmente un OGM se define como un derivado de especies que han adquirido una combinación genética novedosa por técnicas de Biotecnología moderna, las cuales son procedimientos distintos a la reproducción y selección tradicional, los OGM son variedades de especies conocidas a las que se les ha conferido alguna capacidad funcional (detectable, heredable e intencionalmente útil) por tecnologías de Ingeniería Genética a

partir de la incorporación de genes de especies distantes o cercanas. Se utilizan técnicas de Ingeniería Genética para mejorar el cultivo a fin de agregar a las plantas nuevas propiedades agronómicas, a las semillas de estos cultivos mejoradas genéticamente se les conoce como semillas transgénicas o biotecnológicas (AgroBioMéxico, 2013).

1.2.1 Arroz transgénico

Los factores bióticos y abióticos limitan la productividad de las áreas de cultivo de arroz en el mundo pues se estima que miles de toneladas de arroz se pierden cada año debido a plagas, patógenos, uso de fertilizantes químicos, salinidad y sequía, es por ello la producción de arroz se enfrenta a muchos retos ya que además la población está en constante aumento, disminuyéndose así la tierra arable, en consecuencia los métodos convencionales de cultivo han tenido que ser complementados con avances recientes en Biotecnología para superar éstos retos, por ejemplo, gracias a la Ingeniería Genética al menos 50 cultivos de arroz, sobre todo de las especies japónica y algunas variedades de índica han sido transformadas a fin de disminuir las pérdidas provocadas por dichas causas; pues desde la primera producción exitosa de arroz transgénico en 1988, al menos 36 promotores, 4 marcadores selectos y 4 genes han sido introducidos en el arroz a través de diversos métodos biológicos, físicos y fisicoquímicos (Giri y Laxmi, 2000; Song et al., 2011; Upadhyaya et al., 2000).

El arroz transgénico es una herramienta ideal para conocer la expresión y regulación de genes, especialmente de otros monocotiledones que no son tan fácilmente manipulados genéticamente como el arroz, pues al tener uno de los genomas más pequeños entre los cereales se ha convertido en objeto de estudio del genoma, incluyendo la secuenciación de éste, la facilidad con la que puede ser transformado convierte al arroz en un modelo para muchos otros estudios en el campo de los cereales (Goff et al., 2005; Upadhyaya et al., 2000).

1.2.1.1 Enzimas de restricción y plásmidos

El desarrollo de la Ingeniería Genética fue posible gracias al descubrimiento de las enzimas de restricción y de los plásmidos. Las enzimas de restricción, también llamadas endonucleasas de restricción, son proteínas bacterianas de acción catalítica que fragmentan

la molécula de ADN reconociendo secuencias específicas de nucleótidos, cortando en todos los puntos en donde se encuentre dicha secuencia, esto permite aislar un fragmento de ADN para insertarlo en otra molécula de ADN. Hay muchas enzimas de restricción obtenidas a partir de bacterias designadas con una secuencia de 3 o 4 letras seguidas por un número romano, por ejemplo: EcoR1 es una enzima aislada de la *Escherichia coli*. Se clasifican en 3 grupos (endonucleasas I II y III) pero la mayoría de las endonucleasas que se usan en Biología Molecular pertenecen al tipo II, cortando los enlaces forsofodiéster del ADN de doble cadena, sirviendo como herramientas para la ingeniería genética generando así nuevas moléculas denominadas recombinantes (Flores et al., 2009; Sánchez, 2008). La acción de las enzimas de restricción se muestra en la Figura 6.

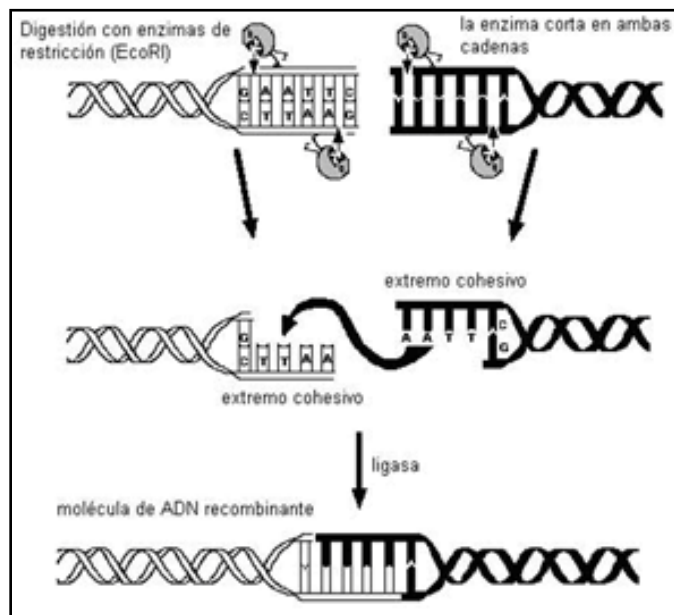


Figura 6. Construcción de una molécula de ADN recombinante. Fuente: ArgenBio, 2013

Los plásmidos, son moléculas de ADN circular y generalmente de tamaño pequeño que se encuentran en muchas especies bacterianas y se pueden replicar de manera independiente del ADN cromosómico, los plásmidos poseen un interés especial en la Ingeniería Genética por ser uno de los vectores más sencillos de usar, un vector de clonación es un sistema que permite introducir en una célula hospedera un fragmento de ADN que se puede clonar. Para seleccionar las células (bacterias, células animales o vegetales) que reciben el plásmido, éste lleva, además del gen de interés (por ejemplo el gen de la insulina humana),

un gen marcador de selección (por ejemplo de resistencia a un antibiótico), que le otorga a la célula que lo lleva la capacidad de sobrevivir en un medio de cultivo selectivo (medio con antibiótico, en este ejemplo). La estrategia básica consiste en utilizar la misma enzima de restricción para cortar tanto el fragmento de ADN que ha de amplificarse como para el plásmido que va a insertarse (Figura 7), así se forman 2 moléculas con extremos cohesivos compatibles y que por lo tanto pueden asociarse por complementariedad de las bases, luego mediante el uso de la enzima ADN ligasa los 2 tipos de moléculas se enlazan una con otra (Flores et al., 2009; Sánchez, 2008).

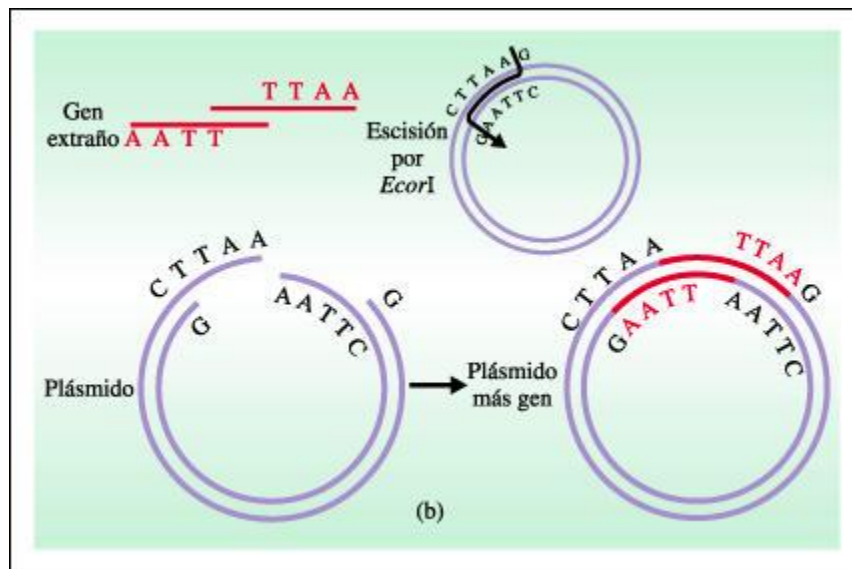


Figura 7. Plásmido recombinante usando EcoRI. Fuente: Sánchez, 2008

1.2.1.2 Promotores y terminadores

El gen que se busca insertar para obtener un alimento genéticamente modificado puede ser de cualquier origen, pero siempre debe ir acompañado de elementos que permitan su correcta expresión, es decir, que pueda obtenerse la proteína a partir del gen y por lo tanto, la característica deseada, por ello los vectores construidos para la transformación de plantas contienen secuencias de ADN que son insertadas en el organismo receptor, esto incluye un promotor y un terminador que permitan a la planta expresar el gen. Los promotores y terminadores son secuencias muy bien caracterizadas y provienen de genes vegetales (plantas o virus y bacterias que infectan plantas), la correcta expresión depende

del promotor que es utilizado y esto es fundamental para una transformación exitosa (ArgenBio, 2013; Holden y Levine, 2010).

Un ejemplo de promotor es el Virus del Mosaico de la Coliflor (mejor conocido como CaMV por sus siglas en inglés “Cauliflower Mosaic Virus”), el CaMV es un virus de doble cadena de ADN que afecta plantas principalmente crucíferas y solanáceas, el promotor 35S de CaMV ha sido incorporado en numerosas ocasiones para producir muchos de los Organismos Genéticamente Modificados que están hoy en día en el mercado, como maíz, soya, canola y papaya (Holden y Levine, 2010).

El CaMV35S ha sido ampliamente usado para insertar genes tales como el *hph* (resistencia a la higromicina), gen *bar* (resistencia a herbicida) y *nptII* (resistencia a la kanamicina) en el arroz. La actividad del promotor CaMV35S en el arroz es generalmente baja pero lo suficientemente adecuada para que el gen se exprese y para conferir a las células transformadas la resistencia suficiente para los agentes selectivos. La mayoría de los promotores y reguladores usados en los monocotiledones fueron estudiados primero en el arroz transgénico (Upadhyaya et al., 2000).

De manera similar la secuencia del gen de la Nopalina Sintetasa (T-NOS), de *Agrobacterium tumefaciens* que indica el final de la transcripción, ha servido para la transformación genética de diversas plantas, por ello el número de eventos evaluados para conocer la presencia de transgenes se basan en la identificación de CaMV35S y T-NOS como promotor y terminador respectivamente, ya sea que contengan alguno de ellos o incluso los 2 (Holden y Levine, 2010).

Un ejemplo de esto es el arroz tolerante a herbicida desarrollado en China; transfiriendo al genoma de una variedad de arroz convencional el plásmido que contiene el gen *bar*, mediante el uso de las enzimas de restricción HindIII y EcoR1, la estructura del plásmido se observa en la Figura 8.



Figura 8. Estructura del gen *bar* en un plásmido. Fuente: Song et al., 2011

1.2.2 Métodos para la transformación genética del arroz

Para poder introducir información genética mediante la tecnología del ADN recombinante se requiere que se cumpla con los siguientes 2 requisitos:

- a) Disponer de un método para la regeneración *in vitro* de la especie de interés.
- b) Contar con un método de transformación eficiente para la misma.

Puesto que las técnicas de cultivo de tejidos hacen posible que a partir de cualquier célula o tejido se puedan regenerar plantas completas, su uso resulta indispensable para la generación de organismos transgénicos que contengan la nueva información genética. En cuanto a la transformación se refiere, es necesario contar con un método que permita tanto la introducción del material genético que se pretende incorporar como su integración estable, funcional y heredable en el genoma vegetal (Muñoz, 2004).

Las plantas transgénicas que se han logrado obtener a la fecha provienen del uso de diversos métodos de transformación genética, entre ellos se tiene un método biológico y por lo tanto natural basado en el empleo de una bacteria que vive en todos los suelos del mundo llamada *Agrobacterium tumefaciens*, debido a que inicialmente se pensó que el sistema basado en *Agrobacterium* sólo se podía aplicar a un número limitado de especies vegetales (se creía que era incapaz de infectar monocotiledóneas como arroz, trigo y maíz) surgió la necesidad de desarrollar métodos de transformación genética alternativa, entre estos métodos alternativos se pueden mencionar protocolos fisicoquímicos de transformación directa como la electroporación de protoplastos y los tratamientos con polietilenglicol (PEG) y cloruro de calcio así como métodos físicos como el bombardeo con micro partículas recubiertas de ADN. Para el caso específico de la transformación genética del

arroz se han usado principalmente métodos como: infección con *Agrobacterium*, biobalística y electroporación (Muñoz, 2004; Upadhyaya et al., 2000).

1.2.2.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens y sus especies relacionadas como *Agrobacterium rhizogenes* y *Agrobacterium vitis* son patógenos reconocidos de plantas y tienen la capacidad de integrar parte de su material genético dentro del genoma de su hospedero, *A. tumefaciens* induce la formación de tumores en plantas, durante el proceso de infección introduce en la célula vegetal una parte de su ADN (ADN de transferencia o ADN-T) el cual es integrado dentro del genoma de la planta. Los genes de ADN-T son expresados formando tumores y la síntesis de aminoácidos (opinas), los cuales son aprovechados por la bacteria. El ADN-T está localizado en el plásmido Ti (del inglés “tumor- inducing”) que además contiene los genes *vir* que son necesarios para la transferencia e incorporación del fragmento de ADN en el genoma de la planta. Las monocotiledóneas no son generalmente susceptibles a *A. tumefaciens* aunque se ha logrado la transferencia de genes a especies como el arroz y el maíz (Chen et al., 2009; Milena et al., 2005).

En la Figura 9 se representa como el gen de interés es clonado en el plásmido Ti de la bacteria obteniéndose un plásmido recombinante (1), posteriormente el nuevo gen es insertado en el genoma de células vegetales mediante infección por *Agrobacterium* (2) y finalmente se tiene la regeneración de una planta transgénica a partir de una célula transformada (3).

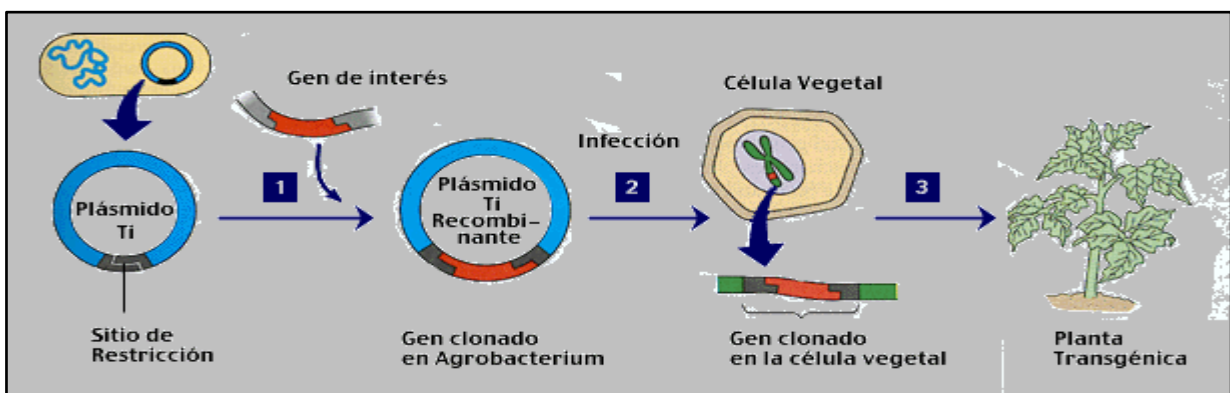


Figura 9. Transformación de plantas por infección con *Agrobacterium tumefaciens*.

Fuente: Milena et al., 2005

Algunos o todos los genes bacterianos del ADN-T pueden ser removidos originando vectores desarmados, los cuales pueden transformar células vegetales sin los síntomas generales de la infección bacteriana, por lo tanto no es patógena ya que no segrega ninguna toxina. El plásmido Ti es un vector que se inserta en las células vegetales mediante enzimas de restricción y ligasas (Milena et al., 2005).

El conocimiento de las bases moleculares por las cuales *A. tumefaciens* transfiere su ADN-T al genoma de la planta ha sido fundamental para el desarrollo de la Ingeniería Genética lográndose producir plantas transgénicas con características comerciales importantes como la resistencia a herbicidas, insectos y virus, control de la maduración de frutos, plantas con resistencia a condiciones adversas como desecación, alcalinidad, salinidad y frío (Milena et al., 2005).

1.2.2.2 Biobalística (bombardeo de partículas)

Además de las técnicas basadas en el uso de *Agrobacterium*, existen otro tipo de técnicas basadas en la utilización de tratamientos químicos, físicos y eléctricos para introducir ADN en las células. Estas técnicas son denominadas de transferencia directa de genes (DGT por su significado en inglés “Direct Gene Transfer”) (Carranza, 2012).

El bombardeo con micro partículas ó biobalística es el método alternativo al plásmido Ti más importante para transferir ADN a plantas, tal como se muestra en la Figura 10, se recubren partículas esféricas de oro o tungsteno (2) (aproximadamente de 0,4-1,2 μm de diámetro) con el ADN (1) que se desea insertar a la planta el cual ha sido previamente precipitado con CaCl, espermidina o PEG, (ya que en presencia de dichas sustancias queda adherido a las partículas por interacciones no covalentes) (3), posteriormente las partículas con ADN son aceleradas a altas velocidades (300-600 $\frac{\text{m}}{\text{s}}$) por el impulso de un chorro de aire comprimido (helio) sobre el tejido con un equipo especial llamado pistola de partículas o pistola de genes (4), las partículas penetran la pared celular y la membrana de la célula, el alcance de la penetración de las partículas en las células vegetales puede ser controlada variando la intensidad del estallido, alterando la distancia que las partículas han de atravesar para alcanzar la célula o utilizando partículas de diferentes tamaños. Una vez dentro del tejido vegetal el ADN se separa de las partículas debido a las modificaciones del

entorno iónico y en algunos casos, es integrado dentro del genoma de las plantas, ya que con ésta técnica se generan 2 tipos de células: las transformadas y las no transformadas dentro de un mismo órgano disminuyendo la eficacia del método, es por ello que se deja crecer en un medio de cultivo adecuado (5), donde las células transformadas son seleccionadas para el crecimiento de una planta transgénica (6) (Carranza, 2012; Sánchez, 2008; Zanettini, 2004).

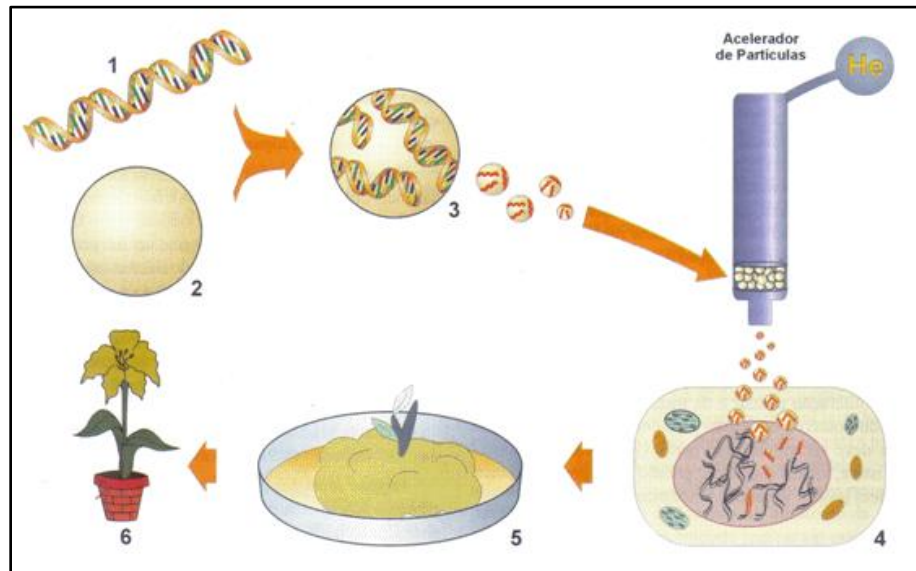


Figura 10. Transformación de plantas transgénicas por biobalística. Fuente: Zanettini, 2004

El bombardeo con micro partículas es considerado un mecanismo universal y ha sido utilizado con éxito para la producción de plantas transgénicas a partir de una gran variedad de tejidos vegetales ya que, por su naturaleza física, permite introducir ADN sin necesidad de vectores en cualquier tipo de tejido o célula, incluidas las monocotiledóneas y coníferas, que son menos susceptibles a la infección por *Agrobacterium*, los principales logros en la obtención de plantas transgénicas por medio de este método incluyen especies como soya, maíz, arroz, sorgo, papaya, caña de azúcar, trigo y espárrago (Carranza, 2012; Sánchez, 2008).

Sin embargo, esta metodología de transformación, tiene ciertas limitaciones, algunos tejidos oponen una resistencia natural a la penetración de las partículas dada por cutículas

endurecidas, paredes celulares lignificadas o superficies vellosas, sin embargo los principales limitantes del método continúan siendo la baja relación entre el total de células sometidas al bombardeo y el número de células que logran incorporar de manera permanente la información genética transferida (Carranza, 2012).

1.2.2.3 Protoplastos y electroporación

La incorporación y expresión de ADN mediante protoplastos fue el primer método de transferencia genética que se demostró que funcionaba en plantas, aplicándose ésta técnica a tejidos obtenidos a partir de las hojas de arroz, maíz, trigo y cebada, ésta se basa en el principio de que la pared celular es la principal barrera para llegar al ADN, así que puede ser temporalmente extraída; posteriormente distintos métodos simples pueden ser utilizados para la transferencia (Carranza, 2012; Rasco-Gaunt, 2000).

Un protoplasto se define como la parte de la célula vegetal que está delimitada e incluida dentro de la pared celular; y que puede ser aislada por eliminación mecánica o enzimática, es por lo tanto una célula rodeada solamente por su membrana plasmática capaz de regenerar la pared celular, crecer y dividirse, por ello los protoplastos se utilizan en el proceso de extracción de la pared celular mediante enzimas de restricción donde luego el gen que se ha de transferir se adiciona al medio de cultivo del protoplasto (Carranza, 2012).

La captación de ADN a los protoplastos aislados puede ser efectiva mediante distintos métodos químicos que desestabilizan la membrana celular permitiendo la entrada del ADN; como el uso de PEG en combinación con cationes divalentes como calcio o magnesio, o métodos físicos, como someter a pulsos eléctricos cortos y de alto voltaje los protoplastos suspendidos en un tampón de gran conductividad que contiene el ADN para así generar diminutos poros en la membrana por los cuales se va a permitir la entrada de moléculas presentes en la solución extracelular, a éste método se le denomina electroporación, los poros se crean en el componente lipídico de la membrana por lo que tras el tratamiento, ésta volverá a su estado normal. La electroporación es un método relativamente sencillo, aunque su aplicación a protoplastos es relativamente difícil como consecuencia de las limitaciones técnicas que supone el cultivo y la regeneración de protoplastos. La obtención

de plantas transformadas de forma estable a partir de tejidos sometidos a electroporación se consiguió por primera vez en arroz, a partir de semillas maduras pre-cultivadas poco después se consiguió en maíz, aunque esta vez a partir de embriones inmaduros (Carranza, 2012; Rasco-Gaunt, 2000; Sánchez, 2008;).

1.2.3 Transgenes de importancia agronómica

Las técnicas de Biotecnología moderna discutidas anteriormente han contribuido al mejoramiento agronómico del arroz superando muchas de las limitaciones que suponía el cultivo tradicional, la manipulación genética de las plantas permite el acceso a una cantidad ilimitada de genes que pueden expresarse entre 2 especies independientemente de su taxonomía y evolución, es por ello que se han podido generar nuevas variedades de arroz con importancia agronómica resistentes a herbicidas, pestes e insectos, así como tolerancia al “stress” ambiental y mejora en su calidad nutricional. La transformación genética del arroz permite que todas las variedades ya existentes puedan presentar una mejora por lo que ya es una rutina en muchos laboratorios alrededor del mundo (Giri y Laxmi, 2000).

1.2.3.1 Resistencia a herbicidas

El arroz transgénico resistente a herbicidas tiene un lugar muy importante en el cultivo de éste cereal, los genes que le confieren dicha resistencia inicialmente se utilizaban solo como marcadores selectos pero posteriormente se descubrió que tenían ciertas funciones que brindaban protección a la planta contra ciertos microbios (Giri y Laxmi, 2000).

De manera comercial cultivos de la especie *índica* han sido transformados usando el tratamiento de protoplastos con PEG, también se han construido 2 plásmidos que utilizan como promotor CaMV35S, uno que contiene el gen *hph* que confiere resistencia a la higromicina; un antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces hygrosopicus* que inhibe la síntesis proteica, y otro con el gen *bar* que confiere resistencia al herbicida que contiene fosfinitocina (PTP), éste último en el mercado se vende bajo los nombres de BASTA, Buster o Liberty. También se ha utilizado la biobalística para expresar el gen *bar* que confiere resistencia al glufosinato, otro importante herbicida (Giri y Laxmi, 2000; Upadhyaya et al., 2000).

1.2.3.2 Resistencia a insectos

La resistencia a insectos es un factor biótico y así como sucede con otros cereales, el control convencional de insectos en el cultivo de arroz depende del uso de insecticidas químicos, lo que genera preocupación acerca de la contaminación ambiental y la seguridad alimentaria que ello genera. Mediante el aislamiento de los genes que confieren resistencia a insectos ha sido posible que las plantas de arroz expresen dichos genes (Giri y Laxmi, 2000; Upadhyaya et al., 2000).

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria que habita en el suelo y se encuentra de manera natural en el intestino de las orugas de diferentes tipos de polillas y mariposas, ésta produce durante su esporulación cristales proteicos (proteínas Cry) o δ -endotoxinas que actúan contra insectos lepidópteros (mariposas, polillas), dípteros (moscas y mosquitos), escarabajos, chinches y gusanos (nematodos) codificados por el gen *Cry*, es por eso que una variedad de arroz resistente a insectos fue producido transfiriendo dicho gen, se ha demostrado en estudios de laboratorio que las plantas transgénicas producen la cantidad suficiente de proteína Bt (0.01-0.1%) para generar protección completa contra infestación de insectos, principalmente los comedores de hojas (“stem borer”) (Giri y Laxmi, 2000).

Un gran número de plantas transgénicas con diferentes niveles de la proteína Bt han sido obtenidas demostrando el 100 % de mortalidad contra la larva del comedor de hojas amarillas, aunque en general la toxina del gen Bt provee resistencia a la mayoría de las plagas de insectos en el arroz, las plantas de arroz que contienen los genes *CryIA(a)*, *CryIA(b)* y otros genes modificados de *Cry* han sido producidas usando tratamiento con protoplastos y biobalística, aunque para la inserción de los mismos genes se ha utilizado también la infección por *Agrobacterium* (Figura 11), utilizando CaMV35S como promotor (Giri y Laxmi, 2000; Upadhyaya et al., 2000).

Algunas otras alternativas para conferir resistencia a insectos son mediante genes que codifican para inhibidores de proteasa, inhibidores de α -amilasa y lecitinas esto es porque los insectos usan muchas enzimas hidrolíticas y proteolíticas como quimi tripsina o tripsina para la digestión de proteínas y otros componentes alimenticios, siendo sistemas de defensa naturales contra insectos (Upadhyaya et al., 2000).

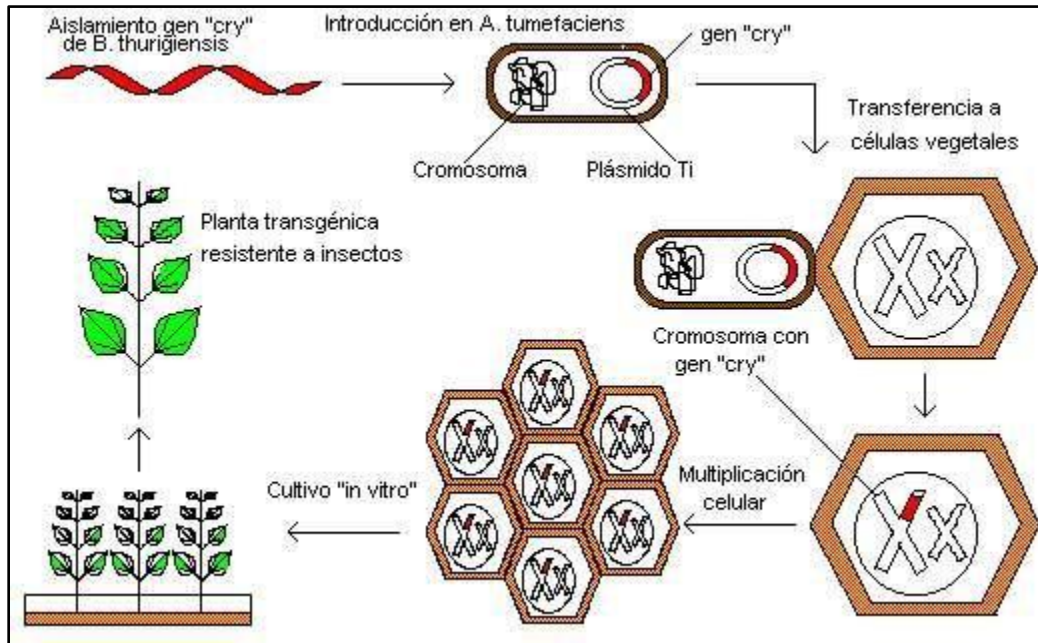


Figura 11. Planta transgénica resistente a insectos mediante *A. tumefaciens*. Fuente: Sánchez, 2008

1.2.3.3 Resistencia a virus, bacterias y hongos

Más de 11 tipos de virus han sido encontrados en el arroz al ser éste uno de sus principales hospederos, se observó que la protección contra virus se podía lograr transfiriendo los genes proteicos de superficie CP (por su significado en inglés “Coat Protein”) de los virus patógenos a las plantas, un ejemplo de esto es el arroz resistente a insectos transmitido por el virus de la hoja blanca (RSV por sus siglas en inglés “Rice Stripe Virus”), este virus causa un daño severo a los cultivos sobre todo en la regiones tropicales, por lo que la introducción mediante electroporación del gen CP a RSV en 2 variedades de arroz de la especie japónica presentó un nivel de resistencia significativa contra la infección causada por el RSV, esto es porque los genes del genoma del patógeno pueden expresarse de manera inapropiada en su hospedero, interrumpiendo así el ciclo de infección (Giri y Laxmi, 2000; Upadhyaya et al., 2000).

Por otro lado, las enfermedades sobre los cultivos de arroz causadas por bacterias como la *Xanthomonas oryzae* también tienen un efecto devastador sobre los campos, el gen del arroz *Xa21* que confiere resistencia a los patógenos causantes de plagas ha sido ya clonado y usado como un transgén de resistencia introducido a cultivos de arroz sobre todo de la

especie indica, con el conocimiento de los genes que confieren la resistencia a las bacterias es posible transferir éstos genes a cultivos de especies agronómicas susceptibles (Upadhyaya et al., 2000).

En cuanto a la resistencia a hongos, muchos genes relacionados con la resistencia fúngica también han sido introducidos al arroz, como el gene *Chi11* de la quitinasa, que bajo el control del promotor CaMV35S mostró ser resistente a *Rizhoctonia solani*, un hongo que causa la podredumbre de diversos cereales, el herbicida Biolaphos presenta propiedades anti fúngicas, demostrando que las plantas de arroz transgénico que expresaban el gen *bar* eran también resistentes a *R. solani* cuando se aplicaba este herbicida (Upadhyaya et al, 2000).

1.2.3.4 Tolerancia a factores abióticos

El “stress” ambiental como sequía, salinidad y temperaturas extremas son algunos de los principales factores abióticos que limitan la productividad de los cultivos de las plantas de arroz, pese a que éstas desarrollan diferentes estrategias fisicoquímicas y bioquímicas para adaptarse o tolerar las condiciones adversas a las que están expuestas. La tolerancia de las plantas a los factores ambientales se caracterizan por la acumulación de osmolitos (moléculas capaces de retener agua) de bajo peso molecular; como alcoholes, aminoácidos especiales y glicina betaína como mecanismos de adaptación. La manipulación genética para la acumulación de dichas sustancias de bajo peso molecular, ha mejorado la tolerancia a situaciones de alta salinidad en el arroz, además de los cambios metabólicos en la acumulación de los osmolitos que permiten que los genes de las plantas se activen para acumular nuevas proteínas en el tejido vegetal bajo condiciones de “stress” (Giri y Laxmi, 2000).

1.2.3.5 Otras aplicaciones

Gran parte de la población mundial se ve afectada por malnutrición relacionada con una ingesta baja de calorías sobre todo en los países subdesarrollados se sufre una gran variedad de problemas de salud derivados de la deficiencia de aminoácidos, vitamina A y hierro en cereales y legumbres (Giri y Laxmi, 2000).

Algunos de los aspectos nutricionales que se han conseguido con el uso de transgénicos son el incremento de vitaminas y contenido de hierro, la mejora en el transporte de nutrientes, incremento de los aminoácidos esenciales, reducción de alérgenos así como del contenido de amilosa. Por ejemplo se ha obtenido éxito en la ingeniería de la ruta biosintética de carotenoides en el endospermo del arroz para incrementar la provitamina A (β -caroteno) resultando el desarrollo del arroz dorado o amarillo, esto se logró mediante la infección por *Agrobacterium*, siendo uno de los mejores ejemplos del poder de la tecnología de los transgénicos, aplicado a la ingeniería de las rutas metabólicas, además de que conlleva a implicaciones sociales para la resolución de uno de los problemas de salud predominantes en el mundo: la deficiencia de vitamina A (Upadhyaya et al.,2000).

El consumo de cereales es muy importante en la dieta para la obtención de los aminoácidos esenciales, sin embargo los granos de arroz no ofrecen una fuente completa de proteínas por su deficiencia en lisina y treonina, para contrarrestar esto se ha insertado el gen de la β -faseolina (presente en el frijol), demostrando que se aumentaba el contenido de lisina en el arroz (Giri y Laxmi, 2000).

En la Tabla 2 se resumen algunos de los genes de importancia agronómica que han sido insertados al arroz para su mejora así como los diferentes métodos que se han utilizado para su transformación.

Tabla 2. Arroz transgénico con genes de importancia agronómica

Importancia agronómica	Especie de arroz	Método de transformación	Gen transferido
Resistencia a herbicidas	Índica	Protoplastos-PEG	<i>bar</i>
	Japónica	Biobalística	<i>bar</i>
	Japónica	Protoplastos-electroporación	<i>bar</i>
	Japónica	<i>Agrobacterium</i>	<i>bar</i>
Resistencia a insectos	Japónica	Protoplastos-electroporación	<i>TCryIA</i>
	Índica	Biobalística	<i>SgCryIA</i>
	Japónica	<i>Agrobacterium</i>	<i>SgCryIA</i>
Resistencia a virus	Japónica	Protoplastos-electroporación	<i>RSV-CP</i>
	Japónica	Biobalística	<i>RDVS8</i>
Resistencia a bacterias	Índica	Biobalística	<i>Xa-21</i>
	Japónica	Biobalística	<i>Xa-21</i>
Resistencia a hongos	Índica	Protoplastos-PEG	<i>Ch11</i>
	Japónica	Biobalística	<i>TLP-D34</i>
	Japónica	<i>Agrobacterium</i>	<i>Cht2, Cht3</i>
Otras aplicaciones	Japónica	Biobalística	Dafoddil phytoene synthase (Vitamina A)
	Japónica	<i>Agrobacterium</i>	Soybean ferritin (Hierro)

Fuente: Giri y Laxmi, 2000

1.2.4 Situación actual de los OGM

Los cultivos y alimentos transgénicos son un producto reciente en el mercado mundial pues apenas llevan 18 años de siembras comerciales, a partir de 1996 se comienzan a sembrar libremente en Estados Unidos, hoy en día 63 países los consumen y 30 naciones los cultivan, entre los principales cultivos se encuentran: maíz, soya, algodón, canola, alfalfa, papaya, calabaza y remolacha azucarera, sembrados por 18 millones de agricultores de los cuales 16.5 millones son productores de escasos recursos que generan ganancias de casi 30 millones de dólares, desde que comenzaron a comercializarse los transgénicos han

generado ganancias de 117 millones de dólares, el 50 % de esta cantidad se generó en países en desarrollo en Asia, Latinoamérica y África. Se han aprovechado un promedio de 175 millones de hectáreas para el cultivo de especies modificadas genéticamente, equivalente al 12.5 % de la tierra arable en el mundo, en los países en donde se siembran estos cultivos vive el 60 % de la población mundial. En la Figura 12 se presenta la distribución de los organismos transgénicos por país, Estados Unidos ocupa el primer lugar con 70.1 millones de hectáreas sembradas, seguido de Brasil, Argentina e India, México ocupa el lugar 17 con 114 miles de hectáreas, los principales cultivos genéticos que siembra son soya y algodón, representando el 0.1 % respecto a la distribución geográfica mundial (AgroBioMéxico, 2013; ISAAA, 2013; Massieu, 2009).

El cultivo de nuevas variedades generadas de manera tradicional ha mejorado la producción de diversos cereales, entre ellos el arroz, sin embargo optimizar éstos métodos tradicionales ha mejorado aún más el cultivo de dicho cereal, aunque existe aún poca aceptación de la ingeniería genética en la inserción de genes a una especie (Upadhyaya et al., 2000).

Según Massieu (2009) la discusión acerca de los OGM se basa en la agricultura, acerca de que si se está en una nueva revolución tecnológica que transformará completamente la producción y consumo de alimentos cuyo objetivo principal era solamente abatir el hambre en el mundo por medio de la creación de semillas de alto rendimiento de los principales cultivos alimentarios, sin embargo la manipulación del ADN transformó a la Biología en una ciencia aplicada a la industria e introdujo un nuevo paradigma científico que conlleva a un debate ético, político y social.

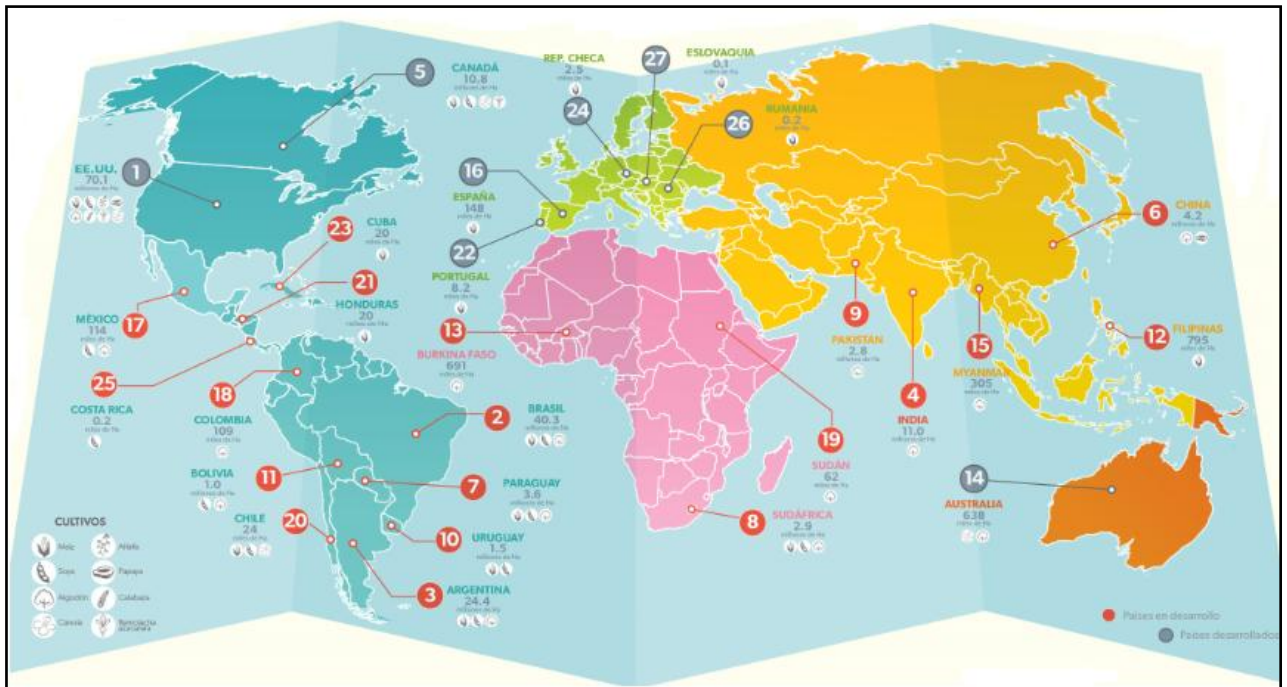


Figura 12. Panorama mundial de cultivos biotecnológicos en 2013. Fuente: AgroBioMéxico, 2013

En la actualidad cerca de 60 países entre ellos: México, Brasil, Argentina, Estados Unidos y algunos de la Unión Europea realizan cotidianamente evaluaciones y han autorizado el uso alimentario de los OGM, pues en base a evidencia científica sólida se ha demostrado que no generan daño a la salud humana, sin embargo es importante que se sigan haciendo las pruebas necesarias para mostrar la inocuidad alimentaria de los transgénicos que se consumen y aquellos nuevos productos que se pretendan incorporar al mercado (Bolívar, 2012).

Actualmente en el mercado existen diversos OGM, mostrados en la Tabla 3, todos estos cultivos ya han sido evaluados y aprobados en México, otros se encuentran en etapa de evaluación, estimándose su comercialización en un periodo de 1 a 5 años.

Tabla 3. Transgénicos disponibles en el mercado

Productos disponibles comercialmente	
<u>Cultivos</u>	<u>Atributos</u>
Soya, canola, alfalfa, remolacha	Tolerancia a herbicidas
Maíz, algodón, soya	Resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas
Álamo, pimiento, berenjena*	Resistencia a insectos
Calabaza, papaya, frijol*	Resistencia a virus
<u>Próximamente (1 a 5 años)</u>	
Maíz*, arroz**, canola	Tolerancia a sequía, forraje con fósforo biodisponible, tolerancia a salinidad
Arroz**, maíz, soya*, plátano, sorgo	Mejora nutricional en vitaminas** y minerales, aceites saludables.
*Cultivos aprobados o ** en etapa avanzada de evaluación regulatoria	

Fuente: ISAAA, 2013

En 1996, comenzó el uso comercial de las semillas biotecnológicas y el consumo de sus derivados en muchos países del mundo, desde ese entonces, se han desarrollado un sin número de estudios que han comprobado sus beneficios y descartado posibles consecuencias negativas tanto para la salud humana o animal como para el medio ambiente, diversos cuerpos regulatorios internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la FAO han concluido que no hay evidencia científica de que la aplicación de la tecnología de genéticamente modificados conlleve a problemas ambientales o efectos sobre la salud, la Biotecnología agrícola ha probado ser una de las herramientas más favorables al equilibrio, mejoramiento y conservación del medio ambiente, su uso representa un menor uso de agua, el rescate de los suelos, economiza casi 500 mil toneladas de plaguicidas, se reduce el uso de maquinarias y combustibles (se ha evitado la emisión de hasta 27 millones de toneladas de CO₂), uno de los principales retos de la agricultura consiste en producir más alimentos en los próximos años sin afectar zonas silvestres como bosques y selvas. La Biotecnología permite enfrentar los principales problemas agronómicos que se presentan en el campo y que provocan mayores pérdidas como el ataque de plagas y malezas o escasez de agua; además de reducir los costos de producción gracias al uso más racional de agroquímicos (Adenle 2011; AgroBioMéxico, 2013).

Existe inquietud en torno a la monopolización de la Biotecnología y la Ingeniería Genética por parte de las grandes corporaciones, como es el caso de Monsanto; la misma compañía que patenta y vende los cultivos es la que fabrica el herbicida al que es resistente la planta, así la corporación asegura las ganancias y altas ventas, en México los registros de los cultivos transgénicos están a nombre de compañías trasnacionales como Bayer y DowAgroSciences, en 2011 SAGARPA otorgó a Monsanto el primer permiso para la siembra de maíz transgénico a nivel piloto en Tamaulipas, nuestro país carece de una Política de Estado agropecuaria integral que contemple éste y otros asuntos relevantes como el de propiedad intelectual y los beneficios de los campesinos para garantizar un uso más equitativo del conocimiento y la tecnología en beneficio de la sociedad y la biota mexicana (Bolívar, 2012; Massieu, 2009).

Otro fenómeno relacionado con los transgénicos son los movimientos sociales, en los que se hace notar la indignación debido a que la alimentación, la naturaleza y el destino de los agricultores dependen de las poderosas corporaciones trasnacionales, cuyo fin primordial es el lucro, además de que el control que tienen dichas instituciones ya no es solo sobre la alimentación y la agricultura sino sobre los genes de todos los seres vivos, México ha sido escenario de un movimiento social de rechazo hacia los OGM debido al descubrimiento de transgenes en parcelas de maíz, dándose por iniciativa de instituciones no gubernamentales como Greenpeace (Massieu, 2009).

Se tienen muchas dudas acerca de los riesgos que implica liberar nuevas variedades en el ambiente, pues existe la posibilidad de que se cruce una variedad alimenticia de siembra natural y una transgénica perdiéndose así la agricultura tradicional, si los transgénicos comienzan a sembrarse libremente, debido a que éste posee características que lo hacen más fuerte o resistente, es factible la desaparición de los cultivos nativos (Massieu, 2009), sin embargo distintas instituciones educativas y de investigación han resguardado el acervo genético de diversas especies en bancos de germoplasma (o bancos de semillas), estas instalaciones especiales tienen como objetivo conservar en óptimas condiciones muchos tipos de semillas y tenerlas a disposición de los agricultores interesados en seguir sembrando cualquiera de las variedades disponibles, es posible la coexistencia de cultivos GM y convencionales siempre y cuando se tomen las medidas de bioseguridad necesarias

para evitar el flujo del polen en época de floración, dichas medidas se utilizan en varios países y consisten en tener una distancia de al menos 30 metros entre ambos tipos de cultivos y diferenciar en 12 días la fecha de siembra para evitar la polinización cruzada (AgroBioMéxico, 2013; Bolívar, 2012; ISAAA, 2013).

La aparición de alergias es otra de las grandes preocupaciones acerca del consumo de OGM, pues el introducir genes foráneos en plantas que sirven de alimento provoca que aparezcan sustancias en los alimentos que de otra manera no habrían entrado en la dieta humana, como por ejemplo, proteínas bacterianas. Se ha visto que muchas de las sustancias nuevas en las plantas son potenciales alérgenos para los seres humanos, se han registrado casos de pruebas de laboratorio que han dado positivo al componente alérgico, las alergias son un problema de salud pública de cuidado por los efectos que puede tener, es por ello la importancia de evaluar los Organismos Genéticamente Modificados antes de comercializarlos así como la importancia en el etiquetado de éstos (Sánchez, 2008). Cabe mencionar que antes de que cualquier producto genéticamente modificado sea consumido por el ser humano es comparado con cultivos tradicionales en una variedad de pruebas químicas, genéticas, bioquímicas, de composición, nutricional y ambiental, así también se compara con alérgenos conocidos (Adenle, 2011).

1.2.4.1 Marco regulatorio

Aunque a la fecha no existen pruebas contundentes de daño a la salud humana por el uso y consumo de organismos que han sido objeto de una modificación genética empleando la tecnología del ADN recombinante, esta tecnología como cualquier otra, puede tener riesgos, por ello la diversidad y utilidad de las aplicaciones de la Biotecnología moderna, en particular de los cultivos genéticamente modificados promovieron la creación de un marco legal que permite el aprovechamiento sustentable de los mismos mediante un manejo seguro y responsable. Así, en México se elaboró durante más de 10 años de discusión y aportes de los distintos actores involucrados —entre los que se encuentran legisladores y servidores públicos así como representantes de la academia, de la sociedad civil organizada y de la cadena agroindustrial—, uno de los marcos regulatorios más rigurosos a nivel

mundial para poder incorporar estas tecnologías innovadoras a la producción agrícola nacional (AgroBioMéxico, 2012; Bolívar, 2012).

El marco regulatorio está conformado por cuatro instrumentos básicos:

1. **Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología (Protocolo de Bioseguridad):** “Garantiza un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización seguras de los organismos vivos modificados resultantes de la Biotecnología moderna, centrándose concretamente en los movimientos transfronterizos y previniendo cualquier efecto adverso para la conservación y uso sostenible de la diversidad biológica, considerando los riesgos para la salud humana”.
2. **Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM):** “Garantiza un nivel adecuado y eficiente de protección de la salud humana, del medio ambiente y la diversidad biológica, así como de la sanidad animal, vegetal y acuícola, respecto de los efectos adversos que pudieran causarles la realización de actividades con Organismos Genéticamente Modificados, define los objetivos y actividades para el manejo y aprovechamiento adecuados de OGM, establece mecanismos para la participación pública en aspectos de bioseguridad, materia de esta Ley, incluyendo el acceso a la información, la participación de los sectores privado, social y productivo a través del Consejo Consultivo Mixto de la CIBIOGEM (Comisión Intersecretarial de la Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados) y evalúa la consulta pública sobre solicitudes de liberación de OGM al ambiente”
3. **Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (RLBOGM):** “Contribuye al cumplimiento de las disposiciones de la LBOGM, estableciendo los procedimientos a seguir y requisitos a cumplir, para la solicitud de permisos y autorizaciones” .
4. **Régimen de Protección Especial del Maíz:** “Establece las disposiciones jurídicas relativas a la bioseguridad necesarias para resolver las solicitudes de liberación de maíces GM: prevención, monitoreo, inspección, vigilancia y medidas de control”.

Algunas de las autoridades competentes para la aplicación del marco legal son: la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) que analiza las solicitudes para evaluar posibles riesgos a la sanidad vegetal, la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) que analiza las solicitudes para evaluar posibles riesgos al ambiente y a la diversidad biológica, la Secretaría de Salud (SSA) que evalúa la inocuidad y expide autorizaciones para el consumo humano de los OGM, la Secretaría de Hacienda y Crédito Público (SHCP) que asegura que los OGM cuenten con los permisos para ingresar al país y la Secretaría de Economía (SE) que participa en la expedición de la NOM sobre OGM en términos de ley: etiquetado, identificación, entre otros (AgroBioMéxico,2012).

Para poder consumir productos genéticamente modificados estos deben de ser evaluados caso por caso por las autoridades sanitarias de cada país, quien autoriza su importación y comercialización para consumo humano y animal, en México 87 cultivos transgénicos cuentan con dicha autorización por parte de la Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) que depende de la Secretaría de Salud, en la Tabla 4 se mencionan los cultivos GM que hasta la fecha tienen permiso de cultivo y consumo en México.

Tabla 4. Estatus regulatorio en México de OGM

CULTIVOS GM	AUTORIZACIONES PARA CONSUMO por COFEPRIS-SSA (7 Enero 2014)	PERMISOS DE CULTIVO Etapa (Año inicial) por SAGARPA-SEMARNAT
Algodón	30	Comercial (2011)
Soya	18	Comercial (2012)
Maíz	67	Piloto (2011)
Trigo	--	Experimental (2012)
Alfalfa	2	Experimental (2013)
Jitomate y papa	3 y 3	Sin solicitudes para siembra
Canola, arroz y remolacha azucarera	7, 1 y 1	Sin solicitudes para siembra

Fuente: AgroBioMéxico, 2013

En Agosto de 2006 se encontró en el mercado alimentario de EUA la presencia de arroz genéticamente modificado no autorizado para consumo humano correspondiente al evento LLRICE601 lo que ocasionó la respuesta inmediata de la Unión Europea quien vetó toda la importación de arroz que no fuera certificado libre de transgénicos (Schoel et al., 2007) de acuerdo a la COFEPRIS en la Lista de Evaluación de Inocuidad Caso por Caso de los Organismos Genéticamente Modificados se reporta que para la especie de arroz (*Oryza sativa*) solo ha sido aprobada desde marzo del 2007 a cargo de la empresa Bayer de México S.A de C.V una sola especie tolerante al herbicida glufosinato de amonio (evento Liberty Link LL62) con la introducción del gen *bar* mediante el uso de CaMV35S como promotor, dicha especie es la reportada para el arroz en la Tabla 4 para su consumo más no para su siembra, por lo que el evento LLRICE601 reportado en 2006 sigue sin ser evaluado para consumo humano y sin embargo existe una alta posibilidad de que arroz mezclado con este evento se encuentre presente en el mercado mexicano si se considera que el 90 % de las importaciones de arroz provienen de EUA (Schoel et al., 2007).

En países como Bélgica, Polonia, Gran Bretaña, Bulgaria, Francia, Alemania, Irlanda y Eslovaquia está prohibida la venta de alimentos transgénicos es por ello que la actual legislación Europea de etiquetado obliga a etiquetar los productos que deriven de cosechas transgénicas, independientemente de la presencia de ADN o de proteína transgénica en el producto final, cualquier alimento que contenga OGM o ingredientes que deriven de éstos debería declararlo en su etiqueta. Greenpeace ha realizado análisis en alimentos en los que se ha detectado presencia transgénica con un porcentaje muy superior al 0.9%, contenido no reportado en la etiqueta (Greenpeace, 2013).

El impacto de la adopción de los cultivos transgénicos a nivel mundial ha sido tal que se ha observado un notable incremento de la voluntad política y del apoyo a los cultivos biotecnológicos por parte de la comunidad científica, organismos internacionales y líderes de los países en desarrollo pues la consideran una herramienta imprescindible para enfrentar los retos de alimentación al aumento poblacional (ISAAA, 2013).

1.3 Técnicas biotecnológicas para la identificación de transgenes

De acuerdo al marco regulatorio anteriormente expuesto y conociendo ya la situación actual de los OGM lo más importante es el derecho a la información que se le puede brindar al consumidor, de ésta manera, solo él puede elegir con conocimiento de causa si decide comprar y/o consumir transgénicos, por ello surge la necesidad de contar con métodos para detectar su presencia en los alimentos.

La base de las técnicas para la identificación de transgenes consiste en ver la diferencia entre una especie modificada y una que no lo es, dichas técnicas se puede dividir en 2 grupos: aquéllas basadas en el análisis de proteínas y las que se centran en el análisis del ADN o técnicas genéticas. Los métodos basados en el análisis de proteínas han sido los más utilizados pero los grandes avances que se han producido en los últimos años en las técnicas de Biología Molecular han impulsado el rápido desarrollo de numerosos métodos genéticos que se han aplicado con mayor éxito a la identificación de especies en los alimentos (Rodríguez, 2004).

1.3.1 Técnicas basadas en el análisis de proteínas

Desde 1980 muchas técnicas moleculares e inmunológicas para la identificación de especies en productos alimenticios fueron desarrolladas, inicialmente muchas de las pruebas identificaban fracciones de proteínas en los alimentos, esto incluía técnicas electroforéticas, inmunológicas y cromatográficas, sin embargo, éstas dejaron de usarse por su baja especificidad y poca sensibilidad sobre todo en el caso de matrices complejas de alimentos sometidos a diversos procesos como congelación, salazón, uso de condimentos y sobre todo calor (pasteurización, esterilización), afectando directamente a la estructura de las proteínas (Bottero y Dalmaso, 2011).

Las técnicas basadas en el análisis de proteínas pueden utilizarse en muestras de alimentos frescos o procesados, siempre y cuando el procesamiento no haya afectado a las proteínas presentes en la muestra, por este motivo, las técnicas moleculares que suponen el manejo de proteínas son aplicadas en aquellos casos en los cuales se dispone de muestras con un contenido proteico en cantidad suficiente y con la calidad adecuada (ArgenBio, 2003).

- ✓ ***Técnicas electroforéticas:*** Separan las proteínas de acuerdo a su peso molecular en un medio acuoso bajo la influencia de un campo eléctrico, luego se compara el perfil electroforético obtenido a partir de las proteínas de las muestras problema con los patrones de bandas de muestras de referencia, la comparación puede ser visual o bien utilizando un analizador de imágenes. Algunos ejemplos de este tipo de técnicas son: la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), el isoelectroenfoque (IEF) y la electroforesis capilar (EC) aunque han sido poco utilizadas debido a su baja resolución (Rodríguez, 2004).

- ✓ ***Técnicas cromatográficas:*** La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés “High Performance Liquid Chromatography”) permite la separación de las proteínas atendiendo a su polaridad, es decir, a su distribución entre una fase móvil polar y una fase orgánica que está fija a una matriz, de este modo se obtienen perfiles cromatográficos de proteínas característicos de cada especie que permiten su identificación mediante comparación con cromatogramas de referencia. Es un método rápido, sencillo y no emplea reactivos tóxicos, los sistemas de detección con luz UV permiten conocer la cantidad de proteína perteneciente a una especie presente en una mezcla, sin embargo, no es muy conveniente cuando se trata de identificar muestras con un alto grado de procesamiento (Rodríguez, 2004).

- ✓ ***Técnicas inmunológicas:*** Son procedimientos analíticos basados en la reacción específica entre un antígeno (sustancia a analizar) y su correspondiente anticuerpo. Las técnicas inmunológicas reducen el tiempo y costo del análisis, además, su adecuada sensibilidad y especificidad las hacen especialmente útiles para el análisis rutinario de los alimentos. Entre los ensayos inmunológicos más empleados en la identificación de especies destacan: la inmunodifusión en geles de agar, la inmunoelectroforesis y las técnicas inmunoenzimáticas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay o ELISA) (Rodríguez, 2004), ésta última mide la cantidad de proteína de interés en una muestra que puede contener muchos tipos de proteínas diferentes y se utiliza ampliamente para la detección de OGM (SENASICA, 2013).

1.3.2 Técnicas genéticas

El ADN, es la molécula biológica en la cual reside la información genética, la Biotecnología moderna implica el manejo del material genético, por ello, las técnicas genéticas se basan en la detección, identificación y cuantificación de secuencias de ADN asociadas con los OGM (SENASICA, 2013). De estas técnicas, la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés de “Polymerase Chain Reaction”) es la más utilizada convirtiéndose en una herramienta de gran utilidad para el control de calidad en la industria alimentaria pues permite identificar el origen de muchos de los componentes presentes en los alimentos, las técnicas genéticas resultan especialmente útiles cuando se analizan productos sometidos a tratamientos térmicos intensos debido a la elevada estabilidad del ADN, a pesar de resultar costosas y exigir un mayor soporte técnico que las basadas en el análisis de proteínas, presentan importantes ventajas comparadas con éstas (Rodríguez, 2004) como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Comparación entre las técnicas utilizadas para la identificación de transgenes

Técnicas basadas en el análisis de proteínas	
Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Las muestras se analizan rápidamente. ✓ El costo de los reactivos es bajo, lo que hace a la técnica en general más barata. ✓ Las técnicas son sencillas de aprender. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Dificultad para analizar muestras procesadas o tratadas térmicamente. ✓ Es necesario buen estado de las muestras y gran cantidad de ésta. ✓ Las proteínas varían (en cantidad y en tipo) dependiendo del tejido que se examine.
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Se necesita muy poca cantidad de muestra. ✓ Posibilidad de analizar muestras procesadas y conservadas por largo tiempo. ✓ El ADN es el mismo en todas las células de un organismo. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ En análisis es relativamente lento y caro. ✓ Técnicas más complejas que requieren personal más especializado. ✓ Existe menos información disponible.

Fuente: Rodríguez, 2004

1.3.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La invención de la PCR por K. Mullis y sus colaboradores en 1985 revolucionó la Biología Molecular y la Medicina Molecular, la PCR, es una técnica *in vitro* utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN basada en la síntesis de millones de copias de un fragmento específico, determinado por el apareamiento de dos moléculas cuya secuencia se conoce, denominados cebadores sintéticos o “primers”, con la molécula de ADN original (Somma y Querci, 2007). La PCR cambió el curso de las ciencias biológicas y biomédicas más que cualquier otra técnica inventada en el siglo XX. Aun cuando existe un gran número de métodos para la clonación y secuenciación de ADN, la PCR es el método más simple, rápido y flexible (Rodríguez, 2004).

La técnica de PCR se ha hecho indispensable para muchos procedimientos comunes, como la clonación de fragmentos específicos de ADN, la detección e identificación de genes para diagnóstico y medicina legal y en la investigación de modelos de expresión de los genes, también ha permitido la investigación de nuevos campos, como el control de la autenticidad de los alimentos, la presencia de ADN modificado genéticamente y la contaminación microbiológica (Somma y Querci, 2007). Para comprender los principios de la PCR y sus aplicaciones, primero debe entenderse la naturaleza de la molécula de ADN.

El descubrimiento en los inicios de la década de los años 50 por J. Watson y F. Crick de la estructura molecular de una doble cadena de ADN, constituyó uno de los hechos más impresionantes y relevantes de la comunidad científica (Flores et al., 2009), tal como se muestra en la Figura 13, el ADN está formado por 2 cadenas de polímeros anti-paralelos y complementarios (5'-3') que se mantienen unidos por enlaces débiles de puente de hidrógeno, cada uno de estos polímeros está a su vez integrado por la unión de millones de monómeros (nucleótidos) compuestos por una base nitrogenada que puede ser una base púrica como Adenina (A) y Guanina (G) o una base pirimídica como Timina (T) y Citosina (C), mediante un enlace glucosídico tienen un grupo fosfato unido a un monosacárido (azúcar desoxiribosa), los nucleótidos se unen entre sí por enlaces fosfodiéster creando columnas repetitivas (Bolívar, 2012; Flores et al., 2009).

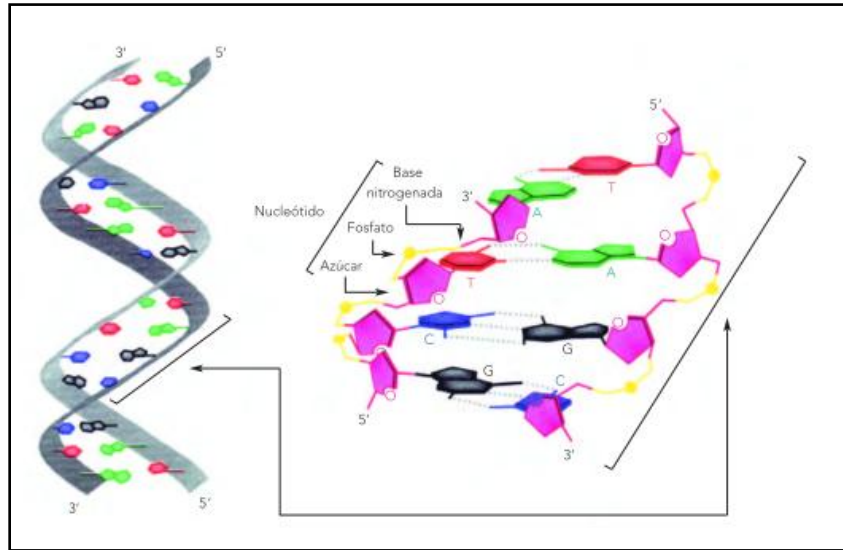


Figura 13. Estructura del ADN. Fuente: Bolívar, 2012

1.3.2.2 Fundamento y componentes de la PCR

La PCR se basa en el principio de complementariedad de bases del ADN y en el uso de la enzima polimerasa, ésta permite la extensión del fragmento a amplificar; agregando nucleótidos en secuencia complementaria al ADN molde que actúan como “primers” enmarcando la región a amplificar, todo esto mediante un proceso cíclico (ArgenBio, 2003; Flores et al., 2009) en el que el ADN de doble cadena se desnatura al aumentarse la temperatura y se convierte en monocatenario (una sola cadena), se duplica y se vuelve a enrollar cuando se disminuye la temperatura (Somma y Querci, 2007).

Esta técnica permite multiplicar (amplificar es, en realidad, el término que se usa) pequeñas cantidades de ADN entre cientos de miles y millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde 50 hasta más de 2 mil nucleótidos de longitud. El segmento de ADN que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas (Somma y Querci, 2007).

Los componentes para llevar a cabo la PCR son los siguientes:

- 1) ADN molde o diana: Aquí se utiliza el ADN que se quiere amplificar, su adición a la reacción implica su previa extracción de la célula o el tejido y su solubilización

en agua (Rosas, 2008) puede efectuarse la amplificación por PCR si está presente al menos un ejemplar intacto del ADN molde, pero cualquier alteración en éste puede afectar a la PCR pues aunque las muestras no tienen que estar muy purificadas, sí es necesario eliminar algunos contaminantes que pudieran inhibir la reacción. Se requiere una concentración lo más cercana a 60 ng/μL para lograr una amplificación adecuada, si la concentración es muy alta, la enzima no podrá actuar adecuadamente (Somma y Querci, 2007).

- 2) Par de “primers”: Son moléculas sintéticas de cadena sencilla y de secuencia preferentemente corta (18 a 25 pb), se les conoce también como oligonucleótidos y estos funcionan como cebadores para la replicación del ADN molde, determinando su longitud, el éxito de la PCR depende del diseño de los “primers” (Rosas, 2008).
- 3) dNTP’s en exceso: Para la síntesis de ADN hacen falta desoxirribonucleótido-trifosfatos libres (dNTP), éstos son nucleótidos sintéticos que no forman ninguna secuencia al inicio de la reacción, sirviendo como sustrato a la enzima ADN polimerasa y siendo los componentes de las miles de copias del ADN molde al final de la reacción. Pueden denominarse como dATP’s, dTTP’s, dGTP’s y dCTP’s, la concentración de cada uno de los dNTP para la PCR debe estar entre 20 y 200 μM, y los cuatro dNTP deben utilizarse a concentraciones equivalentes para minimizar los errores de incorporación (Rosas, 2008; Somma y Querci, 2007).
- 4) Enzima ADN polimerasa: La enzima ADN polimerasa se encarga de unir nucleótidos dNTP’s a la cadena complementaria a partir del “primer”, formando una nueva cadena doble de ADN a partir de una cadena sencilla. Debido a que las etapas de la reacción involucran temperaturas variables, es requerida una enzima termoestable que soporte temperaturas cercanas a los 100 °C. Esta característica es la que le permite a la enzima actuar durante varios ciclos sin desactivarse y aunque existen una gran variedad de enzimas, la más empleada es la *Taq* polimerasa (Rosas, 2008).

- 5) Cationes divalentes: Todas las ADN polimerasas termoestables requieren de cationes divalentes libres para su actividad, usualmente Mg^{2-} , sin embargo, la presencia de éstos está más ligada con la presencia de dNTP's y oligonucleótidos, debido a que son ellos los que se unen al catión (Rosas, 2008).
- 6) Un buffer: Esto consiste en un tampón Tris-HCl que a temperatura ambiente mantenga el pH en un valor de 8.3, el buffer recomendado es de 10-50 mM de Tris-HCl (pH entre 8.3 -8.8), tiene características iónicas bipolares con un pKa de 8.3 a 20 °C, el verdadero pH de un buffer 20mM de Tris (pH 8.3 a 20 °C) varía entre 7.8 y 6.8 durante las condiciones típicas del termociclador (Cortázar y Silva, 2004).

1.3.2.3 Etapas de la reacción

La amplificación *in vitro* del ADN se logra en 3 pasos que conforman un ciclo.

- 1) Desnaturalización: En esta etapa se aumenta la temperatura (mayor a 67 °C pero menor a 98 °C) para hacer que la doble cadena del ADN molde se separe o desnaturalice quedando en forma de cadenas sencillas (Figura 14) debido a la ruptura de los puentes de hidrógeno y de las interacciones hidrofóbicas entre las bases no se altera la estructura primaria del ADN pues no se afectan los enlaces covalentes (Cortázar y Silva, 2004; Flores et al., 2009).

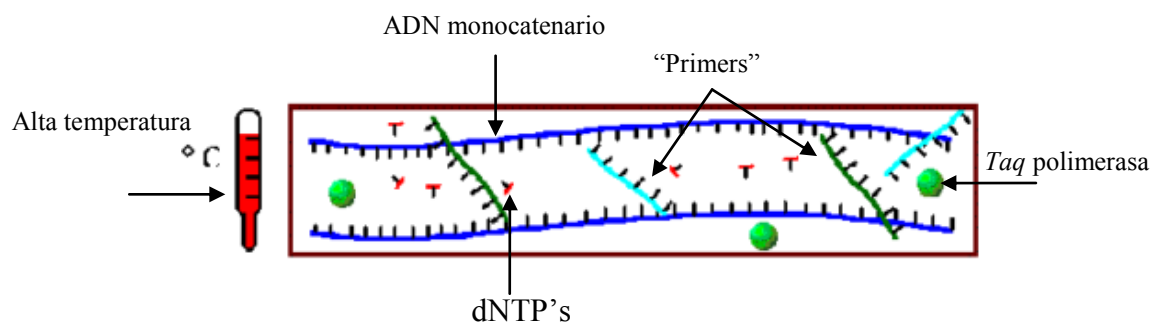


Figura 14. Etapa de desnaturalización (PCR). Fuente: Cortázar y Silva, 2004

- 2) Hibridación o alineamiento: Este paso se conoce así ya que las cadenas sencillas se alinean a los "primers" en sitios específicos (Figura 15) debido a la complementariedad de bases, formando pequeñas regiones de doble cadena, esto se

logra disminuyendo la temperatura, conocida como T_m (temperatura de hibridación) y depende del contenido de las bases nitrogenadas, mientras los pares de bases C≡G sean más abundantes que A=T, la T_m aumentará debido a que la interacción en C≡G es más fuerte que A=T (Cortázar y Silva, 2004; Flores et al., 2009).

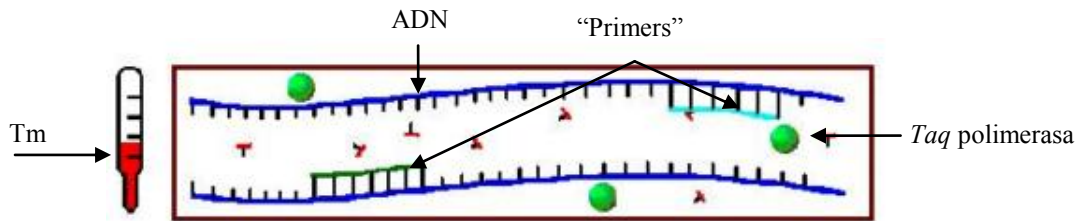


Figura 15. Etapa de hibridación o alineamiento (PCR). Fuente: Cortázar y Silva, 2004

- 3) Elongación: A esta etapa se le conoce también como amplificación, la enzima se encarga de elongar los “primers” de acuerdo a la hebra sencilla de ADN que sirve de molde (Figura 16) debido al aumento de temperatura óptima de la enzima (72 °C), el sustrato de la enzima son los dNTP’s, al final de esta etapa se obtienen cadenas dobles nuevamente pero duplicando a las que existían inicialmente en la desnaturalización (Flores et al., 2009; Cortázar y Silva, 2004).

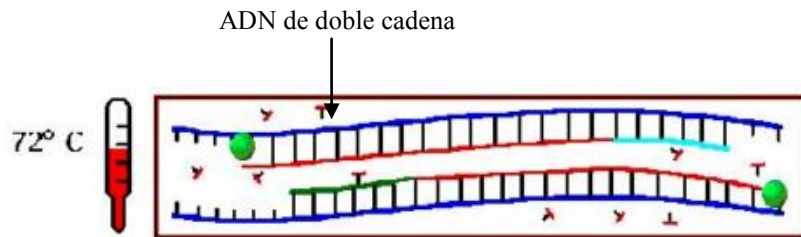


Figura 16. Etapa de elongación (PCR). Fuente: Cortázar y Silva, 2004

Complementariamente a las tres etapas repetidas cíclicamente, se añade una etapa inicial y una final. La inicial implica elevar la temperatura a un nivel superior a la etapa de desnaturalización, inactivando las proteasas y nucleasas de la muestra y al mismo tiempo, asegura la completa desnaturalización del ADN inicial. La etapa final consiste en la prolongación de la última elongación a fin de permitir que se complementen todos los

fragmentos (Rosas, 2008). Gráficamente las etapas del ciclo de la PCR podrían representarse tal como lo muestra la Figura 17.

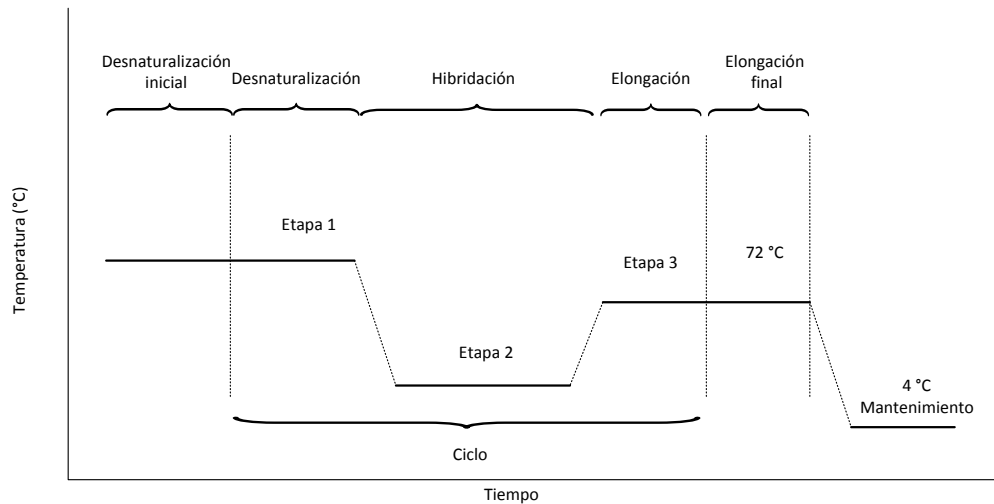


Figura 17. Representación gráfica del ciclo de PCR

Cada una de las moléculas de ADN hijas pueden volver a entrar en el proceso y servir como molde para fabricar más copias, por ello las tres etapas mencionadas se repiten “*n*” veces cíclicamente duplicándose en cada ciclo el número de cadenas delimitadas por los cebadores. Se trata de una amplificación exponencial o logarítmica, en que las cadenas previamente sintetizadas pueden servir de molde a futuras amplificaciones. Por tanto, y mientras los reactivos no se agoten, el número de moléculas finales amplificadas por cada molécula inicial corresponde a la relación de 2^n , siendo “*n*” el número de ciclos (Flores et al., 2009).

Todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, el cual permite calentar y enfriar los tubos de reacción controlando la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. La automatización del proceso se debe al descubrimiento de la enzima *Taq* polimerasa termoestable, extraída del *Thermus aquaticus*, que eliminó el inconveniente de agregar enzima fresca en cada paso de la reacción (Watson, 2006).

1.3.2.4 Consideraciones para el diseño de “primers”

La correcta selección o diseño de los “primers” es fundamental para el éxito de la PCR pues si no existe una unión perfecta entre el ADN diana y el extremo 3' del “primer” puede conducir a un fallo en la PCR, por ello se requiere un diseño cuidadoso para la obtención de los productos deseados; esto implica el cumplimiento de características especiales que dependen en gran medida de la secuencia diana por sí misma (Cortázar y Silva, 2004). La secuencia del “primer” determina varios aspectos, como la posición, la longitud del producto, su T_m y finalmente el rendimiento (Somma y Querci, 2007).

Algunas de las consideraciones a seguir para el diseño adecuado de “primers” son las siguientes:

- Ⓢ Las concentraciones óptimas de los “primers” deben de ser generalmente entre 0.1 y 0.5 μM , altas concentraciones pueden promover “mispriming” y acumulación de producto no específico e incrementar la probabilidad de generar un templado independiente llamado dímero de “primer”. Los productos no específicos y los dímeros de “primers” son por sí mismos sustratos para la PCR y compiten con el producto deseado con la enzima, los dNTPs y “primers”, resultando en un bajo rendimiento del producto deseado (Cortázar y Silva, 2004).
- Ⓢ Deben tener una longitud de entre 18 a 25 bases, se recomienda que el par de “primers” sea de la misma longitud o en todo caso no rebase una diferencia de 3 nucleótidos (Rosas, 2008). En general, cuanto más largo sea el “primer”, menos eficaz será la hibridación, pero tampoco deben de ser demasiado cortos pues la longitud del primer es inversamente proporcional a la eficiencia de la reacción (Somma y Querci, 2007).
- Ⓢ La temperatura de hibridación de los “primers” es uno de los factores determinantes de la reacción, aunque existen muchos métodos para calcular la T_m , aún con el cálculo, siempre es necesario probar con diferentes temperaturas para determinar la

temperatura óptima para cada reacción, es importante no olvidar que son dos los “primers” que se añaden a una PCR, por lo que la T_m entre esta pareja debe de ser similar, no debe de diferir en más de 2 °C. Esta propiedad asegura que el producto amplificado será eficientemente desnaturalizado durante cada ciclo de PCR (Cortázar y Silva, 2004; Rosas, 2008; Somma y Querci, 2007).

- Ⓢ La composición base de los “primers” debe estar entre el 40% y el 60% de G/C y las 4 bases deberán estar distribuidas a lo largo de toda la secuencia, ésta debe de ser elegida de tal forma que no haya regiones de poliG o de poliC que puedan promover el reconocimiento no específico, es decir que sea altamente compleja (no GGG o CCC). El “primer” tendrá un contenido de G/C del 50% y ~20 bases de largo, esto pondrá la T_m entre 55 °C – 62 °C (Cortázar y Silva, 2004; Rosas, 2008).
- Ⓢ La inclusión de un residuo de G o de C en el extremo 3' de los “primers” ayuda a asegurar el correcto enlace en el extremo terminal 3' debido al enlace de hidrógeno más fuerte de los residuos G/C (Cortázar y Silva, 2004).
- Ⓢ Los “primers” deben de ser específicos o complementarios a las regiones deseadas (no tener homología con secuencias no deseadas) (Rosas, 2008). Han de elegirse de forma que tengan una secuencia única dentro del ADN molde que debe amplificarse (Somma y Querci, 2007).

Las consideraciones para el diseño de “primers” se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Consideraciones para el diseño de “primers”

Característica	Diseño óptimo
Concentración	Entre 0.1 y 0.5 μ M
Longitud	De 18 a 25 nucleótidos
T_m	55 - 62 °C
Contenido de GC %	40 – 60 %
Base en el extremo 3'	Debe de ser una G o C
Auto-complementariedad	Debe de ser evitada para impedir la formación de estructuras secundarias.
Similitud	Debe de tener el 100 % de semejanza con el ADN molde
Especificidad	Secuencia única dentro del ADN a amplificar

Existen programas disponibles en la red que ayudan al diseño de “primers”, algunos de ellos son:

- Primer-BLAST
- Primer Premier 5
- OLIGO Primer Analysis Software
- Osprey
- Primer 3
- PrimerQuest

1.3.2.5 Factores que afectan la PCR

Además del correcto diseño o selección de los “primers”, hay otros factores que pueden inhibir o afectar la reacción de PCR, el término de inhibir se refiere a la presencia de sustancias que pudieran interferir con la enzima ya sea mediante bloqueo directo total o parcial de su actividad catalítica o mediante la unión directa al ADN (Microbial, 2009).

- i. Pureza del ADN: La enzima utilizada puede ser inhibida por diversas sustancias presentes en el ADN propias de su estructura y naturaleza (polisacáridos complejos, proteinasas, hemoglobina, etc.) o bien de los reactivos utilizados para su extracción (fenol, etanol, isopropanol, etc.) (Microbial, 2009). Por ello, se recomienda en determinados casos amplificar ADN a partir de células o tejidos, mientras que en otros casos es necesaria una purificación previa de los ácidos nucleicos. A veces tener ADN en exceso también puede afectar la reacción, de igual manera es importante que el ADN esté diluido con agua libre de nucleasas (Dorado, 2013).
- ii. Almacenamiento de los “primers”: Se recomienda guardar los “primers” disueltos en agua destilada estéril tipo milli-Q y congelados ≤ -20 °C (Dorado, 2013).
- iii. Concentración de Magnesio: Es benéfico optimizar la concentración del ión magnesio, ya que afecta: la hibridación de los “primers”, la temperatura de disociación de las cadenas, tanto del templado como del producto de PCR, la especificidad del producto, la formación de dímeros de “primer” y la actividad y fidelidad de la enzima. La *Taq* polimerasa requiere magnesio libre en la unión con

el ADN, los primers y los dNTPs, se debe de contener 0.5 a 2.5 mM de magnesio sobre el total de la concentración de dNTP (Cortázar y Silva, 2004).

- iv. Otros reactivos: Todos los reactivos incluyendo el agua deben de ser de suficiente pureza y carentes de inhibidores de la enzima, ha habido casos en que la PCR deja de funcionar y todo se soluciona cambiando el agua empleada, conviene guardar los reactivos a emplear a -20 °C (congelador estándar) (Dorado, 2013).
- v. Perfil de ciclos de amplificación: Aunque la PCR es un proceso empírico, pueden seguirse algunas recomendaciones generales. El número de ciclos de PCR suele oscilar entre 25 y 40, dependiendo de la aplicación, en general 30 ciclos son suficientes, la desnaturalización suele realizarse durante 15-60 segundos y la hibridación + polimerización durante 30-120 segundos (dependiendo también en este caso de la longitud del ADN diana a copiar y la actividad de la polimerasa usada) (Dorado, 2013).

1.3.2.6 Análisis del producto de la PCR

La electroforesis en gel de agarosa es un procedimiento analítico utilizado en varias áreas de la Biotecnología, es el método más común y más utilizado, el cual se basa en la separación de macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas (Somma y Querci, 2007). Es utilizado para analizar la concentración e integridad del ADN y el tamaño de distintos fragmentos de ADN como los productos obtenidos de la PCR, pues al finalizar la reacción se busca que el tamaño del fragmento de interés delimitado por los “primers” sea el esperado (Cortázar y Silva, 2004).

La electroforesis consiste en la separación de moléculas a través de una matriz tamponada (agarosa, acrilamida, almidón), describiendo la migración de las partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable por la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) (Posso, 2009).

La resolución y velocidad de separación de fragmentos de ADN son reguladas a través de la concentración de agarosa (o acrilamida) en el gel y el voltaje aplicado durante la electroforesis. La agarosa funciona como un filtro en el que los fragmentos de menor

tamaño migran más rápidamente hacia el ánodo que aquellos de mayor tamaño. Al aumentar la concentración de agarosa se dificulta el movimiento de los fragmentos a lo largo del gel, permitiendo obtener una mayor resolución en los fragmentos de menor longitud, así mismo el incremento del voltaje aumenta proporcionalmente la velocidad de migración de los fragmentos (Flores et al., 2009; Posso, 2009).

Existen algunos tipos de electroforesis en gel de agarosa, pero la electroforesis horizontal es la más utilizada para separar moléculas de ADN. El aparato de electroforesis horizontal es esencialmente una caja con electrodos en cada extremo, estos electrodos son de platino ya que tiene una conductividad eléctrica muy buena (Posso, 2009).

La realización de la electroforesis consta de 4 componentes principales para poderla llevar a cabo de manera adecuada, los cuales son:

- ✓ **Gel de agarosa:** Es el medio de separación, la agarosa es un polisacárido lineal derivado del agar, originario de las algas, formado por la repetición de la unidad básica, la agarobiosa, que comprende unidades alternadas de galactosa y 3,6-anhidrogalactosa. Los geles de agarosa poseen grandes poros y se emplean fundamentalmente para separar las moléculas grandes con un peso molecular de más de 200 kDa. Un fragmento de ADN de un tamaño determinado migra a diferentes velocidades a través de los geles según la concentración de agarosa. En los geles horizontales, la agarosa se emplea por lo general en concentraciones comprendidas entre un 0.7 % y un 3 % (Flores et al., 2009; Somma y Querci, 2007).
- ✓ **Tampón de electroforesis:** La movilidad electroforética del ADN se ve afectada por la composición y la fuerza iónica del tampón de electroforesis. En ausencia de iones, la conductancia eléctrica es mínima y el ADN migra lentamente o no se desplaza. Se dispone de varios tipos de tampones para la electroforesis de ADN, éstos contienen ácido etildiaminotetraacético (EDTA pH=8.0) y tris-acetato (TAE), tris-borato (TBE) o tris- fosfato (TPE) a una concentración de aproximadamente 50 mM (pH 7.5 – 7.8) (Posso, 2009; Somma y Querci, 2007).

- ✓ ***Marcador de peso molecular:*** Generalmente un marcador contiene un número determinado de segmentos de ADN conocidos lo cual facilita la labor de determinar el tamaño del ADN a evaluar (Somma y Querci, 2007).
- ✓ ***Tampón de carga:*** Las muestras de ADN que deben cargarse en el gel de agarosa se mezclan en primer lugar con un tampón de carga que por lo general contiene agua, sacarosa y un colorante (por ejemplo, cianol de xileno, azul de bromofenol, verde de bromocresol, blue orange, etc.), el tampón de carga se emplea para incorporar un colorante a la muestra que, en un campo eléctrico, se desplace hacia el ánodo a una velocidad previsible (Somma y Querci, 2007).
Los ácidos nucleicos separados en geles de agarosa pueden visualizarse mediante tinción con colorantes fluorescentes, éstos actúan mediante inserción entre las pares de bases que conforman el ADN, el bromuro de etidio es ampliamente utilizado para este fin (Flores et al., 2009).

1.3.2.7 Tipos de PCR

En una PCR clásica o punto final, se amplifica el ADN diana a partir de una pareja de “primers” que delimitan la secuencia a copiar (siguiendo el proceso descrito anteriormente). Es lo que se denomina una amplificación simétrica exponencial o logarítmica, existen sin embargo otros tipos de PCR que corresponden a aplicaciones específicas.

- a) **PCR anidada:** En esta variante de PCR, el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con iniciadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada. Este tipo de PCR es altamente específica (Somma y Querci, 2007).
- b) **PCR con arranque en caliente:** Esta técnica consiste en comenzar la reacción solo cuando la temperatura de la mezcla es suficientemente alta, de forma que no se produzcan hibridaciones y por consiguiente, amplificaciones inespecíficas (Dorado, 2013).
- c) **PCR in situ:** Es una PCR que se realiza sobre un portaobjeto sobre todo para secciones histológicas o células, donde los productos generados pueden visualizarse en el sitio de amplificación, de esta manera puede detectarse

cantidades muy pequeñas del material genético. Es una técnica muy poderosa ya que permite localizar el material amplificado en determinadas células, orgánulos celulares e incluso cromosomas (Cortázar y Silva, 2004; Dorado, 2013).

- d) **PCR múltiplex:** Es una PCR en la cual se amplifica más de una secuencia en una misma reacción, emplea dos o más pares de “primers” en un único tubo de reacción con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN. La ventaja de esta PCR es que se obtiene la información de varias muestras en una sola reacción, utilizando menor cantidad de ADN para el análisis y menor cantidad de reactivos (Somma y Querci, 2007).
- e) **PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR):** La estrategia consiste en copiar el ARN en ADN primero (mediante una transcriptasa inversa) y luego realizar una amplificación del ADN (generalmente conocido como cADN, ADN copia o complementario). La *Taq* polimerasa es capaz de funcionar también como transcriptasa inversa en presencia de iones Mn^{2+} . Este tipo de PCR simplifica y optimiza el proceso de amplificación de ADN a partir de ARN (Dorado, 2013).
- f) **PCR asimétrica:** Utiliza un solo “primer” y por tanto sólo consigue una amplificación aritmética lineal (no logarítmica exponencial) de una sola de las hebras de la doble hélice. Se utiliza fundamentalmente para amplificar las reacciones de secuenciación y suele llamarse secuenciación cíclica (Cortázar y Silva, 2004; Dorado, 2013).
- g) **PCR tiempo real:** Es una reacción de PCR cuya principal característica es que permite cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra original. El ADN debido a su unión con un fluorocromo (por lo general SYBR Green) produce fluorescencia que es medida por un termociclador apto para PCR en tiempo real (Cortázar y Silva, 2004).
- h) **Random Primer PCR:** Esta variante de la técnica es muy sensible y específica, es muy útil en el estudio y diagnóstico de organismos de una misma especie con variaciones genéticas específicas. Su aplicación permite la amplificación de moléculas de ADN y genomas que varían entre 400 pb hasta 40 mega bases (Somma y Querci, 2007).

1.3.2.8 Aplicaciones de la PCR

Las aplicaciones de ésta técnica son innumerables y su aporte al avance del conocimiento y manipulación del material genético es invaluable, de acuerdo a Cortázar y Silva (2004), Flores et al. (2009) y Dorado (2013) algunas de las aplicaciones más importantes que se pueden mencionar pertenecen a las siguientes ramas de estudio:

- **Biología Molecular:** Para amplificar secuencias de ADN que luego son fácilmente clonadas y/o secuenciadas; para generar mutaciones aleatorias o dirigidas, para rastrear rápida y eficientemente bibliotecas génicas.
- **Alimentos:** Identificación de especies para detectar adulteraciones, denominación de origen, identificación de OGM.
- **Genética general:** Para amplificar y detectar diferentes genotipos y estudiar su evolución dentro de las poblaciones.
- **Mejora de plantas y animales:** Cabe destacar las técnicas de RFLPs (“Restriction Fragment Length Polymorphisms”), RAPDs (“Randomly Amplified Polymorphic DNAs”), SSRs (“Simple Sequence Repeats”), y AFLPs (“Amplified Fragment Polymorphism”). Todas ellas generan, por diversos métodos, bandas de ADN que son resueltas mediante electroforesis en gel, dando origen a patrones denominados huellas digitales, de este modo pueden distinguirse especies, variedades e incluso individuos.
- **Espectrometría mutacional, toxicología y tratamiento del cáncer:** Para amplificar y detectar mutaciones y translocaciones cromosómicas.
- **Medicina:** Para el diagnóstico precoz de enfermedades infecciosas como el SIDA, diagnóstico prenatal o la posible existencia de enfermedades hereditarias en el embrión o adultos.
- **Criminología y análisis forenses:** Identificación de culpables a partir de muestra de ADN (pelo, espermatozoides, sangre, etc.), huella digital genética.
- **Estudios evolutivos:** Construcción del mapa del genoma humano, amplificación de genes de organismos extintos, fósiles.

1.3.3 Extracción de ADN

Uno de los elementos claves para la PCR es el ADN, por ello el método de extracción de éste es de gran importancia para obtener los resultados esperados, un método de extracción permite obtener ácidos nucleicos purificados a partir de diversas fuentes, para después realizar análisis específicos. La calidad y la pureza de los ácidos nucleicos son dos de los elementos más importantes en ese tipo de análisis. Si se desean obtener ácidos nucleicos muy purificados que no contengan contaminantes inhibidores, deben aplicarse métodos de extracción adecuados (Somma y Querci, 2007).

Todas las células tienen en su interior ADN, ya sea en su núcleo o en organelos como mitocondrias y cloroplastos, por ello cualquier metodología de extracción de ADN consiste en una etapa para romper las estructuras que confinan el ADN y liberar al medio su contenido y otra etapa de purificación, que implica retirar de la solución final la mayoría de elementos que pueden interferir en la PCR (Microbial, 2009).

Las etapas de la extracción de ADN mediante procedimiento químico son:

1. Lisis celular: Las sales ayudan a romper la estructura tridimensional de las macromoléculas como proteínas o ácidos nucleicos consiguiendo su desnaturalización, generalmente la muestra se trata con un tampón de extracción que contiene EDTA, Tris-Base y dodecilsulfato sódico (SDS), la adición de un detergente como el SDS es necesario para eliminar las membranas y liberar el ADN, el EDTA es un componente quelante que se une al magnesio (que es un cofactor de la desoxirribonucleasa). Al unir el magnesio al EDTA, la actividad de la desoxirribonucleasa presente disminuye. El Tris-Base confiere a la solución la capacidad de amortiguar el pH a 8 (un pH inferior o superior daña el ADN).
2. Degradación de la fracción proteica asociada al ADN: Las proteínas unidas al ADN son las histonas, su eliminación se consigue mediante la adición de una proteasa, la fracción proteica se precipita mejor con la ayuda de sales.
3. Purificación del ADN: Se precipita el ADN ya que éste es insoluble en alcohol, esto puede lograrse utilizando etanol frío y recuperarse mediante centrifugación, el sobrenadante lleva las sales añadidas anteriormente. Se forma un “pellet” que se

lava con etanol frío y se vuelve a centrifugar, suele emplearse una combinación de fenol y cloroformo para eliminar las proteínas y para concentrar los ácidos nucleicos, tras la segunda centrifugación lo que queda como sedimento es el ADN y se puede suspender en agua libre de nucleasas (Somma y Querci, 2007; Microbial, 2009).

La confirmación de la presencia del ADN se puede hacer mediante electroforesis en gel de agarosa o directamente en un espectrofotómetro. El espectrofotómetro se fundamenta en la transmisión de la luz a través de una solución para determinar la concentración de un soluto presente en la misma, éste equipo funciona conforme a un principio sencillo: se irradia una muestra con una radiación luminosa de longitud de onda conocida (λ) y se mide la energía luminosa transmitida con una célula fotoeléctrica situada detrás de la muestra (Somma y Querci, 2007).

El espectro de absorción característico de los ácidos nucleicos presenta un máximo a $\lambda \sim 260$ nm por lo que una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde aproximadamente a una concentración de 60 ng/ μ L de ADN. El máximo de absorbancia de las proteínas se encuentra en $\lambda \sim 280$ nm, por lo que es posible estimar el grado de impurezas de origen proteico a partir del cociente A_{260}/A_{280} . Para el ADN en soluciones de alta pureza se espera $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ y para ARN, $A_{260}/A_{280} \geq 2.0$ (Flores et al., 2009; Zárate, 2009).

CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

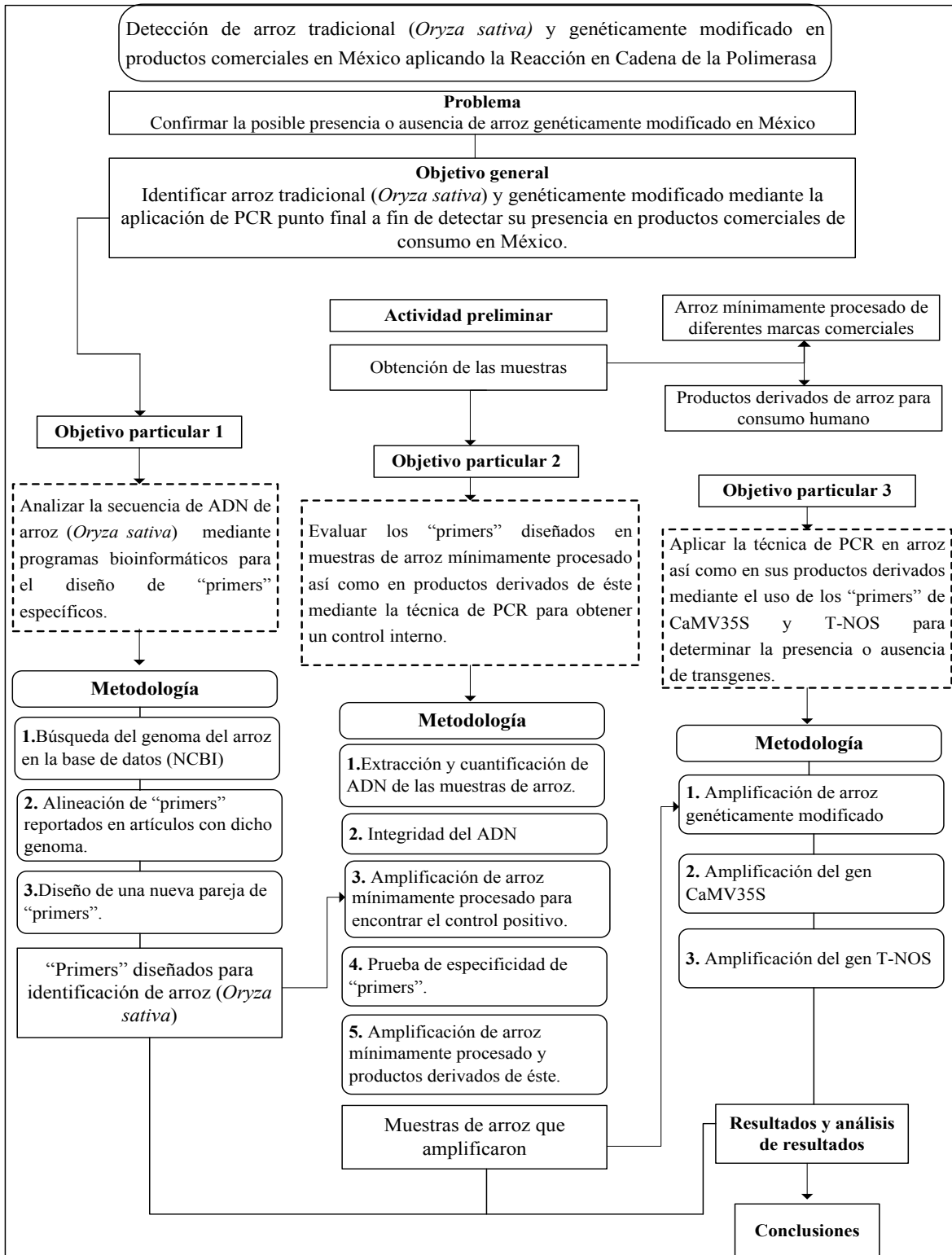


Figura 18. Cuadro metodológico

2.1 Cuadro metodológico

La metodología llevada a cabo para la realización de este proyecto se muestra en la Figura 18.

2.1.1 Descripción del cuadro metodológico

La experimentación para este proyecto se compone de 3 objetivos particulares que se describen a continuación, cuyo fin es identificar la posible presencia de arroz genéticamente modificado no reportado en el etiquetado en productos de consumo en México.

Objetivo general: Identificar arroz tradicional (*Oryza sativa*) y genéticamente modificado mediante la aplicación de PCR punto final a fin de detectar su presencia en productos comerciales de consumo en México.

Objetivo particular 1: Analizar la secuencia de ADN de arroz (*Oryza sativa*) mediante programas bioinformáticos para el diseño de “primers” específicos.

El diseño de “primers” es importante para el desarrollo de la actividad experimental ya que al buscar una secuencia específica para el arroz se espera que dichos “primers” solo se encuentren en esa especie, además de poder establecer nuestras condiciones de trabajo y el tamaño del amplificado.

- I. Buscar el genoma del arroz en la base de datos del NCBI.
- II. Alinear de los “primers” reportados en artículos para el arroz con el genoma encontrado.
- III. Diseñar los nuevos “primers” frontal y reverso.

Objetivo particular 2: Evaluar los “primers” diseñados en muestras de arroz mínimamente procesado así como en productos derivados de éste mediante la técnica de PCR para obtener un control interno.

Al efectuar la PCR se busca verificar que los “primers” seleccionados sean específicos para el arroz ya que es importante contar con un control interno que nos asegure que la especie

con la que trabajamos es la que realmente queremos y además este objetivo sirve para corroborar si el ADN es amplificable.

- I. Extraer el ADN de todas las muestras de arroz y determinar su integridad en un gel de agarosa, cuantificarlo por medio de su absorbancia para conocer su pureza y concentración.
- II. Evaluar los “primers” diseñados con las muestras de arroz mínimamente procesado mediante PCR punto final para encontrar el control positivo que asegure la eficacia de la reacción en las posteriores experimentaciones, realizar una electroforesis.
- III. Prueba de especificidad de “primers” con muestras de especies filogenéticamente cercanas y lejanas, evaluarla mediante electroforesis.
- IV. Amplificar todas las muestras de arroz mediante PCR punto final y PCR directa, evaluarla mediante electroforesis.

Objetivo particular 3: Aplicar la técnica de PCR en arroz así como en sus productos derivados mediante el uso de los “primers” de CaMV35s y T-NOS para determinar la presencia o ausencia de transgenes.

Al utilizar estos “primers” en la PCR y haber o no amplificado se estaría comprobando si las muestras evaluadas son genéticamente modificadas mediante el uso del promotor CaMV35S y el terminador T-NOS, aquí solo se utilizan las muestras que amplificaron en el Objetivo particular 2.

- I. Amplificar las secuencias parciales de los genes de CaMV35S y T-NOS mediante PCR punto final y PCR directa, evaluarlas mediante electroforesis.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Material biológico

Se trabajó con 21 productos en total, 7 de ellos correspondían a arroz mínimamente procesado¹ mostrados en la Tabla 7, y las 14 restantes eran productos derivados de arroz que pasaron por diversos procesos industriales tales como molienda, tostado, fritura, condimentado y/o extrusión, mostrados en la Tabla 8.

Tabla 7. Generalidades de las unidades experimentales correspondientes a arroz mínimamente procesado

#	Muestra	ID	Marca	Contenido	Precio	Origen	Lote y caducidad
1	Arroz grueso	A1	Zapata	1000 g	\$16	México	702113314 Mayo 2015
2	Arroz grano largo	A2	Verde Valle	750 g	\$17	Uruguay	L3277G2 Octubre 2015
3	Arroz integral	A3	SOS	1000 g	\$17	E.U.A	08014TM1 Marzo 2016
4	Arroz grano largo*	A4	Campo santo	900 g	\$10	E.U.A	703103114 Enero 2015
5	Arroz grano largo	A5	Buena Tierra	1000 g	\$13	E.U.A	701211119 Abril 15
6	Arroz Salvaje	A6	SOS	170 g	\$10	E.U.A	11414T1 Abril 2016
7	Arroz para sushi	A7	SOS	1000 g	\$32.50	E.U.A	112852 Enero 2014

*Presenta etiquetado libre de transgénicos

A cada muestra se le asignó una nomenclatura diferente (ID) para su posterior identificación, la selección de éstas se hizo de acuerdo al país de origen, que fueran productos de consumo en México y a la marca, pues muchas de éstas aparecen en la Guía roja y verde de alimentos transgénicos (Greenpeace, 2013) asegurando ser genéticamente modificados.

¹ La materia prima solo pasó por el proceso de descascarado, selección, limpieza, pulido y empaquetado.

Tabla 8. Generalidades de las unidades experimentales correspondientes a derivados de arroz

#	Muestra	ID	Marca	Contenido	Precio	Origen	Lote y caducidad
1	Arroz pre cocido	V.V	Verde Valle	1000 g	\$21.50	Uruguay	L2044GIA Agosto 2013
2	Arroz para paella enriquecido	Pa	Cristal	750 g	\$39.70	México	10/02/2014 Febrero 2024
3	Chococrispis®	Ch	Kellog's	180 g	\$15	México	9C085T Marzo 2015
4	Cereal de arroz y trigo	Ce	Malt-o-Meal	340 g	\$22	E.U.A	07Ene15CNP Enero 2015
5	Cereal integral	Che	Cheerios de Nestlé	450 g	\$30	México	3330020802 Agosto 2014
6	Barra de arroz y trigo	Ba	Kellog's	22 g	\$4.50	México	CGA23 Septiembre 2014
7	Barra de arroz y cacahuete	Bac	Otuggi	16 g	\$3.50	México	1405152 Mayo 2015
8	Galleta de arroz con sal	Ga	Forrelli	90 g	\$16	Polonia	1971732 Septiembre 2014
9	Galleta de arroz	Gac	BinBin	106 g	\$35	Tailandia	06457A Junio 2015
10	Harina de arroz	Ha	Tres Estrellas	200 g	\$11.80	México	N123461 Noviembre 2014
11	Fideo de arroz	Fi	Dongguan	454 g	\$30	China	Agosto 2015
12	Chocolate con arroz	Cr	Crunch de Nestlé	40 g	\$11	México	41000215B2 Febrero 2015
13	Vinagre de arroz	Vi	Kaporo	310 g	\$18.40	México	211211VRS Diciembre 2013
14	Palomitas de arroz	Pal	Otuggi	75 g	\$20	México	14042428 Mayo 2015

2.2.2 Diseño de “primers”

Metodología

1. Para el diseño de “primers” se accedió a la página del “Nacional Center for Biotechnology Information” (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Toda la metodología de acuerdo a como se realizó en la página del NCBI se muestra en el Anexo 1.
2. Para este proyecto se diseñaron 2 parejas de “primers” para la identificación de arroz (*Oryza sativa*) mediante el programa bioinformático “Primer-BLAST” (NCBI, 2014) partiendo de secuencias ya evaluadas en el artículo de Nakamura y Othsubo (2010), en éste se reportaban varias parejas de “primers”, así que se seleccionaron

la A7² y la PRR³ para alinearlas con el genoma del arroz. El programa de “Primer-BLAST” diseñó 10 parejas en total, de éstas; solo se seleccionaron las 2 que cumplían en su mayoría con las consideraciones mencionadas en la Tabla 6 del presente estudio.

3. La T_m se obtuvo mediante 3 métodos (por ser uno de los factores críticos de la PCR) el primero fue proporcionado por “Primer-BLAST” al momento de diseñar los “primers”, el segundo fue la fórmula de Wallace-Ikatura (cálculos mostrados en el Anexo 2) y el tercero fue el método de “Nearest-Neighbor” (IDT, 2014). Las temperaturas de hibridación se muestran en la Tabla 9, se corroboró que no hubiera más de 2 °C de diferencia entre cada pareja.
4. El contenido de G y C afecta directamente la T_m, por ello, es importante que éste se encuentre entre 40 y 60% (Tabla 9).

Tabla 9. Temperatura de hibridación para los “primers” diseñados

	“Primer”	T _m * (°C)	T _m ** (°C)	T _m *** (°C)	CG%
Pareja 1	Frontal	59.50	64	56.1	45.45
	Reverso	59.47	62	56.7	55
Pareja 2	Frontal	60.12	68	56.1	47.83
	Reverso	59.68	62	57	55
* T _m obtenida del diseño de “primers” (NCBI, 2014).					
** Cálculo de T _m de acuerdo a la fórmula de Wallace-Ikatura.					
***T _m de acuerdo al método de “Nearest-Neighbor” (IDT, 2014).					

Para el desarrollo de la metodología experimental se usó un juego de micropipetas *Rainin* con volúmenes de 0.5 - 1000 µL, puntas estériles para micropipeta y guantes de látex.

2.2.3 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se evaluaron 2 protocolos: uno el propuesto por Sambrook y Russell (2001), basado en la desintegración del tejido usando detergentes y proteinasa K para liberar el contenido celular, extracción de polisacáridos y proteínas con una mezcla de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico para finalmente precipitar el ADN con etanol, el

² “Primers” con un amplificado de 550 pb identificaban 4 variedades distintas de arroz.

³ “Primers” con un amplificado de 420 pb específicos para arroz altamente procesado.

segundo protocolo se siguió de acuerdo al “kit” comercial “Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food” siendo éste último, especial para alimentos procesados.

2.2.3.1 Extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico

Metodología

Lisis celular

1. Se trituraron 5 gramos de la muestra con ayuda del pistilo y el mortero.
2. Se pesaron 0.125 gramos de muestra en la balanza analítica electrónica *Sartorius* y se colocaron en un tubo Eppendorf estéril de 2000 µL.
3. Se agregaron 1250 µL de solución de lisis (Tris-base 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 250 mM, SDS 3 %, pH=8) al tubo.
4. Se agitó en el *Vortex-Genie* hasta observar fragmentos más pequeños⁴.
5. Se adicionaron 7 µL de la enzima proteinasa K *Promega*®.
6. Se colocó la muestra en el Termoblok *Termomixer compact* a 50 °C durante 2 horas.
7. A fin de inactivar la enzima, se aumentó la temperatura en el Termoblok *Termomixer compact* a 60 °C, permaneciendo a esa temperatura durante 1 hora.

Extracción de proteínas y polisacáridos

8. Se esperó a que se enfriara el tubo antes de agregar 250 µL de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (en proporción 25:24:1). Se agitó suavemente por inversión.
9. Se colocó en la microcentrífuga *MiniSpin Plus* a 10000 rpm durante 10 minutos.
10. Posteriormente, se recuperó la fase acuosa superior⁵ y se trasladó a un tubo Eppendorf nuevo.

⁴ Para facilitar la liberación del contenido celular.

⁵ En la fase superior es donde se encuentra el ADN.

Precipitación de ADN

11. Se adicionaron 1000 μL de etanol frío⁶ al 70% y se mezcló suavemente.
12. Se colocó en la microcentrífuga *MiniSpin Plus* a 10000 rpm durante 10 minutos.
13. Se decantó el etanol y se dejó secar en el Termoblok *Termomixer compact* a 37 °C.
14. Una vez que el etanol se evaporó por completo, se agregaron 50 μL de agua libre de nucleasas (pH=7) para suspender el ADN.

2.2.3.2 Extracción con “kit” comercial

Metodología

1. Se trituraron 5 gramos de la muestra con ayuda del pistilo y el mortero.
2. Se pesaron en la balanza analítica electrónica *Sartorius* 0.200 gramos de muestra y se colocaron en un tubo Eppendorf estéril de 2000 μL .
3. Se agregaron 500 μL de “Lysis Buffer A” *Promega*® y 5 μl de la enzima RNasa A *Promega*®.
4. Se agregaron 200 μL de “Lysis Buffer B” *Promega*® y se agitó en el *Vortex- Genie* de 10 a 15 segundos para mezclar correctamente.
5. Se incubó la muestra a temperatura ambiente (22-25 °C) durante 10 minutos.
6. Se agregaron 750 μL de la solución de precipitación *Promega*®, se agitó en el *Vortex-Genie*.
7. Se colocó en la microcentrífuga *MiniSpin Plus* a 10000 rpm durante 10 minutos.
8. Se trasladó la fase acuosa superior a un tubo Eppendorf nuevo.
9. Se agitó la solución de partículas “Magnesil® Paramagnetic” vigorosamente antes de agregarle 50 μL a la fase recuperada. Se agitó en el *Vortex-Genie* durante 15 segundos.
10. Se agregaron 0.8 en volumen de isopropanol⁷. Se invirtió el tubo de 10 a 15 veces para mezclar y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.

⁶ La temperatura del etanol es muy importante para la correcta precipitación del ADN, por lo que se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

⁷ Tomando en cuenta el volumen del líquido, por ejemplo, si había 1000 μL de líquido, se agregaron 800 μL de isopropanol.

11. Se colocó el tubo en la gradilla de separación magnética *MagneSphere*® durante 1 minuto. Dejando el tubo en la gradilla, se decantó la fase líquida.
12. Se retiró el tubo de la gradilla de separación magnética *MagneSphere*® y se agregaron 250 µL de “Lysis Buffer B” *Promega*®, se invirtió el tubo de 2 a 3 veces para mezclarlo. Se colocó de nuevo en la gradilla de separación magnética durante 1 minuto y se decantó la fase líquida.
13. Se agregaron 1000 µL de etanol al 70% y se dejó el tubo en la gradilla de separación magnética durante 1 minuto, se retiró la fase líquida. Este paso se repitió 2 veces más para un total de 3 lavados con etanol.
14. Se dejó secar en el Termoblok *Termomixer compact* a 65 °C durante 10 minutos o hasta evaporar el etanol por completo.
15. Se agregaron 50 µL de “TE Buffer” *Promega*®, para suspender el ADN y se incubó a 65 °C en el Termoblok *Termomixer compact* durante 5 minutos.

2.2.4 Cuantificación de ADN por medio de su absorbancia

Metodología

1. Para calibrar el espectrofotómetro *Accesolab NanoDrop ND-1000*, se colocaron 2 µL de agua libre de nucleasas (pH=7) en el brazo del equipo⁸.
2. Se colocaron nuevamente 2 µL de agua libre de nucleasas/“TE Buffer” *Promega*®. Esta muestra sirvió como blanco por lo que la lectura debía de dar un valor de 0.
3. Se limpió el equipo y se colocaron 2 µL de la muestra de ADN a analizar, se dejó correr el programa y se esperó la lectura a 260 nm.
4. Se registró la concentración de ADN y la relación 260/280.

2.2.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

2.2.5.1 PCR con Master Mix®

Antes de utilizar los “primers” diseñados fue necesario hidratarlos con agua libre de nucleasas a 37 °C en el Termoblok *Termomixer compact* durante 4 horas, los cálculos para su hidratación se muestran en el Anexo 3.

⁸ Para las muestras que fueron extraídas con el protocolo de Sambrook se utilizó agua libre de nucleasas mientras que para las extraídas con el “kit” se utilizó el “TE Buffer” *Promega*®.

Los “primers” utilizados para la identificación de transgénicos fueron tomados de Karamollaoglu et al. (2009) y se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Secuencias de “primers” para la identificación de transgénicos

Primer	Secuencia 5'-3'	Longitud	Tamaño de amplificado	Tm (°C)	CG%
Promotor CaMV 35S (Virus del mosaico de la coliflor)	F: CTCCTACAAATGCCATCA	19	196 pb	56	47.37
	R: GGATAGTGGGATTGTGCGTC	20		62	55
Terminador T-NOS (Terminador de la nopalina sintetasa)	F: GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	20	180 pb	62	55
	R: TTATCCTAGTTTGCGCGCTA	20		58	45

Fuente: Karamollaoglu et al., 2009

Para preparar la reacción se necesitó que los “primers” tuvieran una concentración de 25 μM (para ello se diluyeron 5 μL de “primer” en 45 μL de agua libre de nucleasas) y el ADN una concentración en un rango de 40-80 $\text{ng}/\mu\text{L}$, las reacciones se prepararon de acuerdo al protocolo de *Promega*® para el “kit” de PCR mostrado en la Tabla 11.

Tabla 11. Componentes de la reacción para PCR

Componente	Volumen
Mezcla Master Mix® (50 unidades de <i>Taq</i> polimerasa, 400 μM de cada dNTP y 3 mM de MgCl_2)	12.5 μL
“Primer” frontal 25 μM	0.5 μL
“Primer” reverso 25 μM	0.5 μL
Agua libre de nucleasas	10.5 μL
ADN (concentración de 40 - 80 $\text{ng}/\mu\text{L}$)	1 μL
Volumen final	25 μL

Metodología

1. Se colocaron cada uno de los componentes⁹ mostrados en la Tabla 11 en un tubo Eppendorf para PCR.

⁹ Para concentraciones de ADN < a 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ se utilizaron 1.5 μL de ADN, para concentraciones > a 80 $\text{ng}/\mu\text{L}$ se utilizaron 0.5 μL de ADN, por lo que la cantidad de agua libre de nucleasas se ajustó para un volumen final de 25 μL .

2. Para cada reacción de PCR se incluyó una muestra en blanco¹⁰ y un control positivo.
3. Se programó el Termociclador *Apollo ATC401 CLP* con las condiciones detalladas en las Figuras 19 y 20.

Para la identificación de arroz tradicional se utilizó el programa propuesto por Ohtsubo et al. (2008), las condiciones se muestran en la Figura 19.

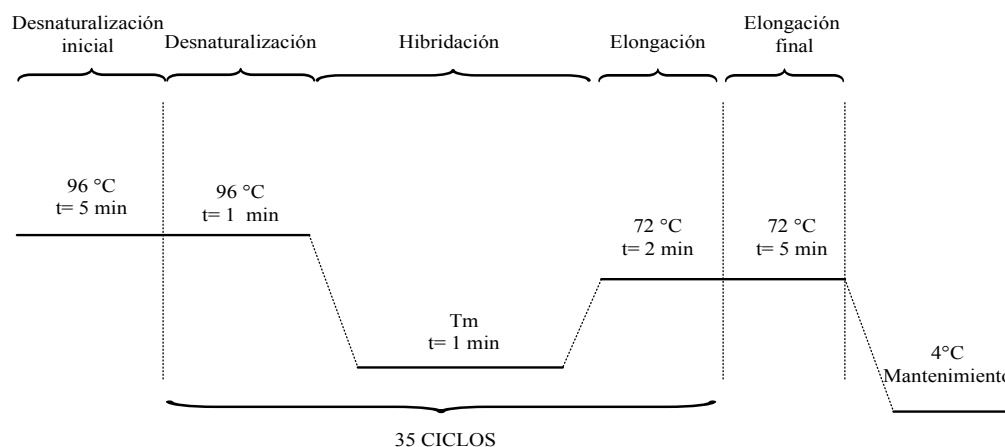


Figura 19. Etapas y condiciones programadas en el termociclador para la identificación de arroz tradicional.

Para la identificación de OGM se utilizó el programa propuesto por Paredes (2013), utilizando una T_m de 60 °C y 40 ciclos. Las condiciones se muestran en la Figura 20.

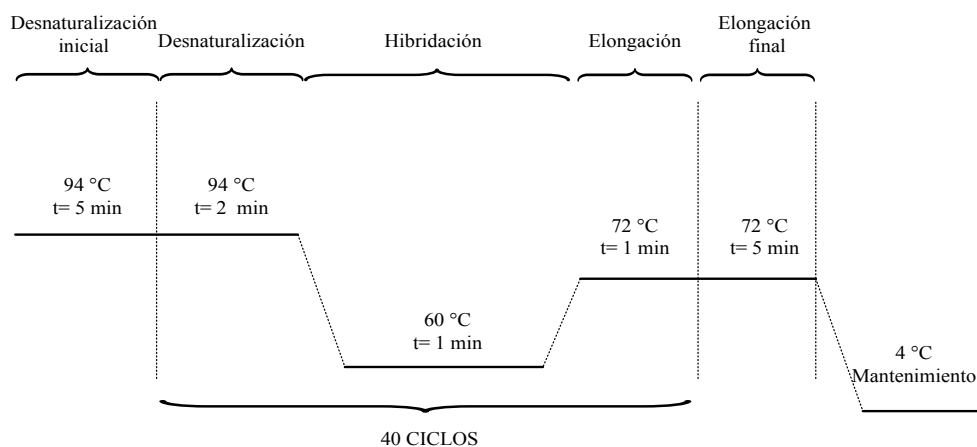


Figura 20. Etapas y condiciones programadas en el termociclador para la identificación de OGM

¹⁰ Se agregó agua libre de nucleasas en lugar de ADN.

2.2.5.2 PCR directa

Para hacer PCR directa la reacción se preparó de acuerdo al protocolo propuesto en el “kit” “Phire® Plant Direct PCR”. Los reactivos utilizados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Componentes de la reacción para PCR directa

Componente	Volumen
2x Phire® Plant PCR Bufer Primer	10 µL
“Primer” frontal 25 µM	0.5 µL
“Primer2 reverso 25 µM	0.5 µL
Phire® Hot Start DNA polimerasa	0.4 µL
Agua libre de nucleasas	7.6 µL
ADN (concentración de 40 - 80 ng/µL)	1 µL
Volumen final	20 µL

Se utilizó esta PCR tanto para la identificación de arroz tradicional como para la detección de transgénicos, las condiciones del programa se muestran en la Figura 21 y se establecieron de acuerdo a lo propuesto en el “kit” utilizando la T_m correspondiente a cada pareja de “primers”.

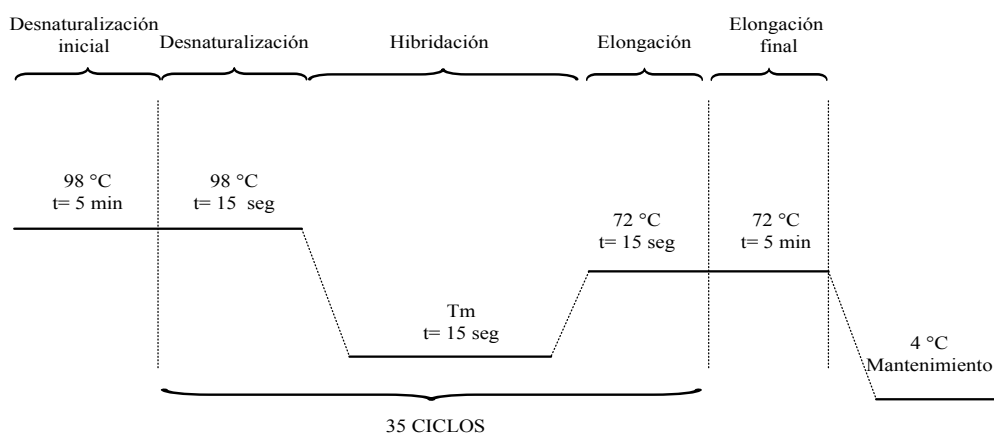


Figura 21. Etapas y condiciones programadas en el termociclador para PCR directa

2.2.6 Electroforesis en gel de agarosa

Una vez finalizada la PCR los productos se analizaron en un gel de agarosa, para la identificación de arroz tradicional se utilizó una concentración de 0.7 %, mientras que para la PCR de transgénicos se usó un gel al 2.5 %¹¹.

Metodología

Preparación del gel

1. Para el gel de agarosa al 0.7 % se pesaron 0.35 gramos de agarosa *GibcoERL* en la balanza analítica electrónica *Sartorius*; en un matraz Erlenmeyer de 200 mL y se agregaron 50 mL de Tris acetato y EDTA (TAE 1X) como solución buffer (pH=8).
2. Se disolvió en el microondas *Panasonic®* y se dejó enfriar a temperatura ambiente sin que gelificara, luego se agregó una gota de bromuro de etidio (BrEt) y se homogeneizó.
3. Se colocó el peine en el soporte, se vació el líquido y se dejó gelificar.
4. Se agregó TAE 1X hasta cubrir el gel en la cámara de electroforesis *Apollo 75.10*.

Carga y corrida del gel

5. Se colocaron sobre el parafilm 3 µL de BrEt, 3 µL de colorante blue/orange 6X, *Promega®* y 5 µL del producto de la PCR, se homogeneizó.
6. Se colocaron sobre el parafilm 3 µL de BrEt, 3 µL de colorante blue/orange 6X, *Promega®* y 3 µL de marcador de peso molecular de 100 pb *Promega®*.
7. Posteriormente se colocaron las muestras en cada carril del gel.
8. Una vez cargado el gel, se cerró la cámara y se conectó a la fuente de poder *BioRad Power Pac 200* y se corrió a 90 V.

¹¹ La concentración de agarosa depende del tamaño del segmento de ADN, a mayor tamaño, menor es la concentración a emplear (Somma y Querci, 2007).

2.2.6.1 Visualización de los geles de agarosa

La visualización de los geles se llevó a cabo en un transluminador de luz UV *Claver Scientific LTD*, un equipo especial para fotografía de luz UV *Kodak Digital Science* y una cámara fotográfica *DC40*, de esta manera se detecta el BrEt intercalado en el ADN.

Metodología

1. Se colocó el gel en el fotodocumentador, se encendió el equipo y la cámara.
2. Se tomó una foto del gel, la imagen posteriormente se envió a la computadora.

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Objetivo particular 1

3.1.1 “Primers” diseñados para la identificación de arroz (*Oryza sativa*).

Los “primers” diseñados para la identificación de arroz tradicional se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Secuencias de “primers” diseñados para la identificación de arroz

Secuencia de “primers” (5’ – 3’)	Amplificado	Gen que codifica para :
F: TGAGTCTCAAACCAGACACCAA (22 pb)	600 pb	Proteína del cromosoma 11
R: TCGAGCCCTGTGTGATCTTC (20 pb)		
F: GTCGATGGTTAAGTCACTGTTGC (23 pb)	660 pb	Proteína del cromosoma 4
R: ACACCTGAACCATCTGTCCG (20 pb)		

Las secuencias amplificadas de ADN esperadas para cada pareja de “primers” se muestran en las Figuras 22 y 23, las secuencias señaladas corresponden a los “primers” diseñados.

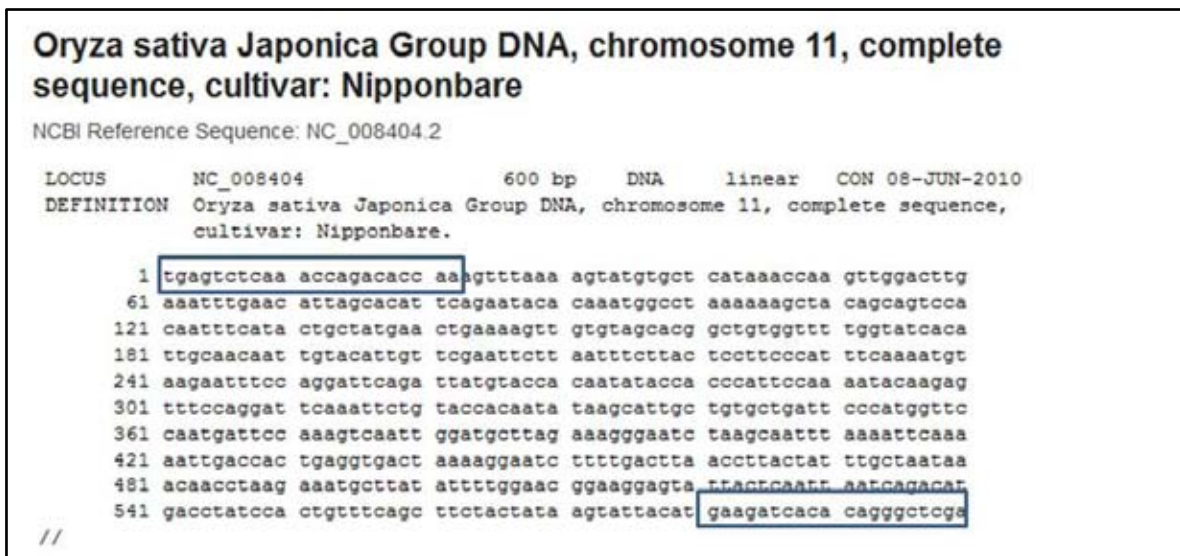


Figura 22. Secuencia de ADN amplificado con el uso de los “primers” diseñados a partir de un gen del cromosoma 4 del arroz que codifica para una proteína. Fuente: NCBI, 2014

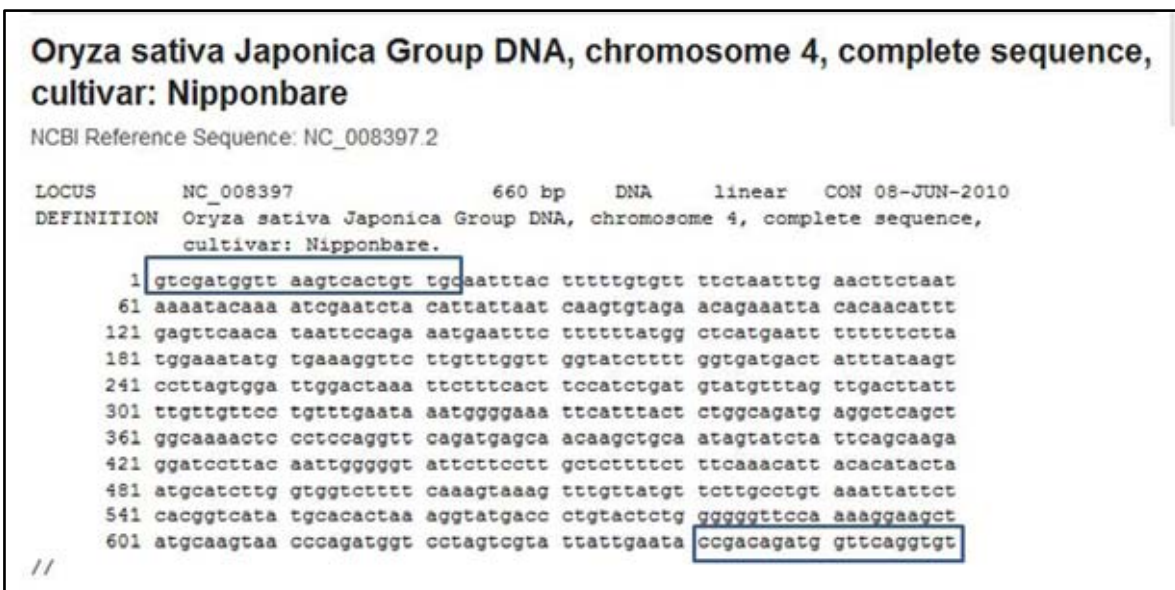


Figura 23. Secuencia de ADN amplificado con el uso de los “primers” diseñados a partir de un gen del cromosoma 4 del arroz que codifica para una proteína. Fuente: NCBI, 2014

3.2 Objetivo particular 2

3.2.1 Extracción y cuantificación de ADN de las muestras de arroz

Una vez que los “primers” fueron diseñados fue necesario probarlos mediante PCR, el principal componente para llevar a cabo la reacción, es el ADN, así que primero se extrajo de las muestras de arroz mínimamente procesado y de productos derivados de éste y se determinó su concentración.

El ADN en exceso puede afectar a la PCR, por ello, aquellas concentraciones que fueron muy altas se diluyeron con agua libre de nucleasas hasta alcanzar una concentración que estuviera en un rango entre 40-80 ng/μL, que es la óptima para que el ADN se pueda replicar sin que interfiera en la PCR permitiendo la correcta hibridación de los “primers”. Las concentraciones se presentan en las Tablas 14 y 15, para algunas muestras se tuvieron concentraciones fuera del rango esperado y para algunas otras fue imposible su cuantificación, principalmente para los productos derivados de arroz, por ello se utilizó el “kit” comercial para alimentos altamente procesados, en algunos de éstos, ya no fue necesario diluir el ADN pues éste ya tenía la concentración adecuada para ser evaluado directamente por PCR.

Tabla 14. Concentración de ADN de arroz mínimamente procesado

#	Muestra	ID	Método de extracción	Concentración inicial		Concentración final	
				260/280	ng/μL	260/280	ng/μL
1	Arroz grueso	A1	Fenol-	1.76	1083.5	1.78	64.4
2	Arroz grano largo	A2	cloroformo-	1.72	843.7	1.82	68.2
3	Arroz integral	A3	alcohol	1.48	349.5	1.51	99.3
4	Arroz grano largo	A4	isoamílico	1.80	1478.9	1.83	73.1
5	Arroz grano largo	A5	(Protocolo de Sambrook)	1.88	2271.7	1.85	98.1
6	Arroz Salvaje	A6	“Kit”	-	-	1.83	82.44
7	Arroz para sushi	A7	comercial	-	-	1.42	72.60

Tabla 15. Concentración de ADN de productos derivados de arroz

#	Muestra	ID	Método de extracción	Concentración inicial		Concentración final	
				260/280	ng/μL	260/280	ng/μL
1	Arroz pre cocido	V.V		-	-	1.71	34.74
2	Arroz para paella enriquecido	Pa	“Kit” comercial	-	-	1.51	83.10
3	Chococrispis®	Ch		1.44	1245.6	1.53	75
4	Cereal de arroz y trigo	Ce	Sambrook/”Kit”	1.41	1080.9	1.44	76.8
5	Cereal integral	Che	comercial	1.65	1546.9	1.62	64
6	Barra de arroz y trigo	Ba		-	-	1.80	88.7
7	Barra de arroz y cacahuete	Bac		1.48	770.9	1.51	64.8
8	Galleta de arroz con sal	Ga	Protocolo de Sambrook	1.61	1065.4	1.65	82.4
9	Galleta de arroz	Gac		1.54	906.6	1.67	92.3
10	Harina de arroz	Ha		1.84	1097.6	1.88	67
11	Fideo de arroz	Fi		1.98	773.3	1.97	63.8
12	Chocolate con arroz	Cr		-	-	2.09	60.91
13	Vinagre de arroz	Vi	“Kit” comercial	-	-	1.69	33.57
14	Palomitas de arroz	Pal	Sambrook	1.61	1065.4	1.65	82.4

También se determinó la pureza del ADN mediante la relación 260/280, pues si éste no es lo suficientemente puro, la *Taq* polimerasa no funcionaría correctamente, valores cercanos a 1.8 significaban que el ADN extraído tenía la pureza óptima para la PCR, lo cual solo se cumplió para la mayoría de las muestras de arroz mínimamente procesado, mostradas en la Tabla 14, para la barra de arroz y trigo, así como la harina de arroz, mostradas en la Tabla 15.

Valores menores a 1.8 significaban que pudo haber contaminación con proteínas propias del alimento, pues aunque el contenido de proteínas en el arroz no rebasa el 8%, cuando se trata de productos derivados, éstos se encuentran mezclados con otros componentes para su procesamiento, también valores por debajo de 1.8, se deben al fenol, isopropanol o etanol que no se eliminó por completo durante la extracción. De acuerdo a la relación 260/280 se observó que el ADN era más puro en las muestras de arroz mínimamente procesado.

3.2.1.1 Integridad del ADN

Aunque ya se había efectuado la cuantificación, para corroborar la presencia del ADN extraído, su integridad y pureza; se corrieron las muestras sin diluir en un gel de agarosa.

Para los productos mínimamente procesados así como para la harina de arroz, se confirmó la presencia de ADN mediante una banda de alto peso molecular (Figura 24 y Figura 25a), sin embargo, para los productos derivados de arroz, no se observó nada o éste estaba totalmente fragmentado, pues lo óptimo hubiera sido observar una banda bien definida en la parte superior del gel.

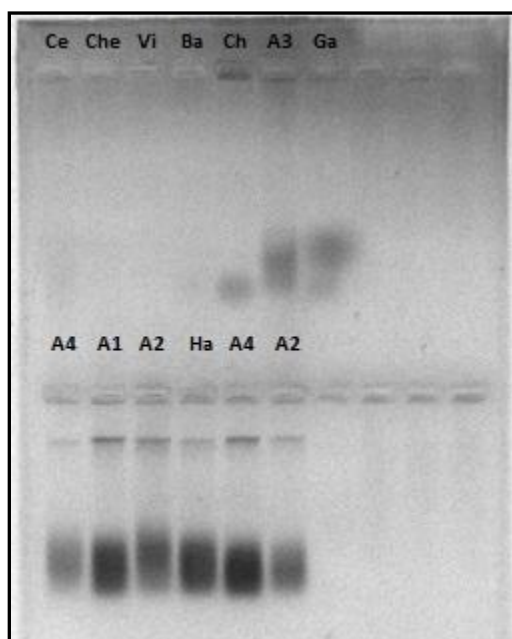


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 1% a 90 V para comprobar la presencia, integridad y pureza del ADN extraído con el protocolo de Sambrook

Aunque la relación 260/280 de las muestras de arroz mínimamente procesado fue la más cercana a 1.8, al correr las muestras, se observó que el ADN no era tan puro, esto es, un barrido de bajo peso molecular en el gel de agarosa.

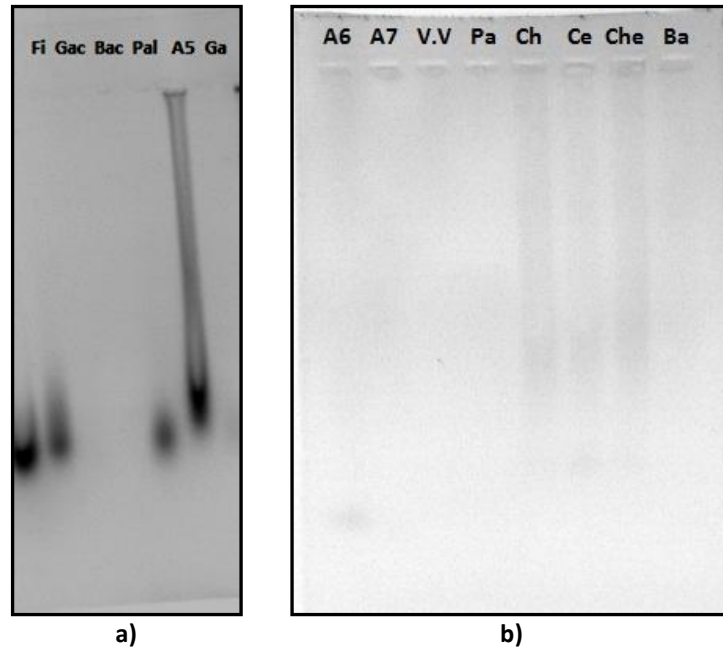


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 1% a 90 V para comprobar la presencia, integridad y pureza del ADN extraído con a) protocolo de Sambrook b) “kit” comercial

En la Figura 25b, se muestra la electroforesis para el ADN extraído con el “kit” comercial, sin embargo no hubo bandas de alto peso molecular, pese a haber obtenido concentraciones correspondientes a la presencia de ADN en su cuantificación; ni barridos de bajo peso molecular, sin embargo, el “kit” Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food” también fue evaluado por Jinxia et al. (2011) para productos derivados de arroz reportando relaciones 260/280 que iban desde 1.4 a 1.9, y al evaluarlos en un gel de agarosa tampoco se observaron bandas que indicaran su pureza o presencia.

Las técnicas biomoleculares son ampliamente utilizadas, pero también presentan ciertas dificultades, especialmente cuando se trata de extraer el ADN de alimentos que fueron sometidos a tratamientos severos durante su procesamiento (cocción, extrusión, secado, cambio en su pH), la pureza e integridad del ADN es un factor muy importante, por lo que utilizar el protocolo de extracción adecuado es necesario; es decir, un método que permita eliminar las sustancias inhibidoras y que al mismo tiempo, conserve íntegro el ADN.

3.2.2 Amplificación de arroz mínimamente procesado (control positivo)

Un control positivo es, una muestra de ADN que asegure que la PCR se lleva a cabo de manera adecuada siempre que se realiza, para encontrar nuestro control positivo se eligió la muestra A4 debido a que por su relación 260/280 fue una de las más puras comparada con las otras muestras de arroz mínimamente procesado, se evaluó mediante PCR con las 2 parejas de “primers” diseñadas a una Tm de 56 °C utilizando las condiciones del programa de la Figura 19. Los resultados se muestran en la Figura 26.

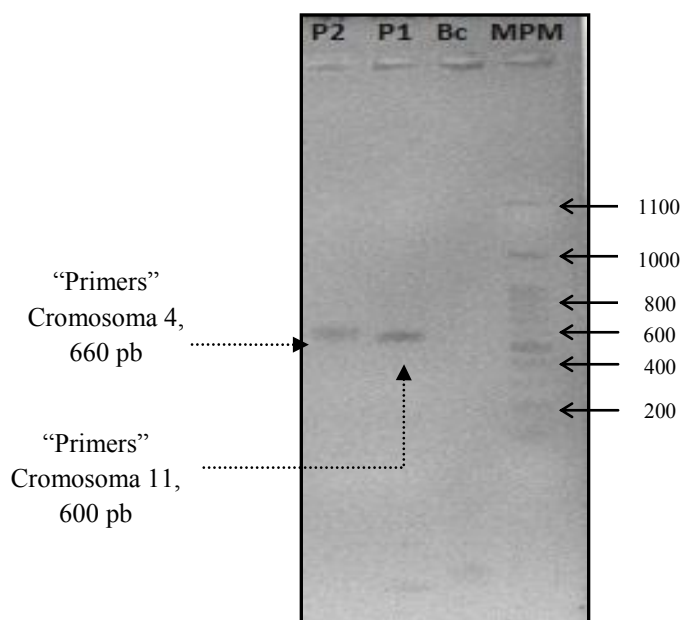


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% a 90 V con ambas parejas de “primers” para la amplificación de arroz mínimamente procesado; (MPM) marcador de peso molecular de 100 pb; (Bc) blanco; (P1) “primers” del cromosoma 11 del arroz; (P2) “primers” del cromosoma 4 del arroz.

Se probó inicialmente la Tm de 56 °C, por ser la calculada con el método de “Nearest-Neighbor” pues ésta contempla la entalpía, la entropía, los cationes mono y divalentes así como la composición de las bases (Von Ahsen et al., 2001), mientras que la Tm calculada con la fórmula de Wallace-Ikatara solo es exacta para secuencias de 14-20 pb, además de que no toma en cuenta la fuerza iónica, se corroboró que a 56 °C las 2 parejas de “primers” diseñadas amplificaron, lo cual permitió la identificación de arroz y además se comprobó la eficiencia de calcular la Tm con el método de “Nearest-Neighbor”, de no haberse obtenido amplificado a esa temperatura se hubieran probado las otras alternativas de Tm hasta

encontrar la adecuada, la muestra A4 fue utilizada como control positivo en las siguientes experimentaciones.

3.2.3 Prueba de especificidad de “primers” para arroz tradicional

Una vez que se sabía que el ADN era amplificable se realizó una prueba de especificidad de “primers” para asegurar que estos no hibridaran para otras especies filogenéticamente cercanas, lejanas y que además fueran específicos para arroz, para dicha prueba se utilizaron las muestras de ADN de la Tabla 16.

Tabla 16. Muestras de ADN para la prueba de especificidad de “primers”

Muestra	ID	260/280	ng/ μ L
Maíz	M	1.73	53.4
Papa	P	1.64	82.2
Soya	S	1.76	128.2
Atún	At	1.37	64.4
Miel	Mi	1.53	64.9

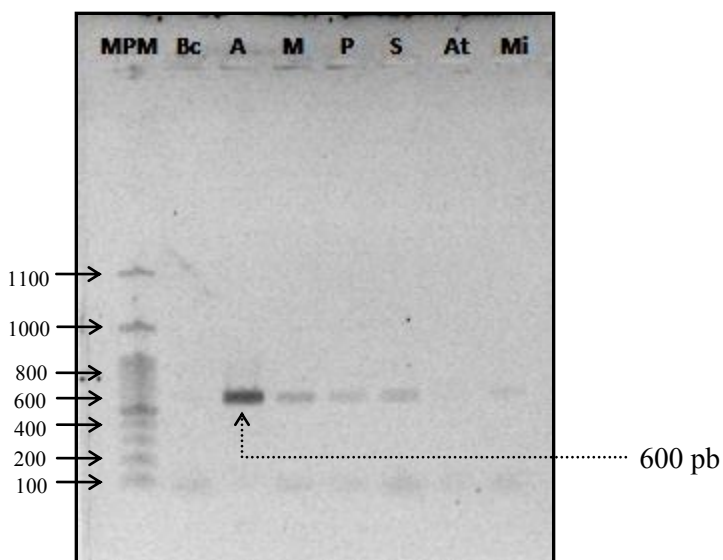


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% a 90 V para especificidad de “primers” diseñados a partir de un gen del cromosoma 11 del arroz que codifica para una proteína;(MPM) marcador de peso molecular de 100 pb; (Bc) blanco; (A) arroz; (M) maíz; (P) papa; (S) soya; (At) atún; (Mi) miel.

Los “primers” diseñados a partir de un gen del cromosoma 11 del arroz que codifica para una proteína, resultaron no ser específicos para la identificación de éste, pues en la Figura 27, aunque de manera tenue, se observó un amplificado de 600 pb para todas las especies

excepto para el atún, no se trató de contaminación ya que en el carril del blanco no hubo amplificado, estos resultados se deben a que se han encontrado homólogos de proteínas, presentes en el arroz, en otros cereales como: maíz, trigo y cebada; asegurando que la similitud del arroz respecto a otros genomas es extensiva (Goff et al., 2005), así que los “primers” diseñados no solo amplificaron para cereales como maíz o arroz, sino en general para especies vegetales (soya, papa y miel).

Ya que la especificidad de los “primers” es un factor importante para fines de este estudio, en donde se esperaba exclusivamente la identificación de arroz, no se pudo trabajar con ellos pese a que la banda en el gel de agarosa fuera más marcada para el arroz.

Se hizo esta misma prueba para la segunda pareja de “primers” diseñados a partir de un gen del cromosoma 4 del arroz que codifica para una proteína. Los resultados se muestran en la Figura 28.

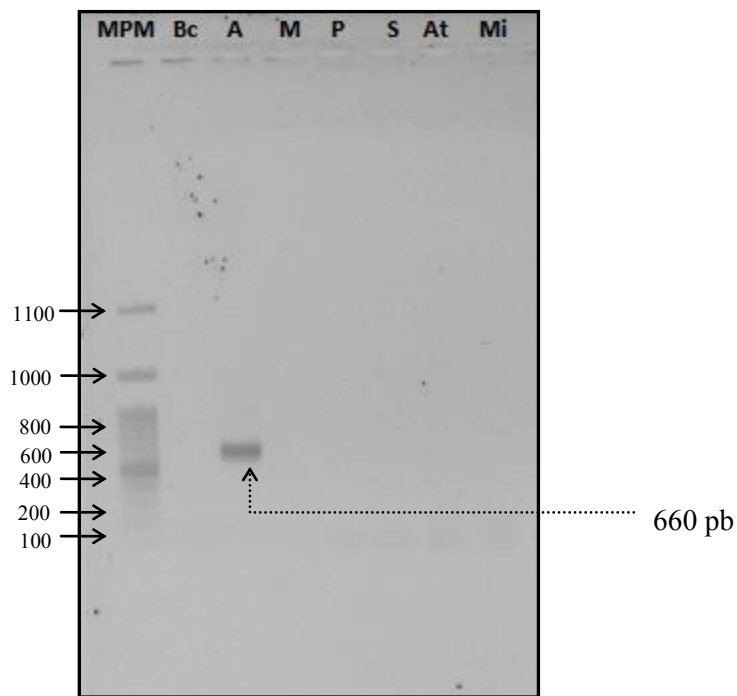


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% a 90 V para especificidad de “primers” diseñados a partir de un gen del cromosoma 4 del arroz que codifica para una proteína ;(MPM) marcador de peso molecular de 100 pb; (Bc) blanco; (A) arroz; (M) maíz; (P) papa; (S) soya; (At) atún; (Mi) miel.

El único amplificado observado pertenecía al carril donde se puso la muestra de arroz, con un tamaño de banda esperado de 660 pb, con esto, se descartó que en la prueba anterior el

ADN de las demás especies haya estado contaminado, por lo tanto, los “primers” diseñados mediante programas bioinformáticos a partir de un gen en el cromosoma 4 que codifica para una proteína, si resultaron ser específicos para la identificación de arroz tradicional.

En la base de datos (NCBI), se aseguraba que la primera pareja de “primers” (cromosoma 11) era específica para arroz y las secuencias de “primers” reportadas por Nakamura y Othsubo (2010) que se utilizaron para hacer el diseño, resultaban también específicas para identificación de 4 tipos diferentes de dicha especie, sin embargo, de manera experimental se comprobó que el gen del cromosoma 11 del arroz que codifica para una proteína, pudiera tener homología con especies filogenéticamente cercanas.

3.2.4 Amplificación de arroz mínimamente procesado y productos derivados

Una vez que se comprobó que los “primers” eran específicos y ya encontrada su T_m , se evaluaron todas las muestras de arroz extraídas.

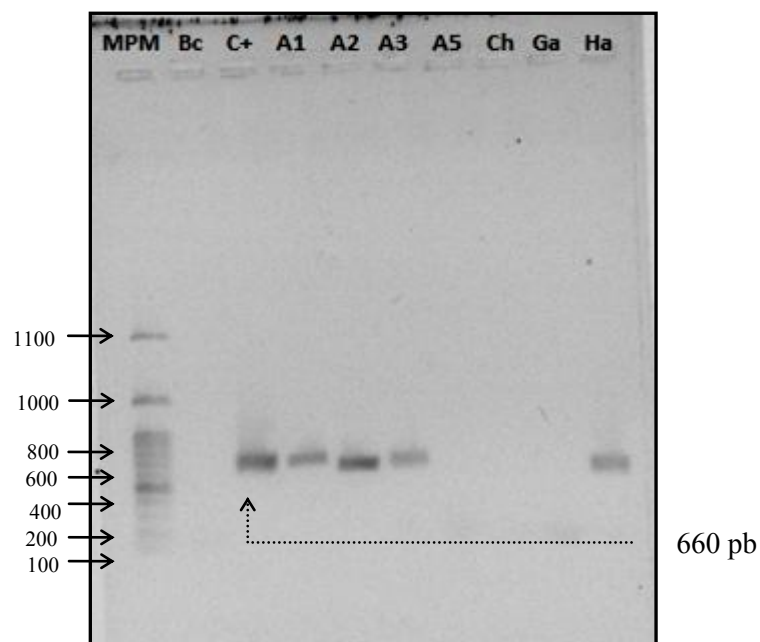


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % a 90 V para identificación de arroz tradicional; (MPM) marcador de peso molecular de 100 pb; (Bc) blanco; (C+) control positivo; (A1) arroz grueso; (A2) arroz grano largo; (A3) arroz integral; (A5) arroz grano largo; (Ch) chococrispis®; (Ga) galleta de arroz con sal; (Ha) harina de arroz.

En la Figura 29 se muestran los resultados de la PCR utilizando Master Mix®, en donde amplificaron 4 de las 7 muestras evaluadas, productos como los Chococrispis® y la galleta de arroz no amplificaron, esto se debe a que son productos que en su proceso pasaron por altas temperaturas, perdiéndose la integridad del ADN, lo mismo pudo haber pasado con la muestra A5, pues aunque no se trataba de un producto procesado, tampoco amplificó. La harina de arroz por su parte es un producto que solo pasó por un proceso de molienda, así que el ADN no se ve tan afectado.

Todas las demás muestras también se evaluaron con Master Mix® pero ninguna amplificó, incluso el control positivo amplificó de manera más tenue para las posteriores experimentaciones con este mismo protocolo, lo cual indicaba que el ADN se estaba fragmentando impidiendo su correcta visualización, por lo que se optó por hacer PCR directa de acuerdo a las condiciones del programa de la Figura 20, con una Tm de 56 °C, el control positivo en todas las pruebas amplificó asegurando la eficacia de la prueba, así como se aseguró que no había contaminación pues en el carril donde se cargó el blanco, nunca se vio una banda.

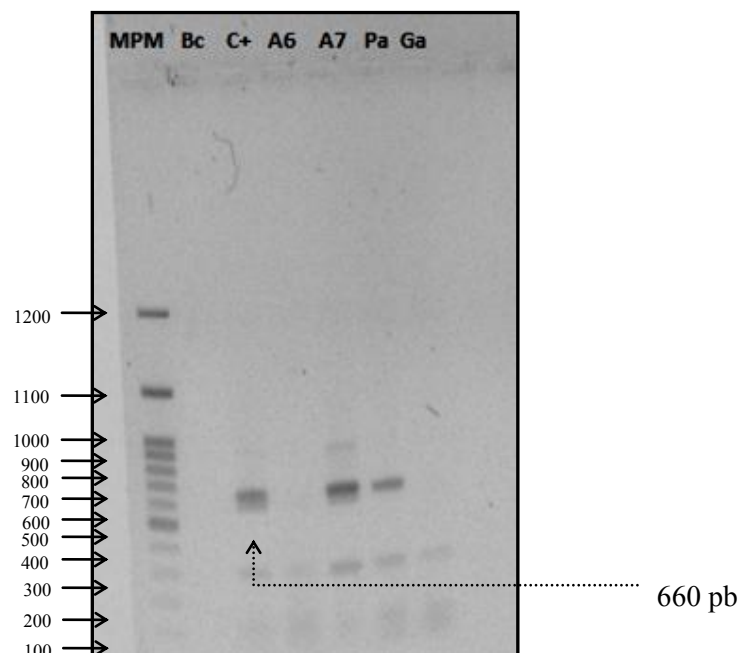


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% a 90 V para identificación de arroz tradicional mediante PCR directa; (MPM) marcador de peso molecular de 100 pb; (Bc) blanco; (C+) control positivo; (A6) arroz salvaje; (A7) arroz grano largo; (Pa) arroz para paella; (Ga) galleta de arroz con sal.

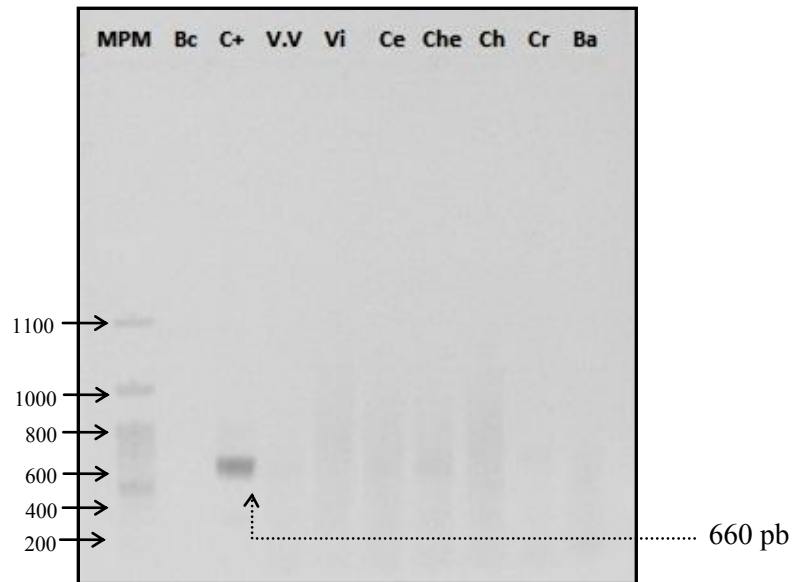


Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% a 90 V para identificación de arroz tradicional mediante PCR directa; (MPM) marcador de peso molecular de 100 pb; (Bc) blanco; (C+) control positivo; (V.V) arroz pre cocido; (Vi) vinagre de arroz; (Ce) cereal de arroz y trigo; (Che) cereal integral; (Ch) chococrispis; (Cr) chocolate con arroz; (Ba) barra de arroz y trigo.

En la Figura 30, se muestran amplificadores para el arroz para sushi y para paella, mientras que en la Figura 31 no hay ningún amplificado salvo el correspondiente al control positivo. Éstas muestras tuvieron un proceso de elaboración a temperaturas altas (80 °C o más), tal es el caso de los cereales o el vinagre, algunos estudios incluso reportan dificultades para amplificar ADN de aceites o vinagres, asegurando que el ADN está tan fragmentado que no podría ni detectarse la presencia de Organismos Genéticamente Modificados en éstos (Jinxia et al., 2011), se infiere de acuerdo a los resultados que la enzima que se utiliza en la PCR directa posee mayor sensibilidad y por ello reconoce ADN fragmentado, es por ello que en los geles se ven otras bandas de menor o mayor peso molecular al esperado y barridos como se observa en la Figura 32. Con PCR directa si amplificó la muestra A5 que no había amplificado utilizando Master Mix®.

El decir que el ADN está éste fragmentado significa que se forman secuencias más pequeñas, la pareja de “primers” fue diseñada para amplificar fragmentos de 660 pb, por lo que ésta podría ser otra razón por la que no se obtuvieron los resultados esperados pues el tamaño del amplificado era muy grande, otro factor que pudo haber influido en la experimentación son los inhibidores de la PCR, éstos pueden interferir en la reacción en

distintos niveles, ya sea disminuyendo o impidiendo por completo la acción de la *Taq* polimerasa, estos inhibidores pueden ser algunos componentes propios del alimento, como es el caso del chocolate, sales y grasas que probablemente no se eliminaron pese a los protocolos de extracción evaluados.

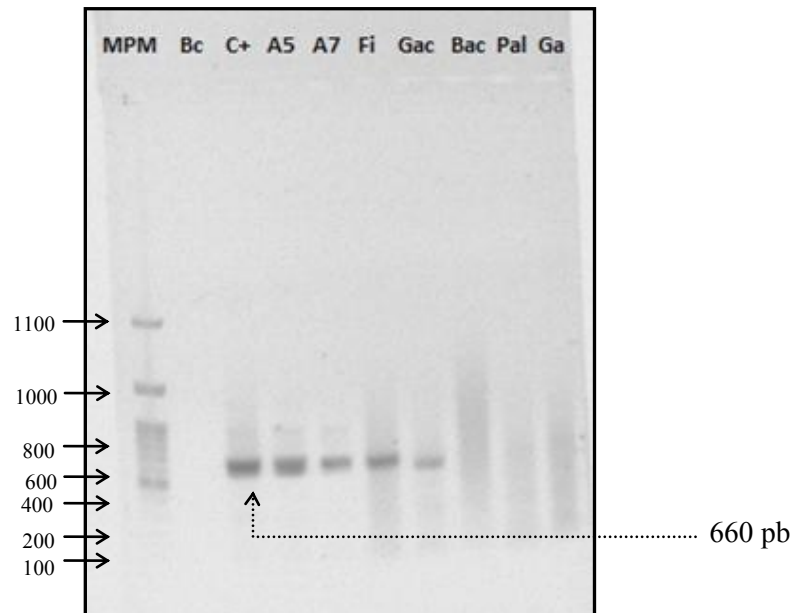


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% a 90 V para identificación de arroz tradicional mediante PCR directa; (MPM) marcador de peso molecular de 100 pb; (Bc) blanco; (C+) control positivo; (A5) arroz grano largo; (A7) arroz para sushi; (Fi) fideo de arroz; (Gac) galleta de arroz; (Bac) barra de arroz y cacahuete; (Pal) palomitas de arroz; (Ga) galleta de arroz con sal.

Pese a que el “kit” que se utilizó era específico para alimentos procesados se obtuvieron mejores resultados con el protocolo de Sambrook, ya que de las 10 muestras extraídas con el “kit” solo 2 de éstas amplificaron , en general los “kits” de extracción son altamente eficientes, sin embargo, tal vez debido al alto procesamiento de las muestras, se debió de haber utilizado una mayor cantidad de producto para hacer la extracción, sin embargo en el laboratorio no se cuenta con el material para trabajar con esas cantidades de muestra, de las 21 muestras evaluadas para este proyecto solo amplificaron 6 correspondientes a arroz mínimamente procesado y 4 para productos derivados de arroz.

3.3 Objetivo particular 3

3.3.1 Amplificación de arroz genéticamente modificado

Para el último objetivo solo se evaluaron las muestras que amplificaron en el Objetivo 2 ya que esto aseguraba que el ADN era amplificable y que se trataba de muestras que en realidad contenían arroz. Mediante la técnica de PCR se buscó detectar la secuencia parcial de los genes de CaMV35S y T-NOS, esto es porque el promotor de CaMV35S es una de las secuencias más comunes para introducir genes en especies vegetales controlando su expresión, definiendo la secuencia de aminoácidos de un gen en particular y el T-NOS es utilizado en la Ingeniería Genética; pues determina donde acaba la expresión del gen durante la producción de proteínas.

3.3.1.1 Amplificación del gen CaMV35S

Para las muestras que amplificaron en la PCR con la mezcla de Master Mix® se siguió el programa de PCR de la Figura 20, mientras que para las que amplificaron con PCR directa se tomaron las condiciones de la Figura 21, respetando la temperatura de hibridación de los “primers” de la Tabla 10, que es de 60 °C.

Para asegurar la presencia de transgénicos se utilizaron como controles positivos: una muestra de maíz transgénico que contenía el gen de CaMV35S y una de canola que amplificó para T-NOS, la pureza y concentración de dichas muestras se especifican en la Tabla 17.

Tabla 17. Controles positivos para CaMV35S y T-NOS

Muestra	C+	260/280	ng/μL
Maíz	CaMV35S	1.73	53.4
Canola	T-NOS	1.6	29.3

En la Figura 33 solo se observa el amplificado del control positivo a 195 pb que indica que la reacción se llevó a cabo adecuadamente, en este gel se evaluaron 5 de las 10 muestras, es decir, las correspondientes a la PCR que se hizo con Master Mix®, para 4 de las muestras de arroz mínimamente procesado no hubo presencia del promotor CaMV35S, tampoco para la harina de arroz.

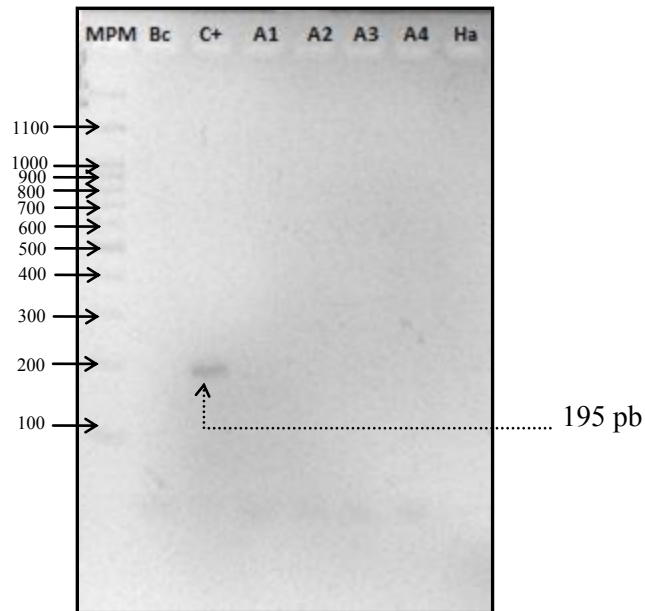


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 65 V para amplificación del gen de CaMV35S; (MPM) marcador de peso molecular de 100 pb; (Bc) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico; (A1) arroz grueso; (A2) arroz grano largo; (A3) arroz integral; (A4) arroz grano largo; (Ha) harina de arroz.

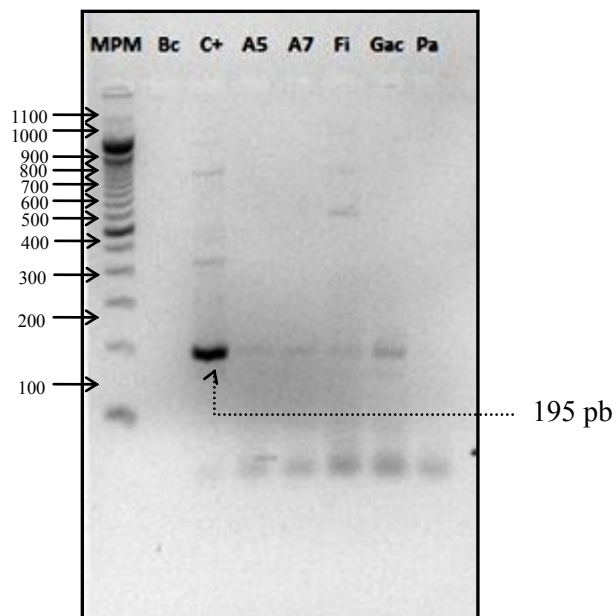


Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 65 V para amplificación del gen de CaMV35S mediante PCR directa; (MPM) marcador de peso molecular de 100 pb; (Bc) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico; (A5) arroz grano largo; (A7) arroz para sushi; (Fi) fideo de arroz; (Gac) galleta de arroz; (Pa) arroz para paella.

Por otro lado en la Figura 34 se observan los resultados de la PCR directa, notando que hay presencia del gen CaMV35S para las 2 muestras restantes de arroz mínimamente procesado al haber amplificado a 195 pb, así como para 2 productos comerciales que son: el fideo de arroz y las galletas, se aprecia que el ADN del fideo de arroz está fragmentado por ello hay una banda de mayor peso molecular en el gel, éstos productos son de China y Tailandia respectivamente por lo que encontrar amplificado para este gen era algo probable pues éste cereal es uno de los más consumidos en Asia y su mejoramiento genético es una necesidad para diversos fines, sin embargo, son productos que se consumen en México y no tienen ningún etiquetado que reporte la presencia de OGM.

3.3.1.2 Amplificación del gen T-NOS

Una vez que se evaluaron todas las muestras con CaMV35S se hizo lo mismo para la amplificación de T-NOS, primero se efectuó una PCR usando Master Mix® en la que no hubo amplificado más que el de la canola transgénica a 180 pb, lo cual indicaba la eficacia de la prueba, tal como se muestra en la Figura 35, por lo tanto se confirmó que las muestras de arroz mínimamente procesado, así como la harina de arroz no contenían el gen T-NOS.

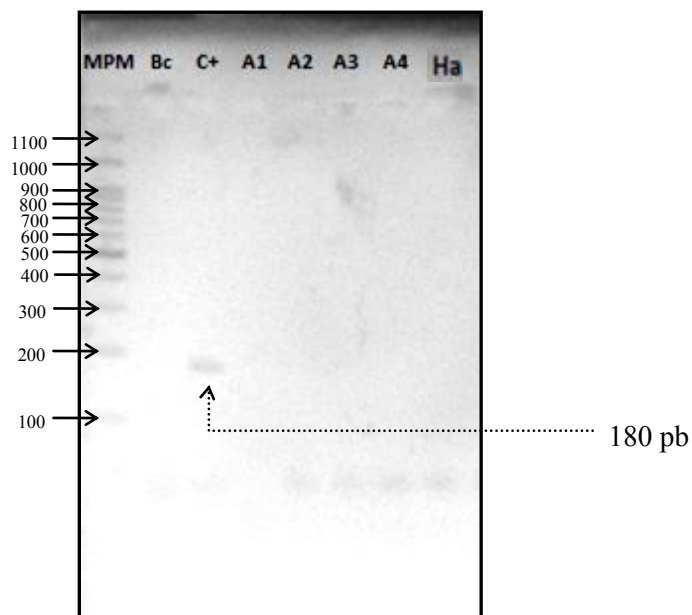


Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 65 V para amplificación del gen de T-NOS; (MPM) marcador de peso molecular de 100 pb; (Bc) blanco; (C+) control positivo canola transgénica; (A1) arroz grueso; (A2) arroz grano largo; (A3) arroz integral; (A4) arroz grano largo; (Ha) harina de arroz.

Cuando se hizo la PCR directa se observaron amplificados para todas las muestras evaluadas (Figura 36) aunque la banda para la muestra A7 era muy tenue, esto fue porque el ADN estaba tan fragmentado que incluso la enzima reconoció 2 bandas de alto peso molecular diferentes a la esperada, lo mismo para el fideo y la galleta de arroz, se confirmó que no se trataba de contaminación pues la intensidad de las bandas fue diferente para cada caso y en el blanco no hubo amplificado, se identificó que las muestras A5, A7, el fideo de arroz y la galleta contaban tanto con la secuencia de CaMV35S como con la de T-NOS, el arroz para paella solo amplificó para T-NOS, esto es porque no siempre se utilizan los mismos promotores y terminadores, por ejemplo el arroz resistente a insectos, que es uno de los más utilizados en China conocido como el evento TT51-1; está regulado por el promotor *Actin 1* y el terminador T-NOS (Wu et al., 2010).

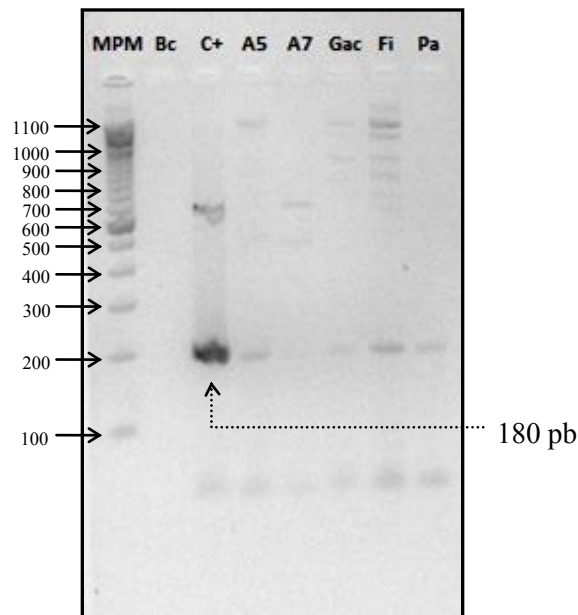


Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 65 V para amplificación del gen de T-NOS mediante PCR directa; (MPM) marcador de peso molecular de 100 pb; (Bc) blanco; (C+) control positivo canola transgénica; (A5) arroz grano largo; (A7) arroz para sushi; (Gac) galleta de arroz; (Fi) fideo de arroz; (Pa) arroz para paella.

Se pudo encontrar presencia de transgénicos en muestras altamente procesadas como las galletas de arroz, por lo que el ADN no se fragmentó lo suficiente pese al tratamiento y por lo tanto la identificación de OGM es posible, por lo que ésta debería de estar reportada en el etiquetado pues es derecho del consumidor decidir y saber lo que come.

Se comprobó que también era posible realizar PCR directa para la identificación de arroz mínimamente procesado y sus productos derivados, así como para detectar la presencia de transgénicos, hacer PCR directa con el “kit” para plantas tuvo como ventaja que se disminuyó el tiempo de experimentación, pues la reacción dura la mitad de lo que duraba hacerla con el protocolo que utiliza como reactivo la mezcla de Master Mix®; otra ventaja es que fue efectiva para productos altamente procesados, pues uno de los problemas que se presentó era que el ADN se fragmenta con facilidad.

CONCLUSIONES

Los “primers” diseñados a partir de un gen del cromosoma 4 que codifica para una proteína, resultaron ser específicos para el arroz tradicional, mientras que los diseñados a partir de un gen en el cromosoma 11, amplificaron para otras especies vegetales; además del arroz.

Se pudo obtener un control interno y un control positivo mediante PCR y PCR directa en muestras de arroz mínimamente procesado y de productos derivados de éste.

De 21 muestras analizadas, 10 amplificaron para arroz tradicional y éstas se evaluaron para la identificación de transgénicos. En 5 de ellas, se pudo detectar la presencia de Organismos Genéticamente Modificados, tanto en arroz mínimamente procesado como en productos derivados de éste, encontrándose amplificados para los genes de CaMV35S y de T-NOS.

El otro 50 por ciento de las muestras de arroz analizadas no contenían el promotor y el terminador evaluados, y pese a ser los más utilizados, eso no significa que los productos sean libres de transgénicos, ya que en ocasiones se utilizan otros promotores y terminadores para expresar genes exógenos.

Todos los productos que fueron identificados como transgénicos carecían de un etiquetado que informara acerca de su presencia, éstos fueron producidos en México, Tailandia, China y Estados Unidos, por lo tanto, la necesidad de crear una norma que indique el uso de OGM es necesaria en nuestro país.

Es importante que el consumidores esté informado, pues es el único que puede decidir qué es lo que está consumiendo, por lo que un etiquetado confiable es necesario y requerido; al no haberlo en todos los casos, el uso de tecnologías para la identificación de transgénicos ha tomado mayor importancia en los últimos años, esta falta de etiquetado por parte de las empresas se debe a la imagen social negativa que hay sobre los transgénicos, lo que tiene como consecuencia pérdidas comerciales para las compañías productoras.

RECOMENDACIONES

Ambas parejas de “primers” utilizadas en este proyecto se pueden utilizar para posteriores experimentaciones pues ya han sido evaluados a las condiciones en las que se trabaja en el laboratorio, sin embargo, ya que el ADN se fragmenta fácilmente debido a los procesos a los que son sometidos los alimentos; se podrían diseñar “primers” que amplifiquen fragmentos de ADN más cortos, entre 100 y 200 pb y así poder identificar secuencias más pequeñas.

El “kit” que se utilizó ha sido evaluado por otros autores con resultados favorables, por lo tanto, se recomienda utilizar una mayor cantidad de muestra para efectuar la extracción, sobre todo en productos altamente procesados, así como realizar la PCR inmediatamente, esto a fin de evitar la fragmentación del ADN.

De la misma manera, para evitar que la reacción sea inhibida por el etanol que se utiliza para la extracción de ADN, asegurarse de evaporarlo por completo.

Ya que se ha comprobado la presencia de OGM mediante el uso de CaMV35S y T-NOS, se podría buscar amplificar otros promotores y terminadores, así se podría descartar por completo la presencia o ausencia de genes exógenos.

Una vez concluido este trabajo de investigación, en donde se ha comprobado la presencia de arroz transgénico en productos que consumimos en el país, sería importante darle seguimiento identificando cuál es el gen que se le está insertando para su mejoramiento.

GLOSARIO

- ✓ **ADN (ácido desoxirribonucleico):** Molécula biológica en la que reside la información genética de todos los seres vivos y forma parte de los cromosomas, se presenta en forma de doble hélice formada por nucleótidos, a su vez compuestos por pares de bases nitrogenadas.
- ✓ **Alérgeno:** Sustancia capaz de desencadenar una respuesta inmune en el organismo.
- ✓ **Amplificación:** Producción de copias adicionales de un secuencia de ADN.
- ✓ **Angiosperma:** Plantas que tienen flores y producen frutos con semillas.
- ✓ **ARN (ácido ribonucleico):** Polímero de ribonucleótidos parecido al ADN pero que en lugar de timinas contiene uracilo en sus nucleótidos y en vez de 2-desoxirribosa contiene D-ribosa. Se forma o sintetiza a partir de la transcripción o copia de regiones específicas de ADN.
- ✓ **Arroz palay:** Es el grano original que se obtiene de la panícula, se distingue por conservar aún la cascarilla y cierto grado de humedad.
- ✓ **Bioseguridad:** Tiene como propósito garantizar que el desarrollo y uso de plantas transgénicas y otros organismos genéticamente modificados 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) sustentada en el conocimiento de disciplinas más tradicionales como la Microbiología, la Genética, la Bioquímica, la Ingeniería Bioquímica y de algunas más recientes como la Genómica y la Bioinformática
- ✓ **Catalítico:** Proceso en el que un componente llamado catalizador acelera la transformación de compuestos químicos en otros. El catalizador no se altera al final de la reacción, por lo que puede usarse repetidamente, como las enzimas.
- ✓ **Cromosomas:** Estructuras que se localizan en el núcleo de las células de animales y vegetales superiores, en esta molécula de ADN se encuentran los genes como segmentos específicos.
- ✓ **Enzima:** Proteína con actividad catalítica capaz de acelerar una reacción bioquímica para lograr la síntesis o la modificación de compuestos biológicos.

- ✓ **Expresión génica:** Sensores y mecanismos mediante los cuales las células deciden utilizar un gen para sintetizar el ARN mensajero y, a partir de éste, sintetizar la proteína en particular codificada por ese gen.
- ✓ **Gen:** Segmento de ADN en el cual reside la información para sintetizar una molécula de proteína o de ARN, los genes son secuencias de cuatro tipos de nucleótidos que integran el ADN.
- ✓ **Genoma:** Conjunto de todo el material genético de ADN que tiene un organismo vivo en cada una de sus células.
- ✓ **Gramíneas:** Familia de plantas herbáceas que se caracterizan por poseer tallos huecos, divididos por nudos y flores en espiga.
- ✓ **Inocuidad:** Ausencia de daño a la salud, al medio ambiente y a la biodiversidad, en este contexto, por el uso de los OGM o sus productos.
- ✓ **In vitro:** Se refiere a condiciones experimentales en las que no existen células ni organismos vivos. Son las condiciones dadas en un tubo de ensayo.
- ✓ **Organismo Genéticamente Modificado (OGM):** Variedades de especies conocidas a las que se les ha conferido alguna capacidad funcional (detectable, heredable e intencionalmente útil) por tecnologías de ingeniería genética a partir de la incorporación de genes de especies distantes o cercanas.
- ✓ **Pares de bases (pb):** Consiste en dos nucleótidos opuestos y complementarios en las cadenas de ADN y ARN que están unidos por puentes de hidrógeno.
- ✓ **Plásmido:** Moléculas de ADN circular y generalmente de tamaño pequeño que se encuentran en muchas especies bacterianas y se pueden auto replicar.
- ✓ **“Primer”:** Moléculas sintéticas de cadena sencilla y secuencia corta, funcionan como cebadores para la replicación del ADN molde en la PCR.
- ✓ **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** Técnica *in vitro* utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN basada en la síntesis de millones de copias de un fragmento específico determinado por el apareamiento de dos moléculas cebadoras sintéticas con la molécula de ADN original.
- ✓ **Transgén:** Material genético de diferente origen, incorporado mediante técnicas de ingeniería genética en un organismo. Al organismo que resulta de este proceso se le llama transgénico o modificado genéticamente.

REFERENCIAS

1. AgroBioMéxico. (2013). “Aplicaciones y beneficios de la biotecnología agrícola en México y en el mundo” <www.agrobiomexico.org.mx> [10 de octubre de 2013].
2. AgroBioMéxico. (2012).”Marco regulatorio de los organismos genéticamente modificados (OGM) destinados a la agricultura” <www.agrobiomexico.org.mx> [17 de julio de 2013].
3. Adenle, A. (2011). “Respose to issues on GM agriculture in Africa: Are transgenic crops safe?”. *Biomedical Central Research Notes* **4**, 6 pp.
4. ArgenBio(2003). *Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria*.PDF <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/TRAZABILIDAD_ALIMENTARIA.pdf>[15 de enero de 2014].
5. ArgenBio (2013). “Preguntas frecuentes sobre la Biotecnología”. *ArgenBio Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología* <<http://www.argenbio.org>> [9 de octubre de 2013].
6. Bolívar, Z. (2012). *Por un uso responsable de los Organismos Genéticamente Modificados*. México: Academia de las Ciencias, 184 pp.
7. Bottero, M.T, y A. Dalmaso. (2011). “Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods”. *The Veterinary Journal* **190**, pp. 34-38.
8. Carranza, D. (2012) *Transformación de células vegetales, obtención de plantas transgénicas*,PDF<<http://ciencia-en-red.uncachodeciencia.org/biologia/Transformacion%20de%20celulas%20vegetales%20obtencion%20de%20plantas%20transgenicas.pdf>> [10 de julio de 2014].
9. Catón, A. (2013). *Análisis del mercado mundial del arroz: Perspectivas futuras*. <<http://www.agro-alimentarias.coop/ficheros/doc/03182.pdf>> [22 de enero de 2014].
10. Chen, H., Y.J. Lin y Q.F, Yang. (2009). “Review and prospect of transgenic rice research”. *Chinese Science Bulletin* **54**, pp. 4049 - 4068.
11. CIAT. (2005). *Morfología de la planta de arroz*.PDF <<http://www.betuco.be>

- [/rijst/Morfologiaplanta_arroz.pdf](#)>[18 de diciembre de 2013].
12. COFEPRIS.(2012). *Lista de evaluación de inocuidad caso por caso de los organismos genéticamente modificados (OGM's)*. PDF.<<http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/OGMS/Lista.aspx>> [15 de noviembre de 2013].
 13. CONAPAMEX. (2013). *Consejo Nacional de Productores de Arroz de México A.C.* <<http://conapamex.org.mx/>> [29 de agosto de 2013].
 14. Cortázar, A. y E. Silva (2004). *Métodos físico-químicos en biotecnología*. Manual de prácticas. Instituto de Biotecnología UNAM 40 pp.
 15. Dorado, G. (2013) *Amplificación de DNA mediante PCR*. PDF. <<http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/44%20PCR.pdf>>[25 de noviembre 2013].
 16. FAO. (2013). “Lista de control de los problemas y las soluciones según la etapa de crecimiento” *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura* <www.fao.org> [10 de octubre de 2013].
 17. Flores, G., M. Domínguez y N. González (2009). *Genética molecular*. Manual de prácticas. FES Cuautitlán UNAM 60 pp.
 18. Giri, C.C, y G.V. Laxmi. (2000). “Production of transgenic rice with agronomically useful genes: an assesment.” *Biotechnology Advances* **18**, pp. 653-683.
 19. Goff, S. *et al* (2005). “A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)” *Science New York* **296**, pp.92-100.
 20. Greenpeace. (2013). *Guía roja y verde de alimentos transgénicos 5ta edición*.PDF. <www.greenpeace.es>[30 de octubre de 2013].
 21. Holden, M. y M. Levine (2010). “The use of 35S and TNOS expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials”. *Analytical and bioanalytical chemistry* **396**, pp. 2175-2187.
 22. IDT. (2014). “OligoAnalyzer3.1”. *Integrated DNA Technologies* <<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>>[7 de abril de 2014].
 23. IRRI. (1994). *El arroz en la nutrición humana* .Roma: FAO, 160 pp.
 24. ISAAA. (2013). “Global status of commercialized Biotech” *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications* <<http://www.isaaa.org/>>[15 de julio de 2013].

25. Jinxia, Ao., L. Qingzhang y G. Xuejun (2011). “A multiplex nested PCR assay for the simultaneous detection of genetically modified soybean, maize and rice in highly processed products”. *Food Control* **22**, pp. 1617-1623.
26. Karamollaoğlu, I., H. Öktem y M. Mutlu (2009). “QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs).” *Biochemical Engineering Journal* **44**, pp. 142-150.
27. Massieu, Y.C. (2009). “Cultivos y alimentos transgénicos en México: el debate, los actores y las fuerzas sociopolíticas”. *Nueva Época* **59**, 27 pp.
28. Milena, A., R. Arango y L. Afanador (2005). “Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: ingeniería genética natural aplicada”. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía* **58**, pp.2569-2585.
29. Muñoz, J. (2004). *Alimentos transgénicos: Ciencia, ambiente y mercado, un debate abierto*. México: Siglo XXI, 268 pp.
30. Microbial (2009). “La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR” *Microbial SL* <<http://www.microbial-systems.com>>[21 de febrero de 2014].
31. Nakamura, S. y K. Ohtsubo (2010). “PCR method for the detection and identification of cultivars of rice flours used in yeast leavened breads containing both wheat and rice flours”. *Journal of Cereal Science* **52**, pp.16-21.
32. NCBI. (2014). “Primer-BLAST”. *National Center for Biotechnology Information* <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>[7 de abril de 2014].
33. NMX-FF-059-SCFI-2000 (2000). “Productos alimenticios no industrializados para consumo humano- cereales- arroz palay (*OryzaSativaL.*)” <<http://200.77.231.100/work/normas/nmx/2000/nmx-ff-059-scfi-2000.pdf>> [14 de enero de 2014].
34. Ohtsubo, K. y S. Nakamura (2007). “Cultivar identification of rice (*Oryza sativa L.*) by PCR method and its application to processed rice products”. *The Japanese Society of Applied Glycoscience Review* **54**, pp. 235-243.
35. Ohtsubo, K., K. Suzuki, K. Haraguchi y S. Nakamura (2008). “Novel method for preparation of the template DNA and selection of primers to differentiate the

- material rice cultivars of rice wine by PCR”. *Journal of Biochemical and Biophysical methods* **70**, pp. 1020-1028.
36. Paredes, B. (2013). *Detección de organismos genéticamente modificados en productos derivados de maíz o soya utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Ingeniera en Alimentos. FES Cuautitlán UNAM 115 pp.
 37. Posso, D. (2009). *Electroforesis del ADN en geles de agarosa*. PDF < <http://www.ivic.gobve/ecologia/ueg/formatos/Electroforesis%20de%20ADN%20en%20geles%20de%20agarosa.pdf>> [4 de noviembre de 2013].
 38. Rasco-Gaunt, S., C. Thorpe y P.A Lazzeri (2000). “Advances in Cereal Transformation Technologies”. R. Henry (ed.) *Transgenic cereals*. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, pp. 178-251.
 39. Rodríguez, M.A. (2004). *Utilización de técnicas genéticas (PCR y PCR cuantitativo en tiempo real) e inmunológicas (ELISA) para la detección y cuantificación de diferentes especies animales de Foie gras*. Tesis de Doctorado. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid 336 pp.
 40. Rosas, M.R. (2008). *Estudio de la autenticación e identificación entre especies de pulpo y calamar en productos crudos y procesados al amplificar regiones específicas del DNA mitocondrial por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Ingeniera en Alimentos. FES Cuautitlán UNAM 89 pp.
 41. Ross, I. (2005). “*Oryza sativa L.*”. I. Ross (ed.) *Medicinal plants of the world*. Humana Press, pp. 401-417.
 42. SAGARPA. (2009). *Informe: Estudio de gran visión y factibilidad económica y financiera para el desarrollo de infraestructura de almacenamiento y distribución de granos y oleaginosas para el mediano y largo plazo a nivel nacional*. PDF < http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/GRANOS.pdf> [10 de octubre de 2013].
 43. SAGARPA.(2010a). “Aumenta el consumo de arroz mexicano con campañas de promoción”. *SAGARPA* <<http://www.sagarpa.mx/saladeprensa/boletines2/Paginas/2010-B077.aspx>>[29 de abril de 2014].

44. SAGARPA. (2010b). *Situación actual y perspectiva del arroz en México 1990-2010*. PDF <http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaDerivada/ComercioExterior/Estudios/Perspectivas/Arroz.pdf> [10 de diciembre de 2013].
45. SAG. (2003). *Manual técnico para el cultivo de arroz (Oryza sativa). Programa de arroz* <<http://curlacavunah.files.wordpress.com/2010/04/el-cultivo-del-arroz.pdf>> [15 de diciembre de 2013].
46. Sambrook, J. y Russel, D. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual* . 3^{ra} ed. Nueva York: Cold Spring Harbor, 2231 pp.
47. Sánchez, T. (2008). *Plantas transgénicas, biotecnología y alimentación*. PDF <<http://www.uned.es/expertobiotecnologiaalimentos/TrabajosSelecc/TrinidadSanchez.pdf>> [16 de enero de 2014].
48. Schoel, B. et al. (2007). *Demostración de la presencia de arroz genéticamente modificado en el mercado mexicano*. <http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area_III/Orales/OIII-7.pdf> [26 de agosto de 2013].
49. SENASICA. (2013). “Técnicas de análisis para la detección de OGM” *Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria* <<http://www.senasica.gob.mx/?id=2412>> [20 de enero de 2014].
50. Somma, M. y M. Querci. (2007). *Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos*. Luxemburgo: European Commission, 249 pp.
51. Song, S. et al. (2011). “Degradation of transgene DNA in genetically modified herbicide-tolerant rice during food processing”. *Food and Chemical Toxicology Journal* **49**, pp.3174–3182.
52. Upadhyaya, N., X. Zhou y Q. Zhu (2000). “Transgenic Rice”. R. Henry (ed.) *Transgenic cereals*. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, pp. 28-88.
53. Vallardes, C. (2010). *Taxonomía y botánica de los cultivos de grano* <<http://curlacavunah.files.wordpress.com2010/04/unidad-ii-taxonomia->

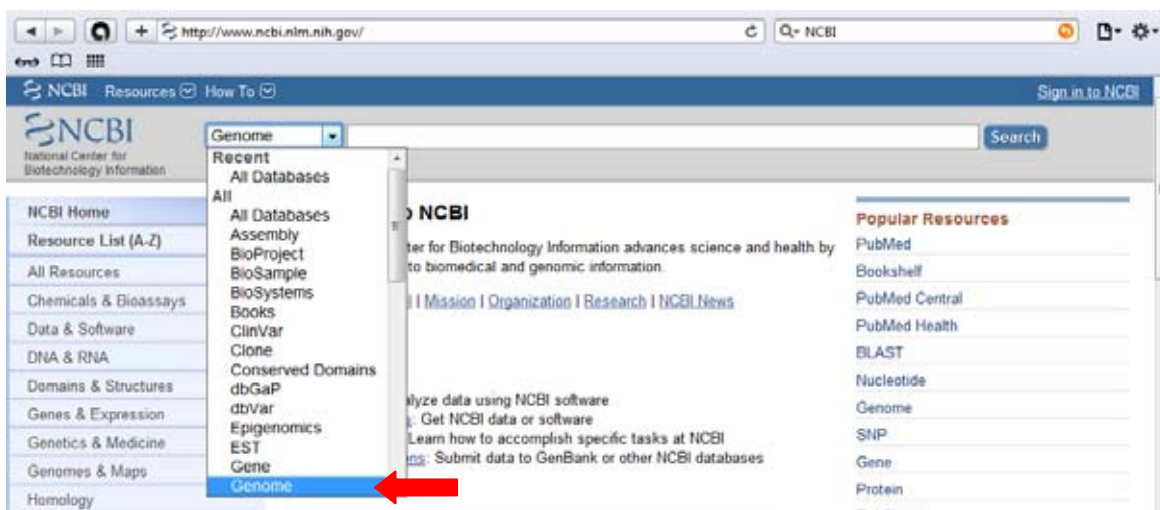
[botanica-y-fisiologia-de-los-cultivos-de-grano-agosto-2010.pdf](#)>[20 de enero de 2014].

54. Von Ahsen, N., C. Wittwer y E. Schütz (2001). “Oligonucleotide melting temperatures under PCR Conditions: Nearest-Neighbor Corrections for Mg²⁺, Deoxynucleotide Triphosphate, and Dimethyl Sulfoxide Concentrations with Comparison to alternative empirical formulas.” *Clinical Chemistry* **41**, pp. 1956-1961.
55. Watson, D.J (2006). *Biología molecular del gen* . 5ª ed. Madrid: Panamericana, 880 pp.
56. Wu, G., Y. Wu y S. Nie *et al.* (2010) “Real-time PCR method for detection of the transgenic rice event TT51-1.” *Food Chemistry* **119**, pp. 417-422.
57. Zanettini, M.E. y P. Giancarlo (2004). *Plantas Transgénicas*. São Paulo: Atheneu, 800 pp.
58. Zárate, S. P. (2009). *Manual del laboratorio de biotecnología molecular*. México: IPN - UPIBI.

ANEXO 1

Metodología para el diseño de “primers”

Dentro de la página de NCBI se seleccionó en la base de datos la opción de GENOME.



Se ingresó el nombre científico de la especie a tratar (*Oryza sativa*) y se seleccionó la opción de SEARCH.



Se seleccionó la opción de BLAST GENOME.



Se copió la secuencia del “primer” frontal reportada en el artículo de Nakamura y Ohtsubo (2010).



Se seleccionó la opción de BLAST en la parte de inferior de la pantalla.



Se abrió una nueva pantalla que indicaba las características de la secuencia insertada así como que tan similar era ésta con el genoma del arroz, se seleccionó la secuencia que presentaba la mayor relación y puntuación en cuanto a similitud.

The screenshot shows the 'Sequences producing significant alignments' table. The first row is highlighted with a red dashed box. The table has the following columns: Description, Max score, Total score, Query cover, E value, Ident, and Accession.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Oryza sativa</i> Japonica Group DNA, chromosome 11, complete sequence, cultivar Nipponbare	28.2	4501	100%	2.4	100%	NC_008404.2
<i>Oryza sativa</i> Japonica Group DNA, chromosome 3, complete sequence, cultivar Nipponbare	28.2	6160	100%	2.4	100%	NC_008396.2
<i>Oryza sativa</i> Japonica Group DNA, chromosome 1, complete sequence, cultivar Nipponbare	28.2	5822	100%	2.4	100%	NC_008394.4
<i>Oryza sativa</i> Japonica Group DNA, chromosome 10, complete sequence, cultivar Nipponbare	26.3	3099	100%	9.5	100%	NC_008403.2
<i>Oryza sativa</i> Japonica Group DNA, chromosome 9, complete sequence, cultivar Nipponbare	26.3	4003	100%	9.5	100%	NC_008402.2

Se seleccionó “hypothetical protein” de la primera opción que apareció, esto significaba la secuencia de nucleótidos más parecida a la del “primer” insertado.

Range 1: 24807687 to 24807706 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	0.002	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Plus

Features: [hypothetical protein](#)

```

Query 1      TGGTGAGCGITTTGCAGTCT 20
            |||
Sbjct 24807687 TGGTGAGCGITTTGCAGTCT 24807706
    
```

Se abrió una nueva ventana con la secuencia completa correspondiente a la proteína, así como sus características. Se seleccionó la opción de PICK PRIMERS.

LOCUS [NC_008399](#) 2868 bp DNA linear CON_08 JUN-2010

DEFINITION [Oryza sativa Japonica Group DNA, chromosome 6, complete sequence](#)

ACCESSION [NC_008399](#) REGION: 24805853..24808820

VERSION [NC_008399.2](#) GI:297606578

DBLINK BioProject: [ERJHAL22](#)

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE *Oryza sativa Japonica Group* (Japanese rice)

ORGANISM [Oryza sativa Japonica Group](#)

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; BEP clade; Ehrhartoideae; Oryzaceae; Oryza.

REFERENCE 1

AUTHORS Tanaka,T., Antonio,B.A., Kikuchi,S., Matsumoto,T., Nagamura,Y., Numa,H., Sakai,H., Wu,J., Itoh,T., Sasaki,T., Aono,R., Fujii,Y., Habara,T., Harada,E., Kanno,M., Kawahara,Y., Kawashima,H., Kuboaka,H., Matsuya,A., Nakaoka,H., Saichi,N., Sanbonmatsu,R., Sato,Y., Shinno,Y., Suzuki,M., Takeda,J., Tanino,M., Todokoro,F., Yamaguchi,K., Yamamoto,N., Yamaeda,M., Ikeda,K., Teteno,Y., Gojima,H., Hsing,Y.I., Zhao,Q., Han,B., Krawinkel,D., Lonsdale,D., O'Donovan,C.C., Nishizumi,T., Koyanagi,K.O., Khurana,J.F., Raghuvaran,S., Singh,N.K., Tyagi,A.K., Haberer,G., Fujisawa,M., Hosokawa,S., Ito,Y., Ikawa,H., Shibata,M., Yamamoto,M., Bruskiwicz,R.M., Hoen,D.R., Bureau,T.E., Namiki,N., Ohyanagi,H., Sakai,Y., Nobushima,S., Sakata,K., Barrero,R.A., Sato,Y., Souvorov,A., Smith-White,B., Tatusova,T.,

Basic Features
 Default features
 Gene, RNA, and CDS features only

Features added by NCBI
 997357 SNPs

Display options
 Show sequence
 Show reverse complement
 Show Components in Features

Analyze this sequence
 Run BLAST
 Pick Primers
 Highlight Sequence Features

Se estableció el tamaño máximo y mínimo del amplificado que se quería obtener, en este caso de 200- 800 pb al igual que el número de parejas de “primers”, para este ejemplo se buscaron 5 parejas. Se seleccionó GET PRIMERS.

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)

PCR product size

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m)

Exon/Intron selection
 A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span

Una nueva ventana mostró las parejas de “primers”, apareciendo la secuencia frontal y reversa así como el tamaño de amplificado, los “primers” se diseñaron de acuerdo a las consideraciones mostradas en la Tabla 6 del presente trabajo.

ANEXO 2

Cálculo de Tm

- Cálculo de Tm (Wallace-Ikatura) para los “primers” del cromosoma 11:

$$Tm = (G + C) * 4 + (A + T) * 2$$

$$TmF = (3 + 7) * 4 + (9 + 3) * 2 = \mathbf{64}$$

$$TmR = (5 + 6) * 4 + (2 + 7) * 2 = \mathbf{62}$$

- Cálculo de Tm (Wallace-Ikatura) para los “primers” del cromosoma 4:

$$Tm = (G + C) * 4 + (A + T) * 2$$

$$TmF = (7 + 4) * 4 + (4 + 8) * 2 = \mathbf{68}$$

$$TmR = (4 + 7) * 4 + (5 + 4) * 2 = \mathbf{62}$$

ANEXO 3

Hidratación de “primers”

- Los “primers” deben de estar a una concentración de 250 μM ($\frac{\mu\text{mol}}{L}$) para lo cual se hidratan en función de la concentración de nmoles.
- Cálculo para la hidratación de “primers” cromosoma 11:

Ⓢ Primer frontal 30.1 nmoles

$$30.1 \text{ nmol} \left| \frac{1 \mu\text{mol}}{1000 \text{ nmol}} \right| = 0.0301 \mu\text{moles}$$

$$U = \frac{0.0301 \mu\text{moles} * L}{250 \mu\text{moles}} = \frac{1.204 \times 10^{-4}}{1 \times 10^{-6}} = \mathbf{120.4 \mu\text{l de agua libre de nucleasas}}$$

Ⓢ Primer reverso 29.6 nmoles

$$29.6 \text{ nmol} \left| \frac{1 \mu\text{mol}}{1000 \text{ nmol}} \right| = 0.0296 \mu\text{moles}$$

$$U = \frac{0.0296 \mu\text{moles} * L}{250 \mu\text{moles}} = \frac{1.184 \times 10^{-4}}{1 \times 10^{-6}} = \mathbf{118.4 \mu\text{l de agua libre de nucleasas}}$$

- Cálculo para la hidratación de “primers” cromosoma 4:

Ⓢ Primer frontal 36 nmoles

$$36 \text{ nmol} \left| \frac{1 \mu\text{mol}}{1000 \text{ nmol}} \right| = 0.036 \mu\text{moles}$$

$$U = \frac{0.036 \mu\text{moles} * L}{250 \mu\text{moles}} = \frac{1.44 \times 10^{-4}}{1 \times 10^{-6}} = \mathbf{144 \mu l \text{ de agua libre de nucleasas}}$$

Ⓢ Primer reverso 29 nmoles

$$29 \text{ nmol} \left| \frac{1 \mu\text{mol}}{1000 \text{ nmol}} \right| = 0.029 \mu\text{moles}$$

$$U = \frac{0.029 \mu\text{moles} * L}{250 \mu\text{moles}} = \frac{1.16 \times 10^{-4}}{1 \times 10^{-6}} = \mathbf{116 \mu l \text{ de agua libre de nucleasas}}$$