



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“DETECCIÓN DE CEBADA MALTERA GENÉTICAMENTE
MODIFICADA EN CERVEZAS POR MEDIO DE LA REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

BRENDA ANAHÍ BAZÁN HERNÁNDEZ

ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA

COASESORA: M.C. JOSEFINA MORENO LARA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

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

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR 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 comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Detección de cebada maltera genéticamente modificada en cervezas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Que presenta la pasante: Brenda Anahi Bazán Hernández

Con número de cuenta: 308165106 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería 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 HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de Junio de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
SECRETARIO	I.A. Maria Guadalupe López Franco	
1er. SUPLENTE	Dr. Enrique Martínez Manrique	
2do. SUPLENTE	M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza	

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

IHM/mmgm*

'No thief, however skillful, can rob one of knowledge, and that is why knowledge is the best and safest treasure to acquire.'

L. Frank Baum

DEDICATORIAS

A mis papas, ya que gracias a ellos doy por concluida esta etapa tan importante en mi vida, la cual determinará gran parte de mi futuro, gracias por todo lo que hicieron para que hoy pudiera llegar hasta aquí, por estar conmigo incondicionalmente y sobre todo por brindarme todo su amor.

A ti mamá gracias por ser mi mejor amiga, por escucharme y apoyarme siempre en todos mis proyectos, por consentirme, pero también por corregirme para ser una mejor persona, te agradezco todo lo que has hecho por mí.

A ti papá, gracias por darme todas las herramientas necesarias para cumplir este sueño, gracias también por todo tu apoyo y por estar ahí cuando te necesito.

A mis hermanos, por todas las risas, juegos y por todos los buenos momentos que pasamos a diario y sobre todo por ser un ejemplo para mí de fortaleza y de que todo se puede superar cuando estamos juntos.

A mis amigas Liliana, Laura, Sonia, Lizbeth, Thalia y Adriana, con quienes compartí momentos inolvidables durante mi estancia en la universidad, gracias por su amistad y por todas las experiencias que vivimos juntas.

A mis amigas Luz, Paola y Alicia, por todos estos años de amistad, gracias por seguir siendo parte de mi vida, estoy muy feliz de ver cuánto hemos crecido y logrado y más aún por todo lo que hemos compartido.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Montiel Sosa, por el apoyo y el interés prestado en este proyecto.

A la M. en C. Josefina Moreno Lara, por ser una excelente profesora y por todas las enseñanzas que me brindo, también por su apoyo y paciencia en la realización de este proyecto.

A mis profesoras del taller de biotecnología Karla Mariana García Banda y Ana Elvia Sánchez, por todos sus consejos, enseñanzas y apoyo.

A mis sinodales por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

Y a todos mis profesores de la FES Cuautitlán, por todos los conocimientos que me transmitieron y los cuales me permitieron poder culminar mi carrera profesional.

Pero sobre todo agradezco a mi alma máter, la Universidad Nacional Autónoma de México, ya que a ella debo toda mi formación académica, porque ahí adquirí todo lo necesario para poder ser Ingeniera en Alimentos.

**Se agradece al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e
Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN211413**

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIV
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES	4
1.1. GENERALIDADES DE LA CEBADA.....	4
1.1.1 Definición de cebada	4
1.1.2 Clasificación de la cebada	4
1.1.3 Composición química y valor nutritivo	5
1.1.4 Estructura física	6
1.2 SITUACIÓN ECONÓMICA DE LA CEBADA	8
1.2.1 Producción y consumo a nivel internacional.....	8
1.2.2 Producción y consumo a nivel nacional	9
1.3 PRINCIPALES USOS DE LA CEBADA	10
1.4 CERVEZA.....	11
1.4.1 Definición de cerveza	11
1.4.2 Proceso de elaboración	11
1.4.3 Composición química de la cerveza y valor nutritivo	15
1.4.4 Situación económica de la cerveza.....	16
1.4.5 Consumo a nivel internacional	17
1.4.6 Consumo a nivel nacional	17
1.5 ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS	18
1.5.1 Definición de organismos genéticamente modificados	18
1.5.2 Técnicas de modificación genética.....	19
1.5.3 Aplicación de los OGM en la industria alimentaria	23
1.5.4 Situación de los alimentos genéticamente modificados en México	24
1.5.5 Cebada genéticamente modificada	28
1.6 GENERALIDADES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	29
CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	34

2.1	Justificación.....	34
2.2	Cuadro metodológico	35
	Objetivo general	36
	Objetivo Particular 1	36
	Objetivo Particular 2.....	36
	Objetivo Particular 3.....	37
	Objetivo Particular 4.....	37
	Objetivo Particular 5.....	37
2.3	Material	38
2.3.1	Biológico	38
2.3.2	Reactivos	40
2.3.3	Equipos.....	41
2.4	Métodos	41
2.4.1	Diseño de <i>primers</i>	41
2.4.2	Diseño del programa de amplificación.....	43
2.4.3	Extracción de ADN	45
2.4.4	Cuantificación de ADN por absorbancia a 260 nm.....	46
2.4.5	Reacción en Cadena de la Polimerasa	47
2.4.6	Electroforesis	48
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN		50
3.1	Diseño de <i>primers</i>	50
3.2	Programas de amplificación.....	50
3.3	Concentración de ADN de las muestras de grano de cebada maltera y de las muestras de granos de trigo.....	51
3.4	Concentración de ADN de las muestras de Cerveza.....	53
3.5	Concentración del ADN de Maíz transgénico y de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
3.6	Calidad e integridad del ADN.....	55
3.7	Controles positivos de cebada maltera.....	56
3.8	Controles positivos de trigo.....	57
3.9	Especificidad de los <i>primers</i> para cebada y trigo.....	58
3.9.1	Amplificación de los <i>primers</i> Trigo F/Trigo R con granos de cebada.....	60

3.10	Amplificación de los <i>primers</i> Cebada F/Cebada R con granos de cebada.....	61
3.11	Amplificación con los <i>primers</i> Trigo F/Trigo R con granos de trigo	61
3.12	Identificación de cebada maltera en cervezas	62
3.13	Identificación de trigo en cerveza	65
3.14	Identificación del promotor CaMv en grano de cebada	67
3.15	Identificación del terminador tNOS en grano de cebada	69
3.16	Identificación del promotor CaMV en cervezas.....	71
3.17	Identificación del terminador tNOS en cervezas.....	73
CONCLUSIONES.....		76
ANEXOS		78
I.	Diseño de <i>primers</i>	78
II.	Hidratación de los <i>primers</i>	83
REFERENCIAS		84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la cebada	7
Figura 2. Principales países consumidores de cebada.	9
Figura 3. Superficie sembrada de Cebada maltera por estado.....	9
Figura 4. Distribución del consumo de cebada en México.....	10
Figura 5. Diagrama de flujo simplificado del proceso de elaboración de cerveza.....	14
Figura 6. Exportaciones Mundiales de cerveza de malta	16
Figura 7. Esquema simplificado del proceso completo de manipulación de ADN.....	20
Figura 8. Cultivos utilizados para la Generación de OGMs.....	25
Figura 9. Hectáreas de cultivos biotecnológicos a nivel mundial	25
Figura 10. 27 países sembraron cultivos biotecnológicos en 2013	26
Figura 11. Secuencia de amplificación en la PCR.....	33
Figura 12. Programa diseñado para la amplificación de un fragmento de ADN de cebada maltera con los <i>primers</i> Cebada F/Cebada R y trigo con los <i>primers</i> TrigoF/ Trigo R.....	43
Figura 13. Programa diseñado para la amplificación del promotor CaMV con los <i>primers</i> CaMV F/CaMV R y el terminador tNOS con los <i>primers</i> tNOS F/ tNOS R.	45
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa, para verificar la concentración e integridad del ADN a) ADN de granos de cebada maltera; b) ADN de <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> (Sc) y maíz transgénico (Mt).....	56
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa, de los fragmentos amplificados de ADN de cebada maltera, con los <i>primers</i> Cebada F/Cebada R para comprobar su amplificación con el programa diseñado y para la obtención de un control positivo.	57
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa, de los fragmentos amplificados de ADN de trigo, con los <i>primers</i> Trigo F/Trigo R para comprobar su amplificación con el programa diseñado y para la obtención de un control positivo.....	58
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa, para comprobar la especificidad de los <i>primers</i> Cebada F/Cebada R.....	59

Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa, para comprobar la especificidad de los <i>primers</i> Trigo F/Trigo R	60
Figura 19. Electroforesis en un gel de agarosa, para comprobar la especificidad de los <i>primers</i> Trigo F/Trigo R con muestras de cebada.	60
Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa, de los fragmentos amplificados de ADN de cebada maltera, con los <i>primers</i> Cebada F/Cebada R, de diferentes muestras de ADN de grano de cebada maltera, a) muestras C1 y C3-C8; b) muestra C9.....	61
Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa, de los fragmentos amplificados de ADN de trigo con los <i>primers</i> Trigo F/Trigo R de las muestras de ADN de grano de trigo: T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7.....	62
Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa, para la detección de cebada maltera en cervezas. Muestras: Bo: Bohemia, Dx: Dos equis, He: Henineken, Mn: Modelo, Ln: Leon, Cl: Corona light y Te: Tempus.	63
Figura 23. Electroforesis en un gel de agarosa, para la detección de cebada maltera en cervezas. Muestras: Hm: Hofbräu Maibock, Bt: Barrilito, Ha: Harvest Ale, Lp: London Porter, Id: Indio, So: Sol, Tc: Tecate.	64
Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa, para la detección de cebada maltera en cervezas. Muestras: Vt: Victoria y Ds: O'Douls.	64
Figura 25. Electroforesis en un gel de agarosa, para la detección de trigo en cervezas. Muestras: Bo: Bohemia, Dx: Dos equis, He: Henineken, Mn: Modelo, Ln: Leon, Cl: Corona light y Te: Tempus.	65
Figura 26. Electroforesis en un gel de agarosa, para la detección de trigo en cervezas. Muestras: Hm: Hofbräu Maibock, Bt: Barrilito, Ha: Harvest Ale, Lp: London Porter, Id: Indio, So: Sol, Tc: Tecate.	66
Figura 27. Electroforesis en un gel de agarosa, para la detección de trigo en cervezas. Muestras: Vt: Victoria y Ds: O'Douls.	66
Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa, para la detección de CaMV en cebada. Muestras: C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7	68
Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa, para la detección de CaMV en cebada. Muestras: C8 y C9	69

Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa, para la detección de tNOS en cebada. Muestras: C1, C2, C3, C4, C5 y C6.....	70
Figura 31. Electroforesis en un gel de agarosa, para la detección de tNOS en cebada. Muestras: C7, C8 y C9	70
Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa, para la detección de CaMV en cervezas. Muestras: He: Henineken, Mn: Modelo, Ln: Leon, Cl: Corona light, Te: Tempus, Hm: Hofbräu Maibock y Bt: Barrilito.....	71
Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa, para la detección de CaMV en cervezas. Muestras: Ha: Harvest Ale, Lp: London Porter, Id: Indio, So: Sol, Tc: Tecate, Vt: Victoria y Ds: O'Douls.....	72
Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa, para la detección de tNOS en cervezas. Muestras: He: Henineken, Mn: Modelo, Ln: Leon, Cl: Corona light, Te: Tempus, Hm: Hofbräu Maibock y Bt: Barrilito.....	73
Figura 35. Electroforesis en un gel de agarosa, para la detección de tNOS en cervezas. Muestras: Bt: barrilito, Ha: Harvest Ale, Lp: London Porter e Id: Indio.	74
Figura 36. Electroforesis en un gel de agarosa, para la detección de tNOS en cervezas. Muestras: Sc: Sol, Tc: Tecate, Vt: Victoria y Ds: O'Douls.....	74
Figura 37. Página principal del programa bioinformático NCBI para el diseño de <i>primers</i> .	78
Figura 38. Página principal donde se ha introducido la opción Nucleotide y la clave obtenida del artículo.	78
Figura 39. Secuencia de nucleótidos del gen seleccionado.....	79
Figura 40. Página donde se muestran las características del gen seleccionado y donde se encuentra la opción <i>Pick Primers</i> necesaria para el diseño de <i>primers</i>	79
Figura 41. Página donde se introdujeron las características deseadas para los <i>primers</i> diseñados.....	80
Figura 42. Página donde se introdujeron las características deseadas para los <i>primers</i> diseñados (continuación).	80
Figura 43. Pareja de <i>primers</i> proporcionadas por el programa y seleccionados para la amplificación de cebada maltera	81
Figura 44. Página donde se muestra la opción Run BLAST, necesaria para verificar que los <i>primers</i> elegidos fueran específicos para la especie deseada.....	81

Figura 45. Página donde se verifico que los *primers* diseñados fueran específicos para la especie deseada. 82

Figura 46. Página donde se verificó que la especificidad de los *primers* diseñados fuera del 100%. 82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de la Cebada	5
Tabla 2. Composición de la cerveza.....	15
Tabla 3. Muestras de grano de Cebada Maltera utilizadas para su evaluación.	38
Tabla 4. Muestras de grano de trigo utilizadas para su evaluación.	38
Tabla 5. Muestras de cerveza utilizadas para su evaluación.	39
Tabla 6. Secuencias y características de los <i>primers</i> de cebada maltera.....	42
Tabla 7. Secuencias y características de los <i>primers</i> de trigo	42
Tabla 8. Secuencias y características de los <i>primers</i> para CaMV y tNOS.....	43
Tabla 9. Componentes y cantidades para realizar la PCR.....	47
Tabla 10. Componentes y cantidades para cargar y correr el gel de electroforesis.....	48
Tabla 11. Concentración de ADN de muestras de cebada maltera de distinta procedencia.	51
Tabla 12. Concentración de ADN de muestras de grano de trigo de distinta procedencia.	52
Tabla 13. Concentración de ADN de las muestras de cervezas.	54
Tabla 14. Concentración de ADN de maíz transgénico y de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
Tabla 15. Concentración del ADN extraído de diferentes especies para la prueba de especificidad, para los <i>primers</i> de cebada maltera y trigo.	58
Tabla 16. Promotores que se han utilizado en la cebada transgénica.....	67

RESUMEN

Los organismos genéticamente modificados (OGM) son los microorganismos, plantas o animales, en los que sus composiciones genéticas han sido alteradas para obtener nuevas características.

Los cultivos de cereales, han sido los principales objetivos de mejora de transformación genética, y siendo la cebada uno de los cereales más importantes en el mundo la hace más susceptible a que hayan realizado una modificación genética en el, y por consecuencia que encontremos organismos transgénicos en los productos derivados de éste cereal, como por ejemplo en la cerveza, producto elegido para este estudio debido a que es una bebida muy consumida a nivel internacional y por su importancia económica en nuestro país.

Los métodos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) son los más precisos y eficientes usados en la identificación de organismos genéticamente modificados en los productos, por lo cual es el método usado en la elaboración de este proyecto.

En este trabajo se identificó el promotor CaMV y el terminador tNOS por ser los más empleados en la modificación genética de alimentos. Se evaluaron en total 25 muestras, 9 de ellas de grano de cebada maltera y 16 correspondientes a diversas cervezas comerciales de origen nacional e internacional, las cuales son líderes en el mercado. Por medio de programas bioinformáticos se diseñaron *primers* para la identificación de trigo y cebada en las muestras y se seleccionaron bibliográficamente los *primers* para la detección del promotor CaMV y el terminador tNOS. La extracción de ADN se llevó a cabo por medio del protocolo de Sambrook en todos los productos, tanto para granos y cervezas. Se realizó una PCR para la identificación de trigo y cebada en las muestras, así como de organismos genéticamente modificados en las mismas. Se hizo una electroforesis en gel de agarosa y se visualizaron los resultados en un transiluminador de luz ultravioleta. De todos los productos evaluados se detectó el promotor CaMV en 14 de las cervezas, lo que quiere decir que las hacen un producto con organismos transgénicos, lo cual no se indica en su etiqueta.

Actualmente no se tienen claros los posibles daños que pueda causar este tipo de organismos si los consumimos y a causa de falta de etiquetado en los alimentos que compramos, la gran mayoría de las personas ignoran si están consumiendo un producto que

contenga organismos genéticamente modificados, a lo cual tiene derecho, aunque no haya leyes establecidas en nuestro país para regular esta falta de información en las etiquetas.

INTRODUCCIÓN

Los cultivos y alimentos transgénicos son uno de los grupos más importantes dentro de los Organismos Genéticamente Modificados (OGM), los cuales son un producto reciente en el mercado mundial: a partir de 1996 se comienzan a sembrar libremente en Estados Unidos. Actualmente existen en el mercado cuatro cultivos: maíz, algodón, soya y canola, que se siembran a nivel comercial en varios países: Estados Unidos, Argentina, Brasil, Canadá, India, China, Paraguay y Sudáfrica. Las transformaciones genéticas presentes en estas variedades comerciales son básicamente dos: resistencia a herbicidas y resistencia a insectos. El debate actual respecto a los OGM muestra cambios si se compara con el de las décadas de 1980 y 1990, cuando era claro que se estaba ante una nueva tecnología con gran poder de transformación tanto de la producción agrícola y alimentaria, como de otras ramas productivas: la medicina, la energía, la industria química y petrolera. En estos años se hablaba de la biotecnología como una de las tecnologías presentes en la Tercera Revolución Científico Técnica o Tercera Revolución Industrial, como parte de un nuevo paradigma tecnoeconómico. Con respecto a la agricultura, la discusión giraba en torno a si estábamos ante una nueva revolución tecnológica que transformaría completamente la producción y el consumo de alimentos y las diferencias de sus impactos en los países industrializados y en los países latinoamericanos. Actualmente ya no discutimos acerca del carácter revolucionario de esta nueva tecnología, sino que existe un debate ético, internacional y en México, que aparece con la manipulación de los genes, es decir, con la aplicación de la ingeniería genética, con su regulación, y así como las consecuencias a la biodiversidad, medio ambiente y a la salud (Massieu, 2009).

Por lo mencionado anteriormente es importante identificar la existencia de organismos genéticamente modificados en los productos alimenticios que consumimos día a día, y en este caso específicamente de cebada, que es el cuarto cereal más importante en el mundo y de la cerveza, la cual, es la tercera bebida más consumida en el mundo, ya que al no haber etiquetado de OGM en los alimentos, mediante este tipo de estudios se puede informar al consumidor y dejar a su elección si desea consumirlos o no.

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES

1.1.GENERALIDADES DE LA CEBADA

1.1.1 Definición de cebada

La familia de monocotiledóneas de Poaceae incluye un gran número de especies de importancia agrícola tales como el maíz (*Zea mays L.*), trigo (*Triticum aestivum L.*), y el arroz (*Oryza sativa L.*). La cebada (*Hordeum vulgare L.*) es un miembro de esta familia, y es el cuarto cereal más importante en todo el mundo, con una producción superior a 130 millones de toneladas métricas anuales (Mrízová *et al.*, 2014).

La cebada (*Hordeum vulgare L.*) es uno de los cultivos más antiguos, y que ha desempeñado un papel en el desarrollo humano de la agricultura, de la civilización, de las culturas, de las ciencias de la agronomía, fisiología, genética, en la reproducción, el malteado y en la elaboración de la cerveza. La cebada fue probablemente utilizada por primera vez como alimento humano, crudo o tostado y en panes y sopas, pero con el tiempo su uso evolucionó principalmente en piensos, malteado, elaboración de la cerveza, y como grano de destilación. La disminución del empleo de la cebada como un grano de alimentos, se debió en parte al aumento de la prominencia de trigo y arroz. En los últimos tiempos, del 55% al 60% de la cosecha de cebada ha sido utilizada para la alimentación animal, del 30% al 40% como malta, del 2% al 3% para comida, y aproximadamente 5% como semillas (Ullrich, 2011).

1.1.2 Clasificación de la cebada

Existen cebadas malteras que provienen de variedades de dos o seis hileras. Las carióspsides de seis carreras son usualmente de menor tamaño o peso de 1000 semillas que las de dos carreras. Una de las principales características que diferencian a las cebadas malteras de las forrajeras es el contenido proteico y el potencial diastásico una vez que son germinadas. Las variedades malteras contienen un contenido proteico menor, lo que se traduce en mayor cantidad de almidón o carbohidratos fermentables en el grano. Por lo general las variedades malteras contienen del 9.5 al 12.5% de proteína (Saldívar, 2009).

Hay tres tipos de cebada: 1) *Hordeum vulgare*: un tipo de cebada de seis carreras que tiene un pico de muescas en lados opuestos con tres espiguillas de cada categoría. En cada categoría, hay una flor o florete que más tarde se convierte en un núcleo. 2) *Hordeum*

distichum: un tipo de cebada de dos carreras que tiene floretes centrales productoras de granos y tiene floretes laterales que son estériles. 3) *Hordeum irregulare*: el menos cultivado, con los floretes centrales fértiles y proporciones variables de fértil y floretes laterales estériles (Zhang y Li, 2009).

1.1.3 Composición química y valor nutritivo

La composición química de la cebada varía significativamente dependiendo de la variedad y del tipo, debido a que es influenciada por factores genéticos y climáticos, tipos de suelo y de cultivo (López *et al.*, 2007). En la *tabla 1* se muestra la composición química de la cebada.

Tabla 1. Composición química de la Cebada

COMPONENTE	PORCENTAJE %
Carbohidratos	72.8-82.8
Proteína	7.5-15.6
Fibra cruda	5.3-5.9
Cenizas	2.6-3.1
Grasa	1.1-3.1

(Saldívar, 2009)

En general los cereales tienen bajas cantidades de compuestos lipídicos, la cebada se encuentra entre el 1.1 al 3.1% de lípidos los cuales están presentes principalmente en el germen y la capa de aleurona del grano. Los lípidos presentes en la cebada pueden estabilizar o desestabilizar la espuma de la cerveza, cuando los lípidos están unidos a las proteínas tienden a estabilizar y mejorar la espuma, pero cuando se encuentran libres pueden disminuir la espuma (López *et al.*, 2007).

La cebada tiene usualmente un contenido proteico que va del 7.5% al 15.6% (Dendy y Dobraszczyk, 2004). El contenido de proteínas es de gran importancia para conocer cuál es el empleo más apropiado que se le debe dar a cada una de las variedades. Para fines de alimentación animal y panificación se prefieren aquellos granos con alto contenido proteico (López *et al.*, 2007).

Además las proteínas pueden tener una influencia importante en el aporte de turbidez a las cervezas. El potencial de extracción de malta disminuye con el aumento en proteína de la cebada, por lo que los requerimientos comerciales normales de cebada para malta estipulan como máximo 11.5% (Hornsey, 2002).

Los hidratos de carbono son el mayor constituyente de los granos de cereales. En la cebada puede existir una variación del 72.8% al 82.8% (Dendy y Dobraszczyk, 2004). En cervecería es deseable mayor contenido de hidratos de carbono y menor cantidad de proteína. Por otra parte a mayor cantidad de carbohidratos implica mayor cantidad de almidón. El almidón es necesario para producir la maltosa, por medio de su hidrólisis (López *et al.*, 2007).

1.1.4 Estructura física

El grano de cebada tiene una forma aproximadamente ovoide, y se encuentra envuelto por las capas protectoras de la cascarilla, encontrándose un pequeño embrión en uno de los extremos. Este embrión es la parte que crecerá para dar lugar a una nueva planta, si se le da la oportunidad. El resto del grano es el endospermo, que consiste básicamente en un almacén de nutrientes para la joven planta (Hughes y Baxter, 2003).

El grano de cebada comprende de tres componentes principales: el germen o embrión, las capas externas (cáscara, pericarpio, testa y capas de aleurona), y el endospermo. La *figura 1* muestra la estructura global y los componentes individuales del grano, siendo el endospermo el componente dominante. Sin embargo, el principal órgano vivo en el grano es el embrión, junto con las capas de aleurona (también tejido vivo) que rodea el endospermo (Zhang y Li, 2009).

Germen

Esta estructura se encuentra adherida o fusionada al endospermo por medio del escudo. Sirve como almacén de nutrientes y como puente de comunicación entre la plántula o embrión en desarrollo y el gran almacén de nutrientes en el endospermo. El germen se caracteriza por carecer de almidón y por su alto contenido de aceite, proteína, azúcares solubles y cenizas. Además, es alto en vitaminas B y E y genera la mayoría de las enzimas para el proceso de germinación (Saldívar, 2009).

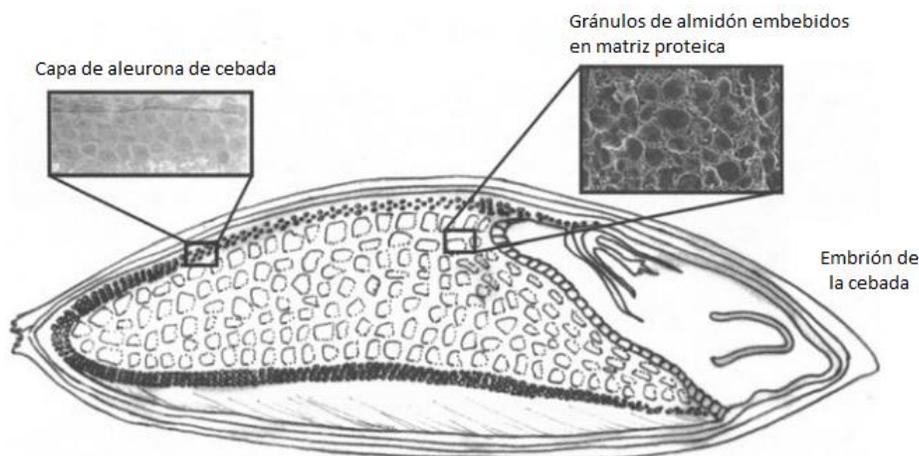


Figura 1. Estructura de la cebada (Zhang y Li, 2009)

Pericarpio

El pericarpio encierra a la semilla y está compuesto de varias capas de células. Básicamente ésta estructura se divide en epicarpio, mesocarpio y endocarpio. El epicarpio o epidermis es la capa más externa del pericarpio. Las funciones principales del pericarpio son proteger al grano contra agentes bióticos externos (insectos, microorganismos), impedir la pérdida de humedad y conducir y distribuir agua y otros nutrientes durante la germinación. Esta caracterizado por contener alto contenido de fibra y cenizas y carece totalmente de almidón (Saldívar, 2009).

Testa o envoltura de la semilla

La testa está firmemente adherida a la parte ventral de las células tubulares y consiste en uno o dos estratos de células (Saldívar, 2009).

Endospermo

1. Aleurona

En la cebada la aleurona está compuesta por dos a cuatro capas de células. La capa de aleurona juega un papel muy importante durante la germinación porque sintetiza las enzimas indispensables para lograr desdoblar los compuestos del endospermo (Saldívar, 2009).

2. Endospermo periférico

Se caracteriza por su alto contenido proteico y por contener unidades de almidón pequeñas, angulares y compactas (Saldívar, 2009).

3. Endospermo vítreo

Las células maduras del endospermo maduro contienen básicamente cuatro estructuras: paredes celulares, gránulos de almidón, matriz y cuerpos proteicos. Las paredes celulares son delgadas y encierran a los demás componentes. En ellas hay un alto contenido de fibra insoluble (celulosa y β -glucanos) y soluble (pentosanas). Los gránulos de almidón ocupan la mayoría del espacio celular y están rodeados y separados por la matriz proteica que sirve como pegamento para mantener la estructura interna de la célula. Los cuerpos proteicos son redondos y muy pequeños (Saldívar, 2009).

4. Endospermo almidonoso

El endospermo almidonoso se encuentra encerrado en la parte más céntrica del grano. Contiene las mismas estructuras del endospermo vítreo, pero las unidades de almidón son de mayor tamaño y menos angulares (Saldívar, 2009).

Los granos de cebada son normalmente de color amarillo claro, pero el color puede variar a través de púrpura, violeta, azul, y negro; estos colores diferentes son causados principalmente por la presencia de antocianinas, en las capas de la cascara, pericarpio, y aleurona (MacRitchie, 2010).

1.2 SITUACIÓN ECONÓMICA DE LA CEBADA

1.2.1 Producción y consumo a nivel internacional

A nivel per cápita, el principal país consumidor de cebada entre 1998 y 2007 fue Dinamarca, con 594 kg anuales en promedio por habitante. Otros países con un consumo promedio de más de 200 kg anuales per cápita fueron Finlandia, Canadá, España y Arabia Saudita. El consumo de cebada en México a nivel mundial, significó el 0.6% colocándose en el lugar 34° (Deloya, 2011). En la *figura 2* se muestran los principales países consumidores de cebada.

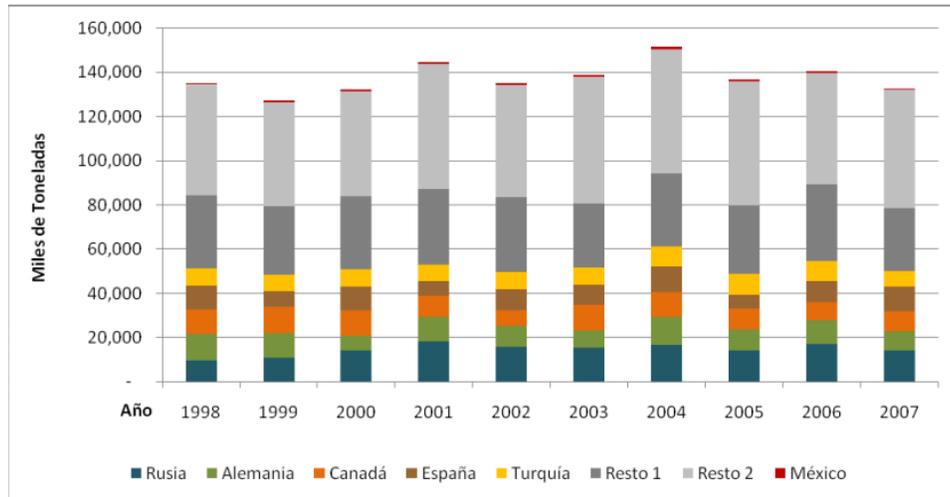


Figura 2. Principales países consumidores de cebada (1998-2007) (Deloya, 2011).

1.2.2 Producción y consumo a nivel nacional

A nivel nacional la cebada es el cultivo que tuvo la mayor Tasa Media Anual de Crecimiento (TMAC) durante el período que comprende de 1998 a 2008, ya que a una TMAC de 6.02%, paso de producir 410,766 toneladas a 781,179 en los mencionados años. Cerca del 90% de la producción nacional de cebada se concentra en cinco estados que son los siguientes: Guanajuato, Hidalgo, Tlaxcala, México y Puebla (Figura 3) (Deloya, 2011).

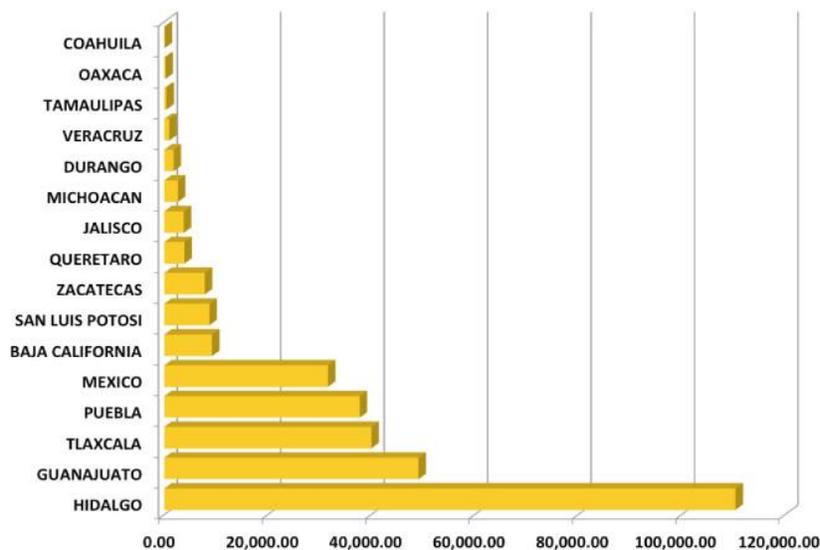


Figura 3. Superficie sembrada de Cebada maltera por estado, 2010 (Hectáreas) (CANICERM, 2014).

El país cuenta con una superficie establecida de más de 300 mil hectáreas de cebada maltera y una producción aproximada de 700 mil toneladas. En la cadena agroalimentaria de la cebada maltera participan 55 mil productores de cebada que, en su conjunto, generan una producción con valor anual de 2 mil millones de pesos (CANICERM, 2014).

1.3 PRINCIPALES USOS DE LA CEBADA

La cebada esta entre primeros cultivos de plantas domesticados y entre los más importantes. Aproximadamente tres cuartas partes de la producción mundial se utiliza para la alimentación animal, el 20% es malteado para uso en bebidas alcohólicas y no alcohólicas, y el 5% como ingrediente en una amplia gama de productos alimenticios. La cebada sigue siendo una fuente importante de alimentos en los países más pobres; en las sociedades más desarrolladas recientemente se ha clasificado como un alimento verdaderamente funcional (Mayer *et al.*, 2012).

A principios del 2009, los destinos del consumo nacional de grano de cebada fueron 91.1% para la industria, 4.2% para uso pecuario, 3% como semilla para siembra y 1.7% fueron mermas (*Figura 4*). Los cultivos industriales de cebada se encuentran prácticamente concentrados en una sola industria, sólo aparece la demanda derivada de la “industria de la cerveza y la malta” (Deloya, 2011).

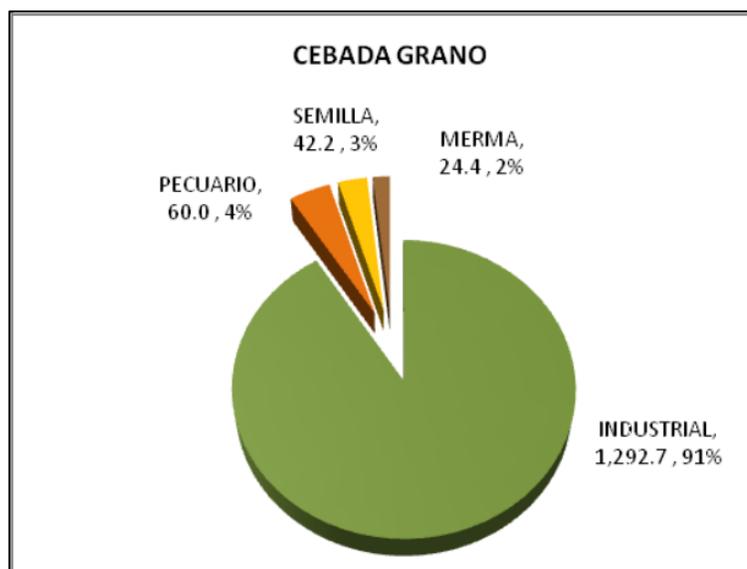


Figura 4. Distribución del consumo de cebada en México, 2009 (miles de Toneladas)
(Deloya, 2011).

En tiempos más recientes, ha habido un mayor interés por su potencial como alimento para los seres humanos, como resultado de los beneficios para la salud, por los compuestos presentes en niveles más altos que en otras fuentes (MacRitchie, 2010).

1.4 CERVEZA

1.4.1 Definición de cerveza

La cerveza es una bebida popular desde hace miles de años y su producción se considera a menudo como el proceso biotecnológico más antiguo (Hughes y Baxter, 2003).

La cerveza es tan antigua como la civilización. El origen de la cerveza se pierde en algún lugar del tiempo, pero, como una de las bebidas más antigua del mundo, ha desempeñado un papel importante en muchas de las grandes culturas del pasado. Se ha sabido durante mucho tiempo que Oriente Medio y Egipto fueron la cuna de la cerveza y que puede tener un importante papel y contribución a la dieta. En tiempos antiguos la producción de cerveza estuvo estrictamente relacionados con la cocción de pan, ya que están hechos con el grano, agua y levadura (Preedy, 2009) y ambos tenían un valor nutritivo groseramente similar (Hughes y Baxter, 2003). Durante el año 6000 a.C. en las antiguas ciudades de Mesopotamia (el área hoy cubierta por Irak) la elaboración de la cerveza era bien conocida. Aunque la gran antigua civilización del Oriente Medio desarrollo la elaboración de la cerveza en un arte que nadie entendía, cómo funcionaba el proceso de fermentación. Esta cerveza debe haber sido de una forma muy diferente a lo que estamos acostumbrados hoy en día; probablemente era más gruesa, más dulce, más baja en alcohol y alta en proteínas (Preedy, 2009).

1.4.2 Proceso de elaboración

Malteado

El objetivo global del malteado es el de deshacerse de la mayor parte posible del β -glucano (un polímero de moléculas de glucosa unidas mediante enlaces β -glucosídicos) de las paredes celulares y parte de la fracción proteica insoluble los cuales, de otro modo, restringirían el acceso de las enzimas a los gránulos de almidón. Al mismo tiempo, se desarrollan las enzimas que, en la fábrica de cerveza, transformarán el almidón en solidos solubles. En el malteado se remoja la cebada hasta que alcance un contenido de agua que aumenta del 12% hasta alrededor del 38-45% por aproximadamente 48 horas.

A continuación, se deja germinar la mayor parte del grano durante unos pocos días, manteniendo la temperatura a 16°C con aire frío humidificado. Durante estos pasos, varias enzimas se activan incluyendo proteasa, amilasa, y β -glucanasa, y algunas proteínas son modificadas. La malta verde húmeda se somete a un proceso de secado en un horno para prevenir actividades enzimáticas y dar lugar a un producto estable que pueda ser almacenado para su posterior uso (Hughes y Baxter, 2003; Iimure y Sato, 2013).

Empastado o braceado

En la planta cervecera la malta es triturada en un molino. La malta es el principal material de molienda utilizado para elaborar cerveza, pero puede haber otros, también, como la malta tostada o cebada, maíz o arroz (Bamforth, 2009; Hughes y Baxter, 2003). La malta molturada (grist) es mezclada con agua caliente en la caldera de extracción y se mantiene toda la masa a una temperatura próxima a 65°C durante una hora. Durante la extracción, las amilasas presentes en la malta degradan el almidón a azúcares fermentables. De este modo, tras la etapa de conversión (extracción) se obtiene un líquido dulce similar a un jarabe y conocido como mosto cervecero. Este líquido contiene principalmente maltosa y glucosa, que son fermentables, junto con cantidades importantes de pequeñas dextrinas ramificadas que no son fermentables (Hughes y Baxter, 2003).

Ebullición del mosto

En la caldera, se añade el lúpulo o los extractos del lúpulo y se somete el mosto a una cocción bastante intensa. Esta tiene tres efectos diferentes:

- El mosto se esteriliza.
- La mayor parte de las proteínas solubles coagulan pudiendo ser separadas como los “turbios”.
- Se extraen los α -ácidos del lúpulo hacia el mosto y se isomerizan a iso- α -ácidos, que proporcionan el característico sabor amargo de la cerveza (Hughes y Baxter, 2003).

La temperatura de cocción del mosto puede afectar a la estabilidad de la espuma de la cerveza (Iimure y Sato, 2013).

Clarificación del mosto

Tras la cocción las proteínas coaguladas o turbias, junto con el lúpulo agotado deben ser eliminadas. Tradicionalmente se hace mediante el filtrado, pero en las cervecerías modernas, esta operación se realiza en un recipiente conocido como Whirlpool o tanque remolino (Hughes y Baxter, 2003).

Fermentación

La fermentación se refiere principalmente a la conversión de los azúcares en alcohol, y la velocidad a la que esto ocurre es básicamente en proporción directa a la temperatura y a la cantidad de levadura adicionada en el fermentador (Bamforth, 2009). La levadura se mezcla con el mosto enfriado y la mezcla es bombeada al fermentador. Durante la fermentación la levadura capta los aminoácidos y los azúcares del mosto. Los azúcares son metabolizados, con la producción de dióxido de carbono y etanol en las condiciones anaeróbicas que se dan en la fermentaciones cerveceras (Hughes y Baxter, 2003). Durante la fermentación, el alcohol es producido por la levadura y algunas proteínas de levadura se liberan en la cerveza (Iimure y Sato, 2013).

Maduración o guarda

Este producto recién obtenido o cerveza verde todavía contiene las características de sabor y aroma que no son deseables y que deben eliminarse mediante un acondicionado (Hughes y Baxter, 2003).

Envasado

Tras el acondicionado, la cerveza se centrifuga para eliminar los restos de levaduras, posteriormente refrigerada, filtrada y envasada en botellas, latas o barriles. El proceso de empaquetado debe ser eficiente en términos de velocidad. Esta es la cerveza acondicionada en fábrica y representa la mayor parte de la cerveza que se encuentra hoy en el mercado (Bamforth, 2009; Hughes y Baxter, 2003).

En la *figura 5* se muestra el diagrama de flujo simplificado del proceso de elaboración de cerveza.

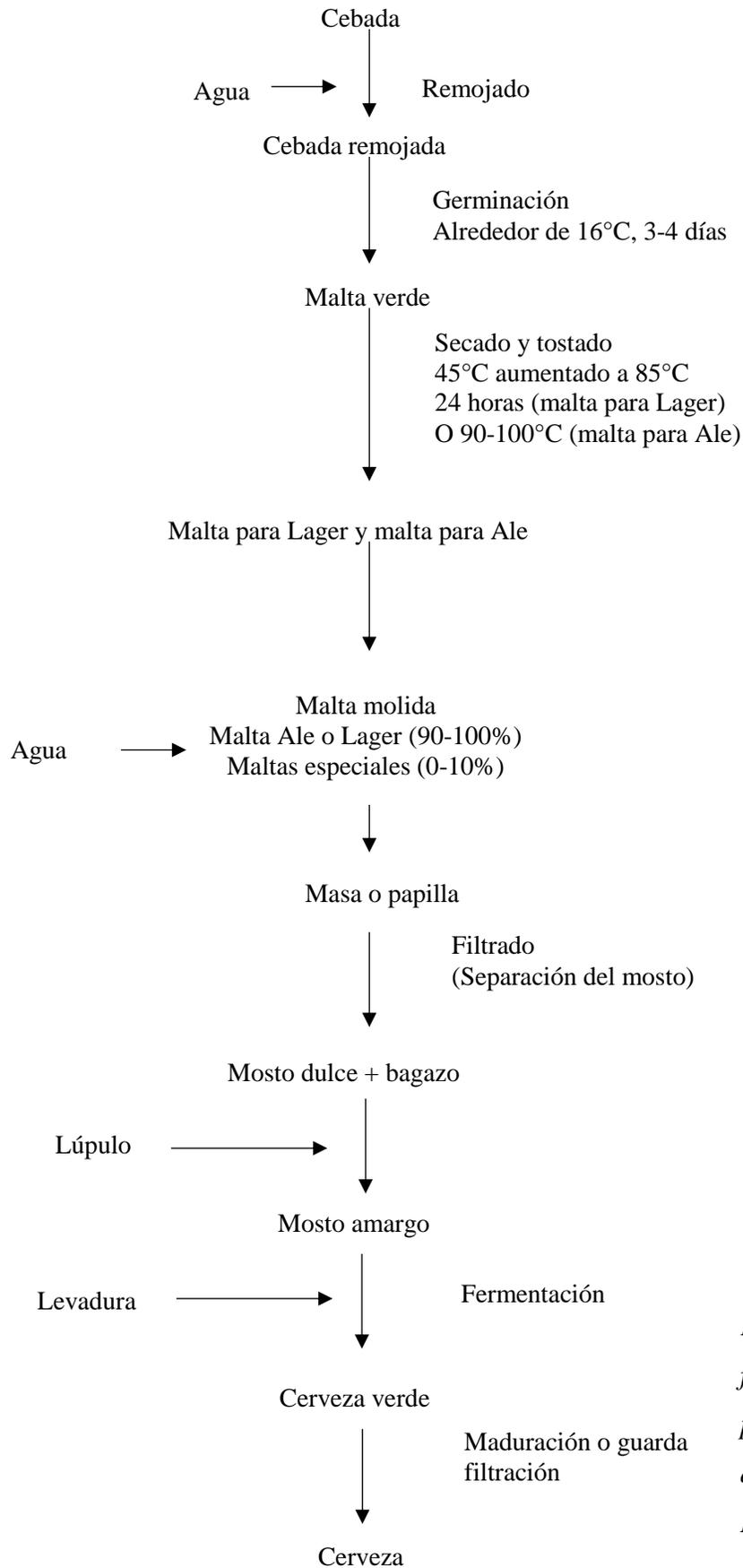


Figura 5. Diagrama de flujo simplificado del proceso de elaboración de cerveza (Hughes y Baxter, 2003).

1.4.3 Composición química de la cerveza y valor nutritivo

Desde tiempos antiguos se sabe que la cerveza puede ser un importante contribuyente a la dieta, dejando a un lado su papel para calmar la sed (Bamforth, 2002; Hughes y Baxter, 2003). La cerveza comprende cientos de compuestos diferentes. Algunos de ellos se derivan de materias primas y pasan sin cambios a través del proceso de elaboración de la cerveza, mientras que otros se producen durante el proceso. Las materias primas en la cerveza son agua, malta de cebada y de otros cereales, lúpulo y levadura (Mignani *et al.*, 2013; Preedy, 2009). En la *tabla 2* se muestra la composición química de la cerveza.

Tabla 2. Composición de la cerveza

Sustancias	Concentración
Agua	90-94%
Alcohol	2,5-3,5% v/v
Carbohidratos	1-6% w/v
Dióxido de carbono	3,5-4,5 g/l
Sales inorgánicas	50-4,000 mg/l
Contenido total de nitrógeno	300-1,000 mg/l
Derivados del lúpulo	20-60 mg/l
Proteínas totales, péptidos y aminoácidos	0,2-0,6%
Lípidos	Despreciable
Vitaminas y otros micronutrientes	0,002%
Fibra	0,3-1,0%

(Hughes y Baxter, 2003; Preedy, 2009)

Como se observa en la *tabla 2*, es evidente que la cerveza contiene cantidades significativamente mayores de los principales nutrientes (proteínas, carbohidratos, fibra y vitaminas) que otras bebidas alcohólicas como el vino y no alcohólicas como la limonada o las colas, además también contiene antioxidantes y ciertos minerales. Su contenido de vitaminas es tan adecuado como el de la leche, en tanto que el contenido de grasa es muy inferior. Sin embargo, la leche tiene un contenido en proteínas superior al de la cerveza (Bamforth, 2002; Hughes y Baxter, 2003).

El agua es cuantitativamente el ingrediente principal de las cervezas: forma más del 90% y a menudo incluso más de 94% del producto final. No es de extrañar que su composición sea muy importante y de interés fundamental para la industria cervecera. Cualquier agua que va a terminar en una botella de cerveza debe ser de la más alta calidad química y microbiológica. El agua debe cumplir con todos los requisitos legales tanto químicos como microbiológicos, así como satisfacer el estándar de nitidez, gusto, olfato y la falta de color en la cerveza (Preedy, 2009).

1.4.4 Situación económica de la cerveza

México es un importante productor de cerveza en el mundo. El 50 por ciento de la producción mundial se concentra en China con 18.5%, Estados Unidos 17.7%, Alemania 8% y Brasil con 5%. Reino Unido, Japón y México tienen una participación promedio de 4% cada uno.

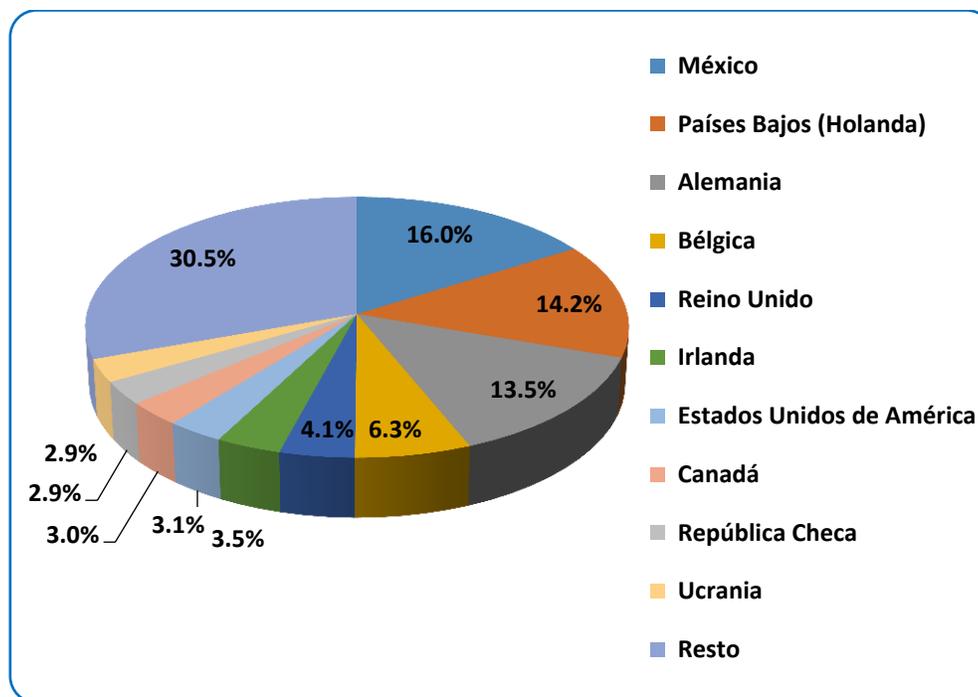


Figura 6. Exportaciones Mundiales de cerveza de malta (Con base en el Volumen (Toneladas) registrado por cada país (CANICERM, 2014).

México es uno de los principales países productores y exportadores de cerveza, su reconocida calidad ha hecho que la Industria Cervecera Mexicana aporte a la economía mexicana cerca de dos mil millones de dólares por concepto de

exportaciones de sus productos (CANICERM, 2014). La cerveza mexicana tradicionalmente ha ocupado el primer lugar mundial en ventas al extranjero (*Figura 6*). Entidades con vocación agroindustrial como el D.F. (1,041 mdd) y Nuevo León (292 mdd) contribuyen con más del 84% de las exportaciones nacionales (SAGARPA, 2011).

Estados Unidos es el principal importador de cerveza mexicana (consume 86 por ciento del total de las exportaciones), el resto de las exportaciones las demandan Canadá, Bélgica y España con una participación de 4, 2 y 1 por ciento, respectivamente.

La Industria Cervecera Mexicana aporta anualmente más de 20 mil millones de pesos por concepto de impuesto especial a la producción. Este impuesto es la tercera parte de los impuestos especiales que se recaudan en el país, si se excluyen aquellas contribuciones especiales provenientes de los combustibles (CANICERM, 2014).

1.4.5 Consumo a nivel internacional

La cerveza es la tercera bebida más consumida en el mundo, después del agua y té, y la primera bebida alcohólica más consumida. Debido a que contiene un 93% de agua, la cerveza es una bebida refrescante, agradable y que calma la sed, con un bajo grado alcohólico y gran aporte de carbohidratos, trae placer y exhorta la interacción social entre muchas personas (Mignani *et al.*, 2013).

En el mundo, el principal consumidor de cerveza es la República Checa con 189 Litros (L) per cápita anual, seguido de Alemania con 131 L, Inglaterra con 103 L, Estados Unidos con 85 L, España con 66 L, Japón con 57 litros (CANICERM, 2014).

1.4.6 Consumo a nivel nacional

El consumo nacional aparente de cerveza en México se ha mantenido en 62 litros de cerveza por persona al año. (CANICERM, 2014). México es el sexto consumidor de cerveza en el mundo (PROFECO, 2013).

En México ocho de cada diez bebidas con contenido alcohólico son cervezas. México se encuentra por debajo del consumo promedio que registran países como la República Checa, Alemania y Estados Unidos, por lo que se espera que en el mediano y largo plazo, México logre aumentar el consumo per cápita. Por ello, la industria impulsa en el país una campaña de

cultura cervecera que imponga el consumo inteligente, se quiere ampliar la base de consumidores, más no a la misma gente consumiendo más cerveza. Se quiere hacer que el mexicano esté orgulloso de la cerveza mexicana, como el alemán se siente orgulloso de la industria automotriz, el francés por los perfumes, el italiano por el diseño (El Economista, 2014).

En el mundo existe una inmensa variedad de marcas de cerveza y sólo en México se comercializan más de 56, entre nacionales y extranjeras (PROFECO, 2013).

La cebada se ha usado como un sistema genético modelo debido a su diploidía, junto con la similitud de su genoma a la de otros cereales de grano pequeño. La importancia como modelo experimental, incluso ha ido en aumento en la era de la genética molecular y la genómica. Los primeros informes sobre la transformación de la cebada a través de los métodos de transferencia de ADN directos, se remontan a la primera mitad de la década de 1990. Desde entonces, se han realizado enormes progresos gracias a una serie de mejoras técnicas y el desarrollo de otros métodos de transformación de la cebada (Hensel *et al.*, 2008), por lo que es posible encontrar cebada que haya sido genéticamente modificada y por consecuencia que exista cerveza que sea transgénica.

1.5 ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

1.5.1 Definición de organismos genéticamente modificados

Los organismos genéticamente modificados (OGM) son los microorganismos, plantas o animales, en el que sus composiciones genéticas han sido alterados por una técnica de modificación genética para obtener nuevas características, tales como la tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos, una vida útil mejorada o composición nutricional modificado (Greiner y Konietzny, 2008; Özgen *et al.*, 2013). Generada a través de uso de técnicas de la biotecnología moderna (COFEPRIS, 2014).

Es necesario enfatizar la clara distinción que hay entre la generación de un OGM y de un híbrido. En los OGM, lo único que se hace es introducir uno o unos pocos genes en el organismo que se quiere modificar. En cambio, en la generación de un híbrido, una práctica agronómica muy antigua, se cruzan dos variedades de una misma especie o dos especies diferentes, que son siempre genéticamente y evolutivamente muy cercanas, para obtener una

nueva variedad o una especie nueva, cuyo genoma es el resultado de la combinación de los genomas de las dos variedades o especies iniciales. Por otra parte, en la generación de OMG los genes implicados pueden provenir de especies muy diversas y evolutivamente alejadas. No obstante, en el diseño de OMG no se produce en ningún caso una especie nueva, sino una nueva variedad de una especie ya existente (Bueno, 2011).

Los transgénicos tienen características novedosas y han sido creados en forma intencional por los científicos, a través de la modificación genética de plantas, animales y microorganismos con el fin de conferirles atributos y habilidades que no tenían en condiciones naturales y con la intención de aportar un beneficio y resolver problemas para la agricultura, la salud humana y animal y el ambiente, energías renovables, la industria, entre otros, empleando para ello el conocimiento científico que ofrecen la Biología y la Genética (Villalobos, 2008; COFEPRIS, 2014).

Los cultivos y alimentos transgénicos, uno de los grupos más importantes de organismos genéticamente modificados (OGM) son un producto reciente en el mercado mundial: a partir de 1996 se comienzan a sembrar libremente en Estados Unidos. Las transformaciones genéticas presentes en estas variedades comerciales son básicamente dos: resistencia a herbicidas y resistencia a insectos (Deloya, 2011).

1.5.2 Técnicas de modificación genética

La transgenia se emplea para mover genes entre especies no emparentadas (no relacionadas taxonómicamente) y de esta forma, superar las barreras establecidas por la naturaleza, creando con su aplicación nuevas recombinaciones genéticas, cuya expresión le confiere al individuo transformado o transgénico, nuevas habilidades que no tenía de origen (Villalobos, 2008).

Los pasos básicos para generar un OGM son las siguientes (*Figura 7*):

1. Identificar el gen de interés y una secuencia reguladora que controle la expresión de forma precisa y controlada.
2. Cortar y unir el gen y la secuencia reguladora; es decir, generar el ADN recombinante.
3. Obtener un número suficiente de copias de ADN recombinante para poder manipularlas con comodidad.

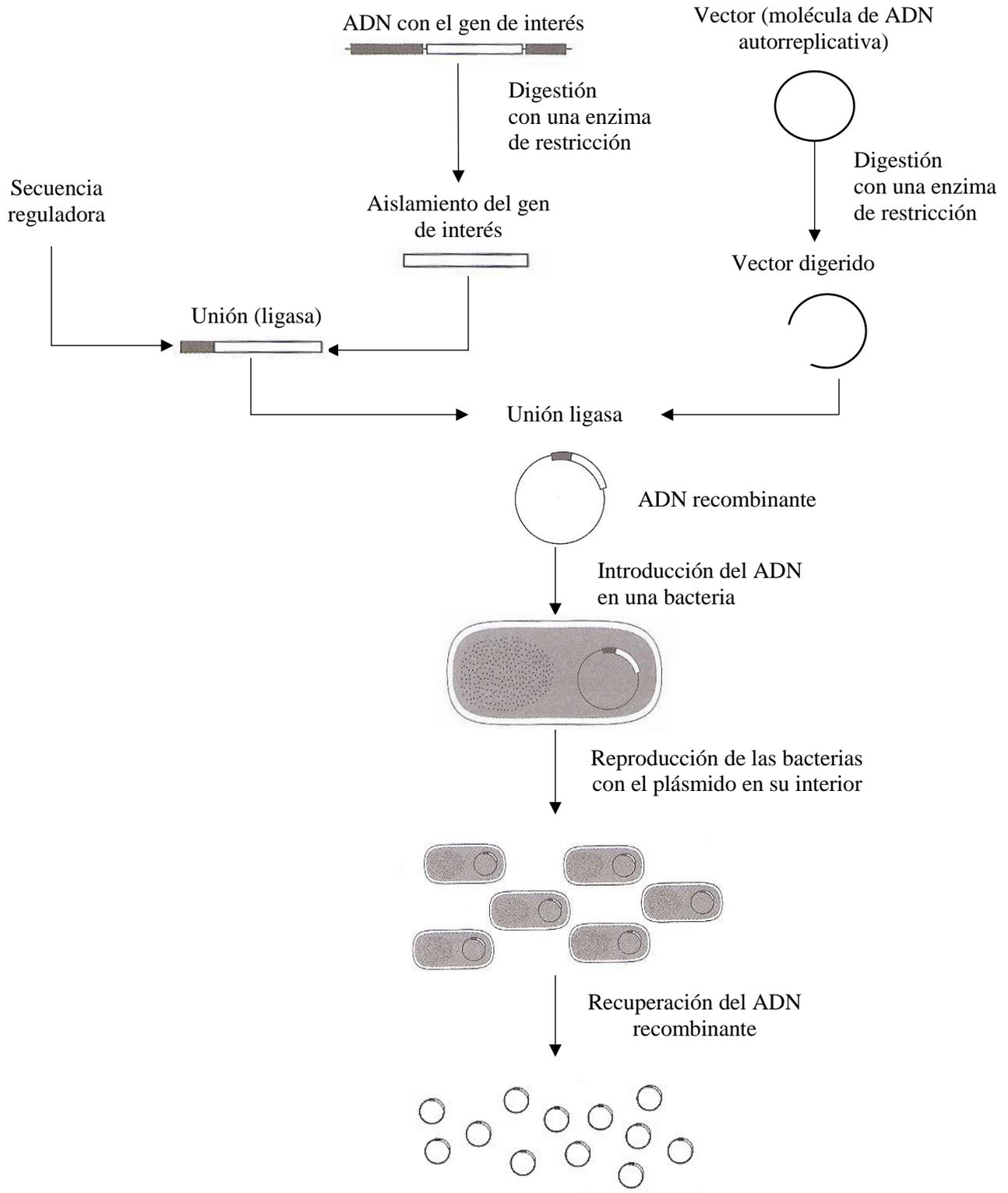


Figura 7. Esquema simplificado del proceso completo de manipulación de ADN
(Bueno, 2011)

4. Introducir el ADN recombinante en la célula huésped (la receptora), que se convertirá directamente en un OGM si se trata de un organismo unicelular (bacterias, levaduras o células de mamífero en cultivo), o será un paso intermedio en la construcción del OGM si proviene de un organismo pluricelular, como un animal o una planta.
5. Finalmente, obtener un número significativo de OGM idénticos a partir del inicial, ya sea estimulando su reproducción si son unicelulares o bien mediante apareamientos selectivos si es pluricelular (Bueno, 2011).

Se han desarrollado diferentes métodos para introducir genes foráneos en plantas. Una característica común es que el ADN transformante tiene que vencer diferentes barreras; primero tiene que entrar a la célula vegetal atravesando la pared celular y la membrana plasmática y posteriormente tiene que llegar al núcleo e integrarse en los cromosomas residentes. Los métodos de transformación más exitosos y más ampliamente utilizados son el de *Agrobacterium tumefaciens* y la transferencia directa mediante el bombardeo con micro-partículas. Otros métodos de transformación directa son además mencionados en las siguientes secciones (Martínez *et. al.*, 2004).

1. El sistema de *Agrobacterium tumefaciens*.

Es un método indirecto, basado en una bacteria patógena (Giraldo, 2009). *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria del suelo muy común, e infecta las plantas en forma natural por medio de un ingenioso mecanismo que es, de hecho, una forma natural de Ingeniería Genética. El proceso por medio del cual la bacteria ataca a las plantas consiste en la inserción natural de un segmento de ADN de la propia bacteria (que se conoce como T-ADN) al genoma de la célula huésped. Este segmento de ADN que viaja de la bacteria a la célula huésped es parte de un plásmido de la bacteria responsable de ocasionar un tumor en la planta cuando ésta tiene heridas (el tumor es el daño físico de la enfermedad) y recibe el nombre de plásmido Ti (del inglés Tumor inducer). Lo interesante de este mecanismo de infección es que el segmento insertado es capaz de integrarse al genoma de la planta infectada y, una vez incorporado, puede procesarse en la célula huésped, promoviendo la división celular sin control y originar el tumor (Villalobos, 2008).

Este sistema ha sido utilizado para transformar un amplio rango de especies vegetales y aunque inicialmente la transformación de cereales se consideró como imposible, unos años después de la transformación exitosa de un rango de especies dicotiledóneas, se demostró que cereales tales como el maíz y el arroz podían ser transformados. Recientemente, también se ha demostrado que los hongos pueden ser transformados usando este sistema. Es considerado la primera opción para transformar plantas (Martínez *et al.*, 2004).

2. El método de biobalística

El método de biobalística fue desarrollado como una necesidad para transformar especies de plantas originalmente recalcitrantes a la transformación por el sistema de *Agrobacterium*, incluyendo los cereales económicamente importantes. Este es un método directo, que consiste en la introducción de proyectiles, usualmente de tungsteno u oro cubiertos de ADN e impulsados al interior de las células blanco por aceleración. Sobre los microproyectiles se ubican los plásmidos que contienen el casete de expresión de interés (Giraldo, 2009). La velocidad de las partículas puede ser generada por la explosión de una pistola convencional o una descarga por gases a alta presión, tales como helio o bióxido de carbono (Martínez *et al.*, 2004). El bombardeo con microproyectiles o técnicas de bombardeo de partículas han sido ampliamente utilizados para la transformación de cereales. Estos métodos se basan en la aceleración de partículas de oro, revestidas con ADN plásmido, en células de plantas como un método de introducir directamente el ADN (Jones y Shewry, 2009).

3. Microinyección

Consiste en inyectar la construcción genética dentro del núcleo de la célula receptora o de un protoplasto (que es la célula vegetal desprovista de la pared celular), por medio de una aguja microscópica de vidrio (Villalobos, 2008).

4. Electroporación

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

En los dos métodos, inicialmente se obtienen células transformadas, a partir de las cuales y mediante el uso de técnicas de cultivos in vitro, se regenera una plántula completa. Posteriormente, las plántulas potencialmente transgénicas son caracterizadas molecularmente, determinando el número de copias del transgen, y los niveles de expresión a nivel de RNA mensajero y proteína. Luego son sometidas a ensayos biológicos para estudiar el fenotipo, es decir, determinar si son realmente resistentes a insectos o a herbicidas, cual es el nivel de esa resistencia y contra qué tipo de organismos o agentes activos. Finalmente, se realizan detallados estudios de bioseguridad, para analizar posibles efectos negativos en el ambiente o en los organismos que vayan a alimentarse con ese producto. Si se comprueba que no tiene efectos perjudiciales sobre el ambiente, sobre las personas o los animales que los consuman, se acepta su liberación comercial (Giraldo, 2009).

1.5.3 Aplicación de los organismos genéticamente modificados en la industria alimentaria

Existen numerosas aplicaciones en la industria alimentaria, por ejemplo:

En animales:

- Domesticación de nuevas especies.
- Mejoramiento en calidad nutricional o rendimiento.
- Mayor crecimiento y con mayor rapidez por efecto de la hormona de crecimiento.
- Aumento de la producción de la leche en vacunos y producción de leche humana.
- Uso de la glándula mamaria como biofactoría para la obtención de proteínas de alto valor añadido, incluyendo producción de fármacos y anticuerpos.

En agricultura:

- Creación de plantas con resistencia a enfermedades y plagas.
- Reducción en el uso de herbicidas y pesticidas.
- Reducción de costos por menor empleo de máquinas y equipos para control mecánico de las malezas y para las aplicaciones de herbicidas.
- Reducción de pérdidas por ataques de insectos.
- Creación de plantas con resistencia a la sequía, a alta o baja temperatura, a suelos ácidos o salinos.

- Fijación de nitrógeno, evitando el uso de fertilizantes nitrogenados.
- Mejoramiento en calidad nutricional o rendimiento, por ejemplo, el incremento de cosechas de arroz por empequeñecimiento.
- Plantas más cortas producen más nutrientes disponibles para la producción de grano.
- Alteración para retardar la maduración y así contar con más tiempo para el transporte y almacenamiento. Por ejemplo, la maduración retardada del tomate hace que se mantenga firme por mucho tiempo después de la cosecha.
- El tomate tradicional es cosechado mientras esta todavía verde y firme para que no se dañe durante el transporte al supermercado y es rociado con etileno después del transporte para inducir la maduración.
- “Biofarmacias”: producción de moléculas industriales o farmacéuticas basada en cultivos vegetales. Por ejemplo, tomates que producen una vacuna contra la hepatitis y patatas que expresan vacunas contra rotavirus y contra *Escherichia coli*, que produce diarrea.

La industria biotecnológica se ha triplicado en los últimos 10 años, aportando en la actualidad el 80% de las patentes que se manufacturan anualmente (Rodríguez, 2013).

1.5.4 Situación de los alimentos genéticamente modificados en México

Los cultivos principales utilizados en la generación de OGMs y solicitados para su autorización en México son en su mayoría de maíz y de algodón y en menor cantidad solicitudes de soya, canola, remolacha, arroz, alfalfa, jitomate y papa.

Desde 1995 a febrero 2013, la Secretaria de Salud ha evaluado la inocuidad alimentaria y otorgado su no inconveniencia o su autorización para su comercialización con fines de uso o consumo humano de 116 eventos genéticamente modificados, de acuerdo a lo que establece la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados y el Reglamento de la Ley de Bioseguridad de OGMs (*Figura 8*).

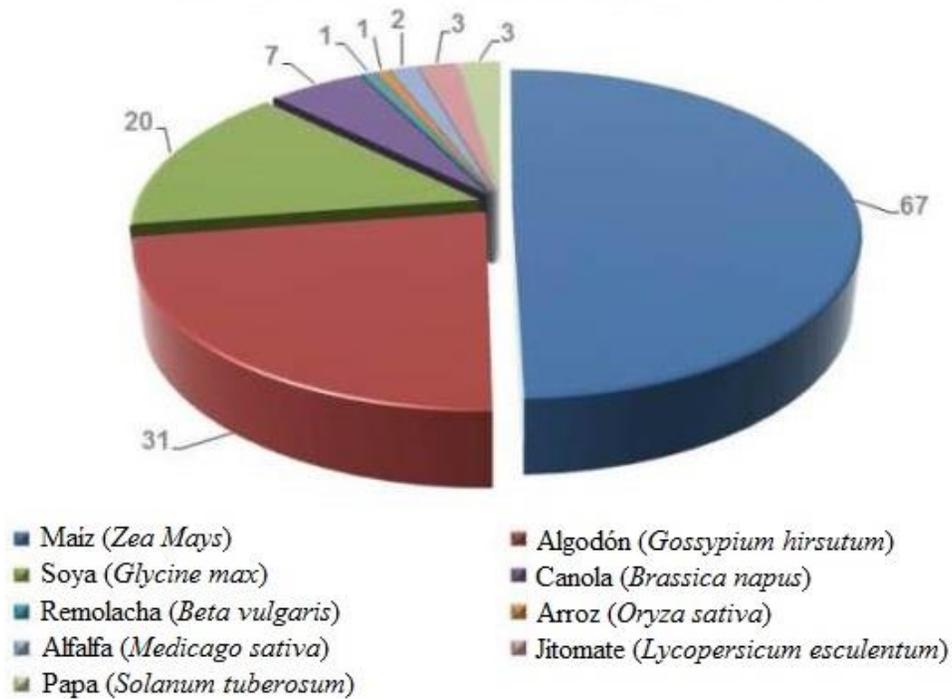


Figura 8. Cultivos utilizados para la Generación de OGMs, autorizados por la COFEPRIS, 1995-2004 (Datos a Diciembre de 2014) (COFEPRIS, 2014).

Considerado un record, el año pasado fueron cultivadas 175,2 millones de hectáreas de cultivos biotecnológicos a nivel mundial, a una tasa de crecimiento anual del 3%, o 5 millones hectáreas más que en 2012 (ISAAA, 2014) (Figura 9).



Figura 9. Hectáreas de cultivos biotecnológicos a nivel mundial. (ISAAA, 2014)

La superficie mundial de cultivos biotecnológicos ha aumentado más de 100 veces en 18 años, pasando de 1,7 millones de hectáreas en 1996 a 175,2 millones de hectáreas en 2013, haciendo a los cultivos biotecnológicos, la tecnología de cultivos más rápida en la historia reciente (ISAAA, 2014) (Figura 9).

Dieciocho años después de la primera plantación comercial de cultivos transgénicos, y por segundo año consecutivo desde 2012, los países en desarrollo sembraron más hectáreas de cultivos transgénicos que en los países industriales, produciendo el 54% de la producción mundial en 2013, de los 27 países que sembraron cultivos biotecnológicos el año pasado, 19 fueron en desarrollo, mientras que sólo 8 países industriales plantaron cultivos biotecnológicos (ISAAA, 2014) (Figura 10).

La producción y comercialización de cultivos transgénicos a nivel internacional se ha incrementado de manera constante desde que se introdujeron al comercio en 1994. Es importante destacar los cultivos que predominan en el mercado, la modificación genética más empleada, los principales países productores, la situación de México en el contexto de los cultivos transgénicos con respecto a su comercialización y cultivo (Rodríguez y González, 2007).



Figura 10. 27 países sembraron cultivos biotecnológicos en 2013. (ISAAA, 2014)

El primer cultivo aceptado a nivel internacional y nacional fue el jitomate FLAVR SAVR®, desarrollado por el grupo Calgene, que presenta la característica de maduración lenta (Rodríguez y González, 2007). Desde entonces, la adopción de los cultivos GM ha incrementado continuamente a nivel mundial con una tasa de crecimiento de 13%.

Actualmente existe una gran polémica en cuanto a sí los OGM pueden causar un daño al medio ambiente y a la salud. Según (Díaz, 2015) en teoría los transgénicos no pueden exonerarse de ser nocivos, porque no han probado su total y absoluta inocencia. La ausencia de pruebas concluyentes de uno o del otro bando sobre la total bondad de los productos transgénicos o de sus efectos perniciosos tiene varias razones:

Por ejemplo, que son tantos los efectos que se deberían considerar para liberar de posibles culpas, que la prueba de todas es imposible, tanto por la magnitud del trabajo a realizar, la falta de la información previa confiable, así como por el costo de llevar la investigación a cabo. Tal carga no sería razonable que la costearan las empresas interesadas en la producción de transgénicos, pues al final serían tantos los gastos que no habría utilidades. Otra razón aparece cuando se considera que los efectos indeseados de los transgénicos pueden tardar en manifestarse mucho tiempo. Esto es potencialmente posible cuando se considera que los cambios en la naturaleza a veces tardan muchos años. Las empresas muy difícilmente persistirían en sus objetivos de producir un transgénico y esperar tanto tiempo para ver las posibilidades de comercialización logradas.

En nuestro país, el organismo encargado de la bioseguridad es la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM), la cual está integrada por los titulares de las Secretarías de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA); Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT); Salud; Educación Pública (SEP); Hacienda y Crédito Público (SHCP) y Economía, así como por el Director General del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (COFEPRIS, 2014).

La función primordial de la CIBIOGEM, es verificar el cumplimiento de las leyes y reglamentaciones adoptadas en el país en relación a la importación, consumo y siembra (inclusive a nivel experimental) de cultivos transgénicos. Es importante enfatizar que las leyes nacionales están en concordancia con acuerdos internacionales como el Protocolo de Cartagena. Existen apartados en varias normas y leyes mexicanas en relación con los productos que contengan modificaciones genéticas, sin embargo a falta de una normatividad específica para la bioseguridad, en el 2005 se aprobó la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (Rodríguez y González, 2007).

En México la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados tiene como objeto regular las actividades de utilización confinada, liberación experimental, liberación en programa piloto, liberación comercial, comercialización, importación y exportación de organismos genéticamente modificados, con el fin de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que estas actividades pudieran ocasionar a la salud humana o al medio ambiente y a la diversidad biológica o a la sanidad animal, vegetal y acuícola (Ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados, 2005).

1.5.5 Cebada genéticamente modificada

En 1994 se informó por primera vez acerca de plantas fértiles transformadas y éstas se obtuvieron utilizando bombardeos de partículas o métodos biobalísticos. Desde entonces ha habido muchos informes de la producción de cebada transgénica usando esta tecnología. Como se mencionó anteriormente ésta metodología utiliza un sistema de suministro de partículas o “pistola de genes” para insertar el ADN de interés que está recubierto sobre partículas de metal o microproyectiles de aproximadamente 1µm de diámetro. Se prefiere oro para los microproyectiles. Sin embargo, más recientemente, la transformación mediante *Agrobacterium* ha sido adoptada como el método de elección para la mayoría de los cereales incluyendo cebada. Los procedimientos biobalísticos siguen siendo importantes para algunas aplicaciones de transformación de la cebada (Jones y Shewry, 2009).

En una comparación entre el bombardeo de partículas y las técnicas con *Agrobacterium-mediated* para la transformación de cebada (Travella *et al.*, 2005), se encontró que el bombardeo de partículas produjo menores eficiencias de transformación, líneas transgénicas con un mayor número de copias del transgén (s), y mayor incidencia de silenciamiento del transgén. Es por estas razones que los métodos por *Agrobacterium-mediated* son ahora preferidos para la mayoría de las aplicaciones. Sin embargo, para algunas aplicaciones, tales como la entrega de transgenes múltiples, el bombardeo de partículas todavía podría ser el método de elección (Agrawal *et. al.*, 2005).

Los métodos para la transformación de la cebada que utilizan técnicas mediadas por *Agrobacterium* han estado disponibles durante los últimos 10 años. *Agrobacterium* ofrece un número de ventajas sobre las técnicas mediadas por bombardeo de partículas en términos de eficiencia y la calidad de las plantas transformadas producidas.

Las ventajas del sistema de *Agrobacterium* incluyen eficiencias más altas de transformación, menor número de copias de transgen y una mayor herencia estable de los transgenes con menos silenciamiento del transgén.

La transformación de cebada es todavía muy dependiente del genotipo. El genotipo más sensible es el cultivar primavera Golden Promise (Jones y Shewry, 2009).

Una gran variación genética de la cebada ha producido cultivos particularmente tolerantes al frío, a la salinidad, a la sequía, y al suelo alcalino. Por lo tanto, es posible cultivar la cebada en ambientes diversos (Mrízová *et al.*, 2014).

En muchos informes de la transformación de cebada, se utilizó el gen *bar* que confiere resistencia al grupo glufosinato de herbicidas, para la selección junto con bialafos o fosfotricina (PPT) como el agente selectivo (Travella *et al.*, 2005). Esto ha sido reemplazado en gran medida con el gen *hpt* que confiere resistencia al antibiótico higromicina como marcador seleccionable de elección. El gen de resistencia a higromicina puede ser impulsado por un promotor 35S de CaMV para la selección en la cebada, dejando promotores más fuertes tales como el promotor de ubiquitina de maíz (*ubi1*) disponible para conducir un gen o casete de interés (Jones y Shewry, 2009).

1.6 GENERALIDADES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Problemas relacionados con la detección y la trazabilidad de los organismos modificados genéticamente (OGM) están ganando interés mundial debido a la cada vez mayor difusión global y las implicaciones socio-económicas relacionadas. El interés de la comunidad científica en los aspectos de trazabilidad se ha incrementado de forma simultánea. La detección e identificación de los OGM representan un área relativamente nueva de diagnóstico en el que ya se ha logrado mucho progreso con ADN y métodos basados en proteínas (Miraglia *et al.*, 2004).

Debido a la comercialización de alimentos o ingredientes de alimentos derivados de la ingeniería genética, así como para regular la presencia de OGM en los cultivos, alimentos, piensos y en los ingredientes, muchos gobiernos han implementado regulaciones para el uso y el etiquetado de dichos productos. Por lo tanto, los métodos de análisis fiables y sensibles se

han desarrollado para monitorear y verificar la presencia y la cantidad de organismos genéticamente modificados (OGM) en los cultivos agrícolas y en los productos derivados de los mismos. Hasta ahora, la detección y cuantificación de los OMG y los productos derivados de los mismos se haya basado en la detección del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o en la detección de proteínas utilizando ensayos inmunológicos tales como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Asensio *et al.* 2008; Greiner y Konietzny, 2008).

En general, ELISA es el método de elección para la detección de un OMG particular en la materia prima, alimentos procesados semi procesados e ingredientes, siempre que la proteína expresada no se haya degradado y pueda ser detectada. Sin embargo, al tener ELISA el poder de detección más bajo que los métodos de PCR, es menos sensible para el ensayo de productos alimenticios terminados con muchos ingredientes, sobre todo si el umbral de detección es baja. Aunque las pruebas a base de proteínas son prácticos y efectivos, algunos productos modificados genéticamente no expresan una proteína detectable (Asensio *et al.*, 2008).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la síntesis específica y exponencial de una región de ADN predeterminado, mediante el uso de dos pequeños fragmentos diseñados específicamente de ADN (*primers* u oligonucleótidos), que forman los dos extremos de la molécula de ácido nucleico a amplificar. Las reacciones de amplificación de PCR en general son altamente específicas, estando determinadas por la correcta hibridación de secuencias específicas del *primer*, para complementar secuencias presentes en la molécula de ADN diana a amplificar. Los *primers* comprenden secuencias de nucleótidos específicas que están diseñados para hibridar con la hebra ya sea en paralelo o anti-paralelo de la molécula diana de ADN, y como tal los *primers* tienen que ser complementarios a sus secuencias diana (Van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

La reacción en cadena de la polimerasa es el método de laboratorio de elección para la detección de una modificación del ADN introducido en un organismo, debido a su alta sensibilidad, especificidad y rapidez. Hay diferentes cebadores de PCR para la amplificación de ADN presentes en la mayoría de los OMG, como el promotor 35S de CaMV y/o el terminador NOS de *Agrobacterium tumefaciens* y el plásmido Ti, por lo tanto estos elementos

genéticos se utilizan como secuencias diana para una detección general. Es decir la detección de estos elementos servirá como un diagnóstico de la gran mayoría de material vegetal de OGM. Esto tiene la ventaja de obtener una pista sobre la presencia de secuencias transgénicas a partir de un gran número de diferentes OGM (Greiner *et al.*, 2005; Tozzini *et al.*, 2000).

Dado que no es posible identificar el propio OGM, utilizando el enfoque de detección, una secuencia única de ADN para el OGM para ser identificado tiene que ser utilizado como una secuencia diana en la PCR. Secuencias de ADN únicas son parte del ADN recientemente introducido que abarca el límite de al menos dos elementos genéticos adyacentes (Greiner *et al.*, 2005)

La reacción en cadena de la polimerasa es en realidad un sistema que permite obtener, en pocas horas, varios millones de copias de una secuencia blanco de ADN (Villegas *et al.*, 2009).

La PCR es un proceso iterativo, que consta de tres elementos: la desnaturalización de la plantilla por el calor, la hibridación de los cebadores de oligonucleótidos con la secuencia diana de cadena sencilla (s), y la extensión de los cebadores apareados por una ADN polimerasa termoestable (Sambrook, 2001).

Desnaturalización: Secuencias de doble cadena de ADN se desnaturalizan a una temperatura que está determinado en parte por su contenido de G + C. Cuanto mayor sea la proporción de G + C, mayor es la temperatura requerida para separar las hebras de la secuencia de ADN. Cuanto más largas sean las moléculas de ADN, mayor será el tiempo requerido a la temperatura de desnaturalización elegido para separar las dos hebras completamente (Sambrook, 2001). La desnaturalización ocurre aproximadamente a una temperatura entre 94 y 96°C, y es aplicada durante pocos minutos (Villegas *et al.*, 2009). Si la temperatura de desnaturalización es demasiado baja o si el tiempo es demasiado corto, sólo serán desnaturalizadas las regiones ricas de adenina y timina en la secuencia de ADN. Cuando la temperatura se reduce más tarde en el ciclo de PCR, la secuencia de ADN se rehibrida en una condición totalmente nativa (Sambrook, 2001).

Hibridación de los cebadores para el modelo de ADN: A continuación se produce el anillamiento o hibridación de los cebadores con las secuencias complementarias del ADN. Los

cebadores son oligonucleótidos sintéticos que delimitan el sitio que se busca amplificar, y se anillan a temperaturas que oscilan entre 50 y 65°C (Villegas *et al.*, 2009).

La temperatura utilizada para la etapa de hibridación (T_a) es crítica. Si la temperatura de hibridación es demasiado alta, los cebadores de oligonucleótidos hibridan mal, en todo caso, el modelo y el rendimiento de ADN amplificado es muy bajo.

Si la temperatura de hibridación es demasiado baja, puede producirse la hibridación no específica de los cebadores, lo que resulta en la amplificación del segmento no deseado de ADN. La hibridación se lleva a cabo usualmente de 3-5 ° C más baja que la temperatura de fusión calculada a la que los cebadores de oligonucleótidos se disocian de sus secuencias (Sambrook, 2001).

Extensión de los cebadores de oligonucleótidos: Se lleva a cabo en o cerca de la temperatura óptima para la síntesis de ADN catalizada por la polimerasa termoestable, que en el caso de la ADN polimerasa Taq es 72-78 ° C. En los dos primeros ciclos, la extensión de un cebador procede más allá de la secuencia complementaria al sitio de unión del otro cebador. En el siguiente ciclo, las primeras moléculas son producidas, cuya longitud es igual al segmento de ADN delimitado por los sitios de unión de los cebadores. Desde el tercer ciclo en adelante, este segmento de ADN se amplifica geoméricamente, mientras que los productos de amplificación más largos se acumulan aritméticamente (Sambrook, 2001). Éste último ciclo permite a la ADN polimerasa sintetizarlas nuevas hebras de ADN, que serán complementarias a las cadenas originales. A medida que avanza el proceso se logra amplificar el segmento deseado unas 10^7 veces (Villegas *et al.*, 2009).

Número de ciclos: El número de ciclos necesarios para la amplificación depende del número de copias del modelo de ADN presente en el comienzo de la reacción y la eficiencia de la extensión del cebador y la amplificación (Sambrook, 2001). En la *Figura 11* se muestran los pasos involucrados en los primeros ciclos de una PCR.

Reglamentos, tanto para el etiquetado y la trazabilidad de los Organismos Genéticamente Modificados (OGM) en los alimentos y en las cadenas alimentarias están entrando en vigor en todo el mundo. Para este propósito, los métodos de detección fiables y precisos son una necesidad. Métodos basados en la PCR son los métodos más comunes y fiables desarrollados hasta el momento (Özgen *et al.*, 2013).

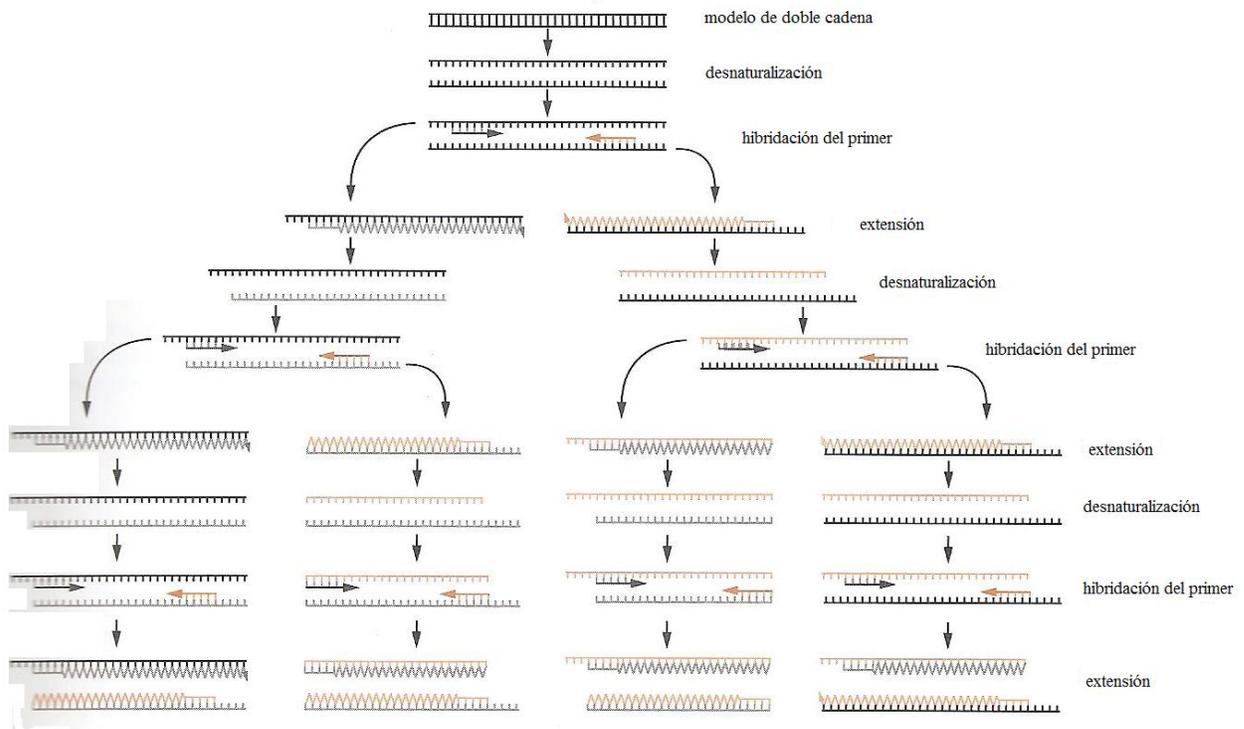


Figura 11. Secuencia de amplificación en la PCR (Sambrook, 2001). El modelo original (línea superior) es ADN de doble hebra y los cebadores de oligonucleótidos hacia la izquierda y hacia la derecha son mostrados como \leftarrow y \rightarrow , respectivamente. Los productos de las primeras rondas de la reacción de amplificación son heterogéneos en tamaño; sin embargo, la extensión de ADN que se extiende entre los dos cebadores se amplifica preferentemente y rápidamente se convierte en el producto dominante de la reacción de amplificación.

Los métodos de PCR se pueden utilizar tanto para propósitos cualitativos como cuantitativos (Özgen *et al.*, 2013). Los métodos cualitativos se dividen en dos categorías, en función de su especificidad. Los métodos de selección son menos específicos y detectan elementos comunes de ADN, tales como promotores y terminadores, presentes en muchos organismos modificados genéticamente diferentes. Actualmente los cultivos genéticamente modificados, que son comercializados, con frecuencia poseen nuevos genes, que están regulados transcripcionalmente por el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S r o por el terminador nopalina sintasa (NOS), o ambos, por lo que la mayoría de los métodos de detección de PCR se basan en la detección de estas secuencias en el producto, por lo que la detección de este promotor y este terminador en un determinado producto, indicará que se trata de un organismo transgénico (Miraglia *et al.*, 2004; Özgen *et al.*, 2013).

CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 Justificación

Como se ha mencionado la cebada es el cuarto cereal más importante en el mundo, y a pesar de que en México su consumo como grano no es tan importante en comparación con otros cereales como el maíz, para la elaboración de cerveza si es de suma importancia. Ya que México es el 6to productor de cerveza y el 1er exportador a nivel mundial. Además de que la cerveza es la 3ra bebida más consumida en el mundo, después del agua y del té, es por eso la importancia de determinar si esta bebida tan popular está elaborada con cebada genéticamente modificada, ya que aunque se desconocen los efectos que éstos organismos pueden causar en la salud del ser humano al ser consumidos, es importante saber lo que estamos consumiendo y así poder elegir lo que queremos en nuestra alimentación.

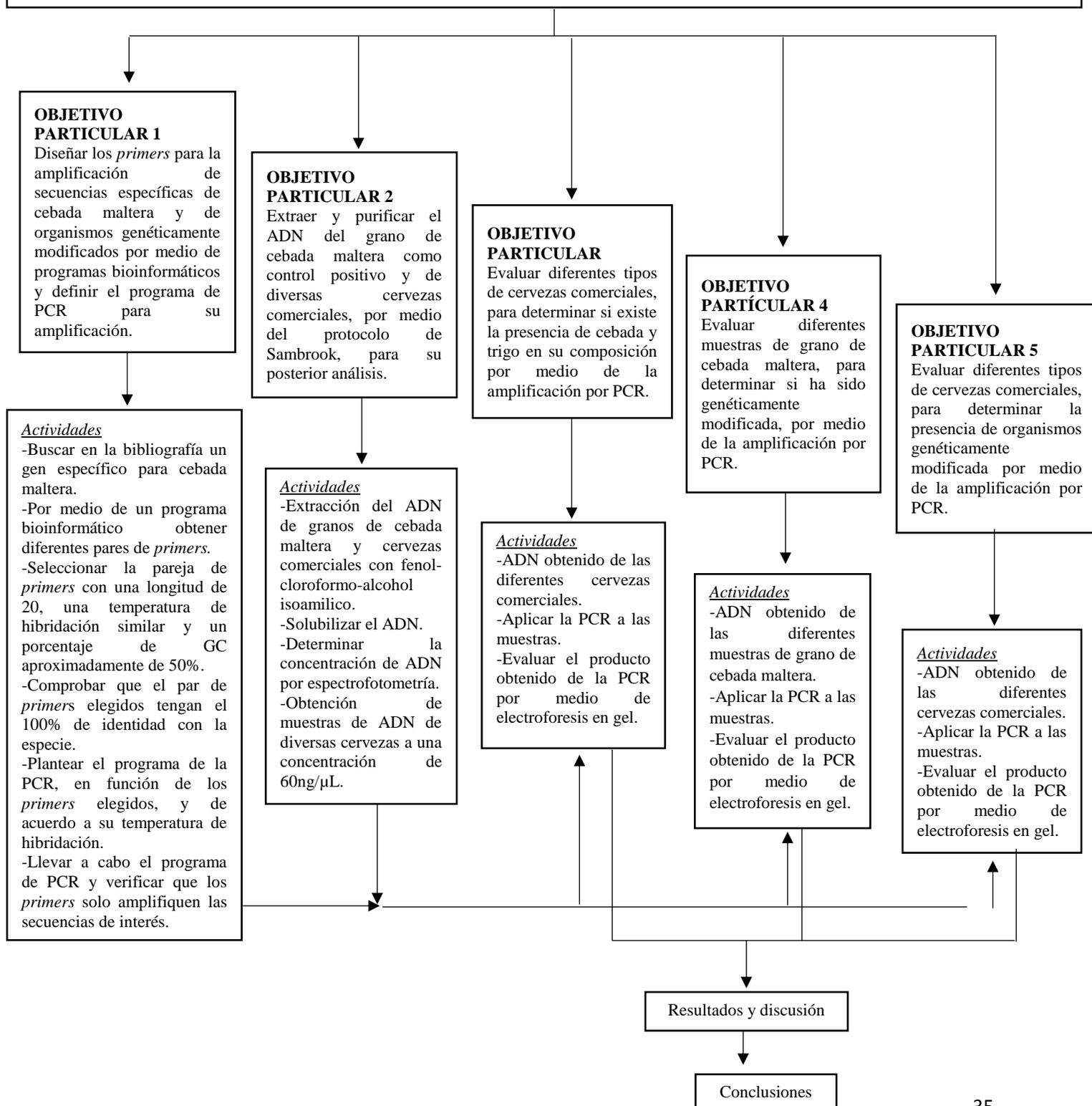
Sin dejar a un lado que al menos en nuestro país aún no está permitido el uso de cebada maltera transgénica para la elaboración de productos aptos para el consumo humano.

Es por ello que el objetivo de este proyecto es determinar la presencia de cebada maltera genéticamente modificada usada en la elaboración de cervezas por medio de la técnica de PCR. A continuación se muestra el cuadro metodológico en el cual se especifica las actividades a realizar para el cumplimiento de éste objetivo.

2.2 Cuadro metodológico

DETECCIÓN DE CEBADA MALTERA GENÉTICAMENTE MODIFICADA EN CERVEZA, POR MEDIO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

OBJETIVO GENERAL: Identificar la presencia de cebada maltera genéticamente modificada en cerveza por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, para informar a los consumidores.



DETECCIÓN DE CEBADA MALTERA GENÉTICAMENTE MODIFICADA EN CERVEZA POR MEDIO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

OBJETIVO GENERAL

Identificar la presencia de cebada maltera genéticamente modificada en cerveza por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, para informar a los consumidores.

○ OBJETIVO PARTICULAR 1

Diseñar los *primers* para la amplificación de secuencias específicas de cebada maltera y de organismos genéticamente modificados por medio de programas bioinformáticos y definir el programa de PCR para su amplificación.

Actividades

- Buscar en la bibliografía un gen específico para cebada maltera.
- Por medio de un programa bioinformático obtener diferentes pares de *primers*.
- Seleccionar la pareja de *primers* con una longitud de 20, una temperatura de hibridación similar y un porcentaje de GC aproximadamente de 50%.
- Comprobar que el par de *primers* elegidos tengan el 100% de identidad con la especie.
- Plantear el programa de la PCR, en función de los *primers* elegidos, y de acuerdo a su temperatura de hibridación.
- Llevar a cabo el programa de PCR y verificar que los *primers* solo amplifiquen las secuencias de interés.

○ OBJETIVO PARTICULAR 2

Extraer y purificar el ADN del grano de cebada maltera como control positivo y de diversas cervezas comerciales, por medio del protocolo de Sambrook, para su posterior análisis.

Actividades

- Extracción del ADN de granos de cebada maltera y cervezas comerciales con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.
- Solubilizar el ADN.

- Determinar la concentración de ADN por espectrofotometría.
- Obtención de muestras de ADN de diversas cervezas a una concentración de 60ng/μL.

○ **OBJETIVO PARTICULAR 3**

Evaluar diferentes tipos de cervezas comerciales, para determinar si existe la presencia de cebada y trigo en su composición por medio de la amplificación por PCR.

Actividades

- ADN obtenido de las diferentes cervezas comerciales.
- Aplicar la PCR a las muestras.
- Evaluar el producto obtenido de la PCR por medio de electroforesis en gel.

○ **OBJETIVO PARTICULAR 4**

Evaluar diferentes muestras de grano de cebada maltera, para determinar si ha sido genéticamente modificada, por medio de la amplificación por PCR.

Actividades

- ADN obtenido de las diferentes muestras de grano de cebada maltera.
- Aplicar la PCR a las muestras.
- Evaluar el producto obtenido de la PCR por medio de electroforesis en gel.

○ **OBJETIVO PARTICULAR 5**

Evaluar diferentes tipos de cervezas comerciales, para determinar la presencia de organismos genéticamente modificados por medio de la amplificación por PCR.

Actividades

- ADN obtenido de las diferentes cervezas comerciales.
- Aplicar la PCR a las muestras.
- Evaluar el producto obtenido de la PCR por medio de electroforesis en gel.

2.3 Material

2.3.1 Biológico

Para la realización de los objetivos que se indican en el cuadro metodológico, fueron requeridos granos de cebada maltera, comprados en distintos lugares, así como cervezas comerciales de origen nacional e internacional, elaboradas de cebada.

Se utilizaron 125µg de cada muestra de cebada maltera y 125 µL de cada cerveza.

En la *tabla 3* se observan las muestras de cebada utilizadas para su evaluación así como su procedencia.

Tabla 3. Muestras de grano de Cebada Maltera utilizadas para su evaluación.

Muestras de Cebada maltera	Nomenclatura	Procedencia
Cebada 1	C1	Michoacán 1
Cebada 2	C2	Michoacán 2
Cebada 3	C3	Azcapotzalco
Cebada 4	C4	Compañía Extractos y Maltas
Cebada 5	C5	Cuautitlán Izcalli
Cebada 6	C6	Tlalnepantla
Cebada 7	C7	Hidalgo
Cebada 8	C8	Cuautitlán México
Cebada 9	C9	Central de abastos de Iztapalapa

Mientras que en la *tabla 4* se muestran los trigos utilizados para su evaluación y su procedencia.

Tabla 4. Muestras de grano de trigo utilizadas para su evaluación.

Muestras de Trigo	Nomenclatura	Procedencia
Trigo 1	T1	Mercado "Guerrero"

Trigo 2	T2	Puebla
Trigo 3	T3	Tienda Angel C.A.
Trigo 4	T4	Tianguis Edo. Hidalgo
Trigo 5	T5	Mercado San Antonio
Trigo 6	T6	Mercado del Carmen
Trigo 7	T7	Trigo orgánico “GREEN CORNER”

Las cervezas utilizadas en la experimentación se muestran en la *tabla 5*.

Tabla 5. Muestras de cerveza comerciales de origen nacional e internacional utilizadas para su evaluación.

Cerveza	Nomenclatura	Mililitros	%Al. Vol.	Cervecería	País
Bohemia	Bo	355	4.9	Cuauhtémoc Moctezuma	México
Dos equis	Dx	355	2	Cuauhtémoc Moctezuma	México
Heineken	He	355	5	Cuauhtémoc Moctezuma	México
Modelo negra	Mn	355	5.3	Modelo	México
León	Ln	355	4.5	Modelo	México
Corona light	Cl	355	3.9	Modelo	México
Tempus	Te	355	5.2	Andreu Primus	México
Hofbräu Maibock	Hm	330	7.2	Staatl Hofbräuhaus	Alemania
Barrilito	Bt	325	3.6	Modelo	México
Harvest Ale	Ha	177.44	6.5	Fremont Brewing	E.U.A

London Porter	Lp	500	13.3	Fuller Smith & Turner PLC	Reino Unido
Indio	Id	355	4.1	Cuauhtémoc Moctezuma	México
Sol cero	So	355	0.5	Cuauhtémoc Moctezuma	México
Tecate	Tc	473	4.5	Cuauhtémoc Moctezuma	México
Victoria	Vt	473	4.0	Modelo	México
O'Douls	Ds	355	0.5	Anheuser-Busch	E.UA

2.3.2 Reactivos

Los reactivos utilizados para la realización de cada objetivo se muestran a continuación:

Extracción de ADN

- Solución de lisis (tris base 50 mM, pH=8, EDTA 0.1 M, SDS 0.5%)
- Enzima Proteinasa K (20mg/mL)
- Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico
- Etanol frío
- Agua libre de nucleasas

Reacción en Cadena de la Polimerasa

- PCR Master Mix (50 unidades de Taq DNA polimerasa, 400 μ M fr cada dNTP's y 3 mM de $MgCl_2$).
- Agua libre de nucleasas
- *Primers* para identificar cebada
- *Primers* para identificar trigo
- *Primers* para identificar organismos genéticamente modificados
-

Electroforesis

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

2.3.3 Equipos

- Termociclador, Apollo instrumentation ATC 401
- Thermomixer compact, Eppendorf
- Agitador vortex
- Microcentrífuga
- Nanoespectrofotómetro, *Accesolab* Nano Drop ND-1000
- Transiluminador de luz ultravioleta
- Juego de micropipetas
- Cámara de electroforesis

2.4 Métodos

2.4.1 Diseño de *primers*

A nivel mundial, la mayoría de las fábricas de cerveza utilizan fuentes de almidón alternativos llamados *Adjuntos*, además de la cebada malteada. Los adjuntos se utilizan para reducir el costo final de la formulación y/o mejorar el color, sabor y aroma de la cerveza. Los adjuntos más comunes son la cebada sin maltear, trigo, arroz o maíz, pero otras fuentes de azúcar, tales como almidón, sacarosa, glucosa y jarabe también se utilizan (Pires y Brányik, 2015). Por lo que se decidió detectar además de cebada maltera, también trigo en la cerveza, ya que de la misma manera que la cebada, es un ingrediente que puede determinar si una cerveza contiene organismos genéticamente modificados, por lo cual se diseñaron *primers* tanto para cebada maltera como para trigo.

El diseño de *primers* se realizó a partir de la región ITS1 (Internal Transcribed spacer-espaciadores internos transcritos) de la cebada maltera y del trigo, por medio de un programa bioinformático en la siguiente página electrónica:

El procedimiento del diseño se muestra en el Anexo 1.

Se eligieron los *primers* de acuerdo a que tuvieran un amplificado de 200 a 300 bp, con una temperatura de hibridación similar entre cada secuencia de oligos y con un contenido de GC% aproximado de 50.0%. El diseño de *primers* de cebada maltera y de trigo, se realizó de manera correcta, asegurándose que cada par tuviera 100% de identidad con la especie, esto para evitar su hibridación con alguna otra, ya que de lo contrario no hubieran servido para el estudio. Las secuencias y características de los *primers* diseñados para cebada maltera y para trigo se muestran en las tablas 6 y 7 respectivamente.

Tabla 6. Secuencias y características de los primers de cebada maltera (Hordeum vulgare) diseñados a partir del programa bioinformático NCBI.

<i>Primer</i>	Secuencia (5'→3')	T _m	Amplificado	Contenido de GC
<i>Primer Frontal</i>	CGACGATGGCATTGTTCGTC	56.7	242 pb	55.0%
<i>Primer Reverso</i>	ACCAGGTATCGCATTTTCGCT	56.8		50.0%

Tabla 7. Secuencias y características de los primers de Trigo (Triticum aestivum) diseñados a partir del programa bioinformático NCBI

<i>Primer</i>	Secuencia (5'→3')	T _m	Amplificado	Contenido de GC
<i>Primer Frontal</i>	TAATCCACACGACTCTCGGC	56.7	234 pb	55.0%
<i>Primer Reverso</i>	TTGAGAGACGAGGGACCAGA	56.8		55.0%

En cuanto a los *primers* para la identificación de organismos genéticamente modificados por medio del promotor CaMV y el terminador tNOS, no se diseñaron, éstos fueron obtenidos de un artículo (Karamollaoglu *et al.*, 2009). Sus secuencias y características de acuerdo al artículo se muestran en la *tabla 8*.

Tabla 8. Secuencias y características de los primers para CaMV y tNOS para la identificación de organismos genéticamente modificado. Obtenidos de un artículo (Karamollaoglu *et al.*, 2009).

Primer	Secuencia (5'→3')	Amplificado
Primer CaMV Frontal	GCTCCTACAAATGCCATCA	195 pb
Primer CaMV Reverso	GGATAGTGGGATTGTGCGTC	
Primer tNOS Frontal	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	180 pb
Primer tNOS Reverso	TTATCCTAGTTTGCGCGCTA	

2.4.2 Diseño del programa de amplificación

Se diseñó el programa de amplificación de acuerdo a la bibliografía, para el caso de la etapa de desnaturalización una temperatura entre 94 y 96°C de acuerdo a Villegas *et al.*, 2009 y en la etapa de extensión una temperatura entre 72-78°C según Sambrook, 2001.

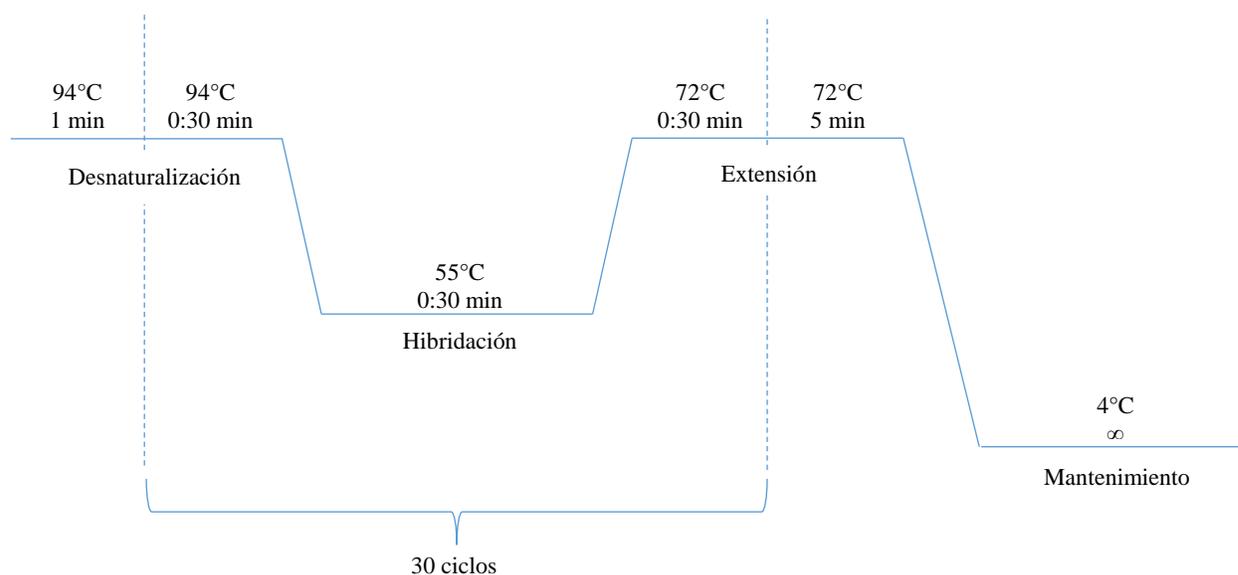


Figura 12. Programa diseñado para la amplificación de un fragmento de ADN de cebada maltera con los primers Cebada F/Cebada R y trigo con los primers Trigo F/Trigo R.

En cuanto a la temperatura de hibridación, ésta se eligió en base a la T_m de cada *primer*. Se utilizó el mismo programa para la amplificación de los *primers*: Cebada F/Cebada R y Trigo F/Trigo R, ya que presentaban una T_m similar y después de algunas pruebas, el programa con el que se obtuvo un mejor resultado y por lo tanto el que se utilizó se muestra en la *figura 12*.

Por otra parte, para la amplificación del promotor CaMv y el terminador T-nos, se calculó su T_m como se muestra a continuación ya que no se reportaba en el artículo:

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

- **CAMV 35S**

Primer CaMV F

$$T_m = (2 + 7) * 4 + (6 + 4) * 2 = \mathbf{56^\circ C}$$

Primer CaMV R

$$T_m = (9 + 2) * 4 + (3 + 6) * 2 = \mathbf{62^\circ C}$$

- **tNOS**

Primer tNOS F

$$T_m = (6 + 5) * 4 + (2 + 7) * 2 = \mathbf{62^\circ C}$$

Primer tNOS R

$$T_m = (4 + 5) * 4 + (3 + 8) * 2 = \mathbf{58^\circ C}$$

La T_m elegida para el programa de amplificación tanto para el promotor CaMV como para el terminador tNOS fue de $60^\circ C$. El programa de amplificación usado se muestra en la *figura 13*.

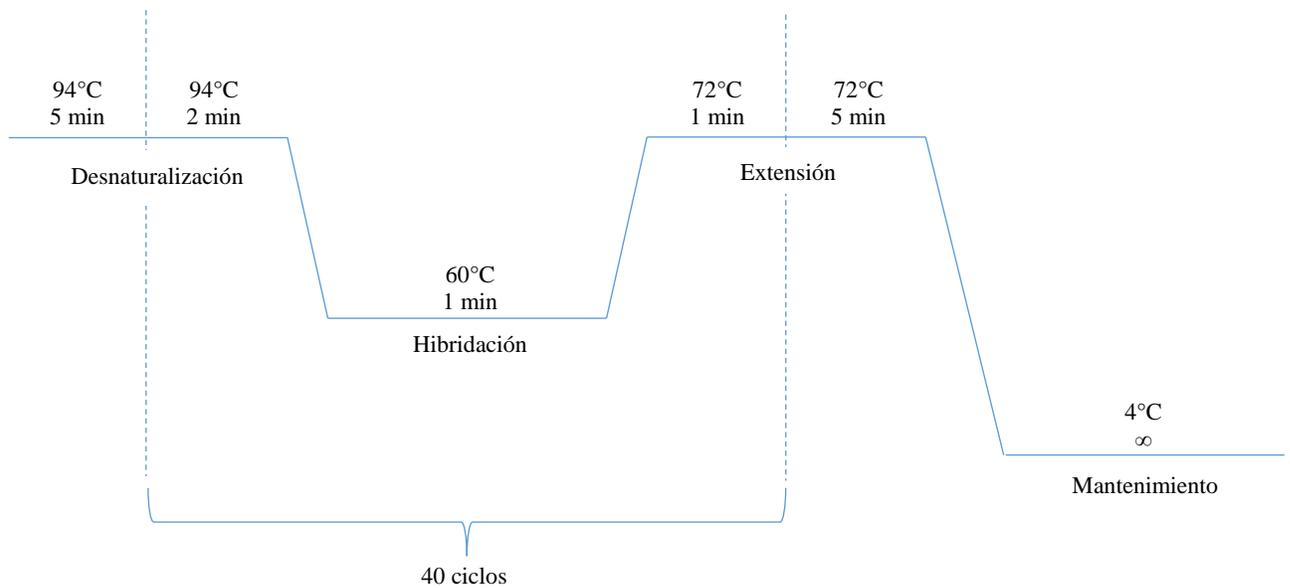


Figura 13. Programa diseñado para la amplificación del promotor CaMV con los primers CaMV F/CaMV R y el terminador tNOS con los primers tNOS F/ tNOS R.

2.4.3 Extracción de ADN

Para la realización de la extracción de ADN de cebada maltera y de cervezas, se utilizó el protocolo de Sambrook, 2001. En el caso de la extracción de cerveza, primero se le quitó el gas y posteriormente se centrifugo, esto para arrastrar mayor cantidad de sólidos presentes en la cerveza, y por lo tanto mayor cantidad de ADN.

El protocolo se describe a continuación:

Metodología

I. Disgregación del tejido de cebada

- Se tomaron 125 µL de cada muestra de cerveza y 125µg en el caso de la cebada maltera y el trigo, en un tubo Eppendorff.
- Se adicionaron 1250 µL de solución lisis.
- Posteriormente se agito el tubo con el vortex hasta que la muestra se observó homogénea.
- Se adicionaron 7µL de la enzima Proteinasa k, con una concentración de 20 mg/ml.
- Se incubaron los tubos a 50°C en el Thermomixer durante 2 horas.

- Una vez transcurrido estas horas, se desactivó la enzima aumentando la temperatura del Thermomixer hasta 60°C por una hora.

II. Extracción de proteínas y polisacáridos

- Se adicionó al tubo con la muestra 0.25 ml de la mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.
- Se mezcló el tubo varias veces suavemente.
- Y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.
- Posteriormente se separaron las fases, recuperando la fase acuosa superior, la cual contenía el ADN.
- A continuación se trasladó la fase recuperada a otro tubo eppendorff nuevo.

III. Precipitación de ADN

- A cada uno de los tubos que contenían la fase recuperada se adicionaron 1500 µL de etanol frío.
- Se mezcló suavemente.
- Se centrifugó a 10,000 rpm, durante 10 min.
- Por último se decantó el etanol y se dejó secar en la incubadora a 37°C.
- Una vez que el etanol fue eliminado, se adicionaron 50µL de agua libre de nucleasas a cada tubo para resuspender el ADN agitando suavemente el tubo hasta su completa disolución.

2.4.4 Cuantificación de ADN por absorbancia a 260 nm

Las extracciones de ADN son un componente vital de la biología molecular moderna. La capacidad para extraer y purificar ADN es a menudo el punto de partida clave para una variedad de procedimientos experimentales, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La calidad y la integridad del ADN obtenido afecta directamente a la fiabilidad de todos los experimentos posteriores.

La evaluación de la calidad y la concentración de ADN se determinaron espectrofotométricamente en un *NanoDrop ND-1000* midiendo la absorbancia de luz UV a longitudes de onda de 260 y 280 nm. La relación de estas absorbancias (A_{260} / A_{280}) proporciona un indicador de la contaminación de proteínas en una muestra de ADN, porque

las proteínas tienen una fuerte absorbancia a 280 nm (A280). Los ácidos nucleicos, incluyendo ADN, ARN y los nucleótidos libres, tienen una fuerte absorbancia a 260 nm (A260), por lo que un valor de 1.8 indicara ADN puro, un valor menor significa ADN contaminado por proteínas y un valor mayor significa que el ADN está contaminado por ARN. La absorbancia a 230 nm (A230) también es útil ya que da una indicación de la posible presencia de polisacáridos u otros contaminantes (Cseke, 2012).

Metodología:

- Se inició el software operativo NanoDrop y se eligió la opción: "*ácido nucleico*", para la cuantificación de ADN.
- Se calibró el Nanodrop con 2 µL de agua libre de nucleasas.
- Una vez calibrado se toman 2 µL de muestra de ADN y se coloca en el Nanodrop y se realiza la lectura dando click en *Measure*.
- Posteriormente se leen los resultados en la pantalla de la computadora de las muestras analizadas (Cseke, 2012).

2.4.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para realizar la PCR se utilizó el kit Promega con las siguientes cantidades:

Tabla 9. Componentes y cantidades para realizar la PCR.

Componente	Cantidad (Multiplicar por número de muestras)
PCR Master mix, 2X	12.5 µL
<i>Primer F</i>	0.5 µL
<i>Primer R</i>	0.5 µL
H ₂ O libre de nucleasas	10.5 µL
ADN de la muestra	1 µL
Total	25 µL

El total se dividió entre el número de muestras y se coloca cada volumen en un tubo diferente, a cada uno se le agrega 1 µL del ADN correspondiente, éste a una concentración de 60ng/µL, para completar un volumen total de 25 µL de reacción.

Se colocan en el termociclador con el programa diseñado previamente.

2.4.6 Electroforesis

Se requiere la separación de los ácidos nucleicos en base a su tamaño para muchas prácticas comunes de laboratorio (por ejemplo, la subclonación, el diagnóstico de genotipo, RT-PCR). La separación de ácidos nucleicos por electroforesis en gel de agarosa funciona mediante el aprovechamiento de la carga negativa de la cadena principal de fosfato de los ácidos nucleicos. Las moléculas de ADN y ARN tienen una carga neta negativa distribuida uniformemente en toda su longitud, por lo que se moverán a través de una matriz de agarosa en un campo eléctrico hacia el polo positivo. Ácidos nucleicos más pequeños serán capaces de migrar a través de la matriz más rápido que los más grandes durante un período determinado de tiempo. Dependiendo del porcentaje de agarosa usado para hacer el gel, el rango de separación lineal puede variar (Koontz, 2013).

Metodología

Preparación del gel de agarosa

- Se realizó un gel de agarosa con TAE 1X, a una concentración de 2.5% para trigo y cebada.
- Se hizo un gel de agarosa con TAE 1X, a una concentración de 3% para transgénicos.
- Se calentó la solución para que se disolviera evitando que se evaporara la solución.
- Una vez disuelta, se dejó enfriar sin gelificar y se añadió 1 gota de Bromuro de Etidio (BrEt), homogenizando la mezcla y posteriormente se vertió en el soporte.
- A continuación se colocaron los peines y se dejó enfriar hasta que se solidificó el gel y una vez que esto paso se retiraron los peines.
- Se colocó el soporte en la cámara de electroforesis y se adicionó el TAE 1X cubriendo el gel.

Electroforesis (carga y corrida del gel)

Para llevar a cabo la electroforesis se utilizaron los siguientes componentes (*Tabla 10*):

Tabla 10. Componentes y cantidades necesarias para cargar y correr el gel de electroforesis.

Componente	Volumen (µL)
Bromuro de Etidio (BrEt) 0.01/ml	3

Buffer de carga blue/orange 6X	3
Blanco o muestra	5
Marcador de peso molecular	1.5

Metodología

- En un trozo de parafilm se colocó el buffer de carga blue/orange 6X, 3 μ L.
- Se utilizaron 3 μ L de BrET por cada muestra.
- Se adicionaron 5 μ L de cada muestra, del blanco y del marcador de peso molecular. Esta vez se mezcló y se colocó en el depósito correspondiente.
- Una vez cargado el gel, se cerró la cámara y se conectó a una fuente de poder a 60V.
- Se detuvo hasta que el colorante se visualizó cerca del extremo contrario.

Ya que terminó la corrida en el gel, se procedió a la visualización de los resultados en un transiluminador de luz ultravioleta.

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

○ OBJETIVO PARTICULAR 1

Diseñar los primers para la amplificación de secuencias específicas de cebada maltera y de organismos genéticamente modificados por medio de programas bioinformáticos y definir el programa de PCR para su amplificación.

3.1 Diseño de primers

Los *primers* para la identificación de cebada maltera y para trigo fueron diseñados por medio de un programa bioinformático en NCBI (National Center for Biotechnology Information) a partir de la región ITS1 (Internal Transcribed Spacer-espaciadores internos transcritos) de la cebada y del trigo. Estos *primers* amplificaron bien las secuencias de interés para estas especies y fue posible su utilización para la realización de este proyecto.

Por otra parte, los *primers* utilizados para la identificación de organismos genéticamente modificados mediante el promotor CaMV y el terminador tNOS que se obtuvieron del artículo de Karamollaoglu *et al.*, 2009, también sirvieron de manera correcta para la detección de organismos transgénicos.

3.2 Programas de amplificación

Los programas de amplificación fueron diseñados a partir de la T_m correspondiente a cada *primer* y basadas en las temperaturas de desnaturalización y extensión reportadas por Villegas *et al.*, 2009 y por Sambrook, 2001 respectivamente. Después de realizar algunas pruebas se obtuvo el programa que amplificaba mejor las secuencias de interés. El programa utilizado para cebada maltera y trigo fue el mismo (*Figura 12*). Y el programa para la detección de OGM fue igual para CaMV y tNOS (*Figura 13*).

○ **OBJETIVO PARTICULAR 2**

Extraer y purificar el ADN del grano de cebada maltera como control positivo y de diversas cervezas comerciales, por medio del protocolo de Sambrook, para su posterior análisis.

3.3 Concentración de ADN de las muestras de grano de cebada maltera y de las muestras de granos de trigo.

Se realizó la extracción y purificación del ADN de diez muestras de grano de cebada maltera y de siete muestras de grano de trigo. Posteriormente se leyó su pureza y concentración espectrofotométricamente en un NanoDrop *ND-1000* y finalmente se llevó a una concentración aproximada de 60 $\mu\text{L}/\text{mg}$ y de nuevo se leyó su pureza y concentración en el espectrofotómetro. En la *tabla 11* se muestran las concentraciones de ADN obtenidas de las muestras de cebada maltera por el método de Sambrook (2001).

Tabla 11. Concentración de ADN de muestras de cebada maltera de distinta procedencia.

# de muestra	Cebada	Nomenclatura	Inicial		Final	
			260/280	ng/ μL	260/280	ng/ μL
1	Cebada de michoacan 1	C1	1.67	762.8	1.61	38.8
2	Cebada de michoacan 2	C2	1.72	1684.6	1.58	79.6
3	Cebada Azcapotzalco	C3	1.72	751.5	1.67	73.3
4	Compañía Extractos y Maltas	C4	1.68	1140.5	1.62	81.0
6	Cebada Izcalli	C6	1.87	426.3	1.65	89.3
7	Cebada Tlalnepantla	C7	1.90	263.7	1.89	57.6
8	Cebada Hidalgo	C8	1.91	219.6	1.87	79.3

9	Cebada Cuautilán	C9	1.97	479.6	1.93	85.7
10	Central iztapalapa	C10	1.61	393.3	1.40	49.6

En la *tabla 12* se muestran las concentraciones obtenidas de la extracción de ADN de las muestras de trigo.

Tabla 12. Concentración de ADN de muestras de grano de trigo de distinta procedencia.

# de muestra	Trigo	Nomenclatura	Inicial		Final	
			260/280	ng/ μ L	260/280	ng/ μ L
1	Mercado "Guerrero"	T1	1.87	276.0	1.82	56.1
2	Puebla	T2	1.92	486.3	1.88	54.6
3	Tienda Angel C.A.	T3	1.83	227.6	1.76	46.8
4	Tianguis edo. Hidalgo	T4	1.88	369.1	1.84	60.7
5	Mercado San Antonio.	T5	1.70	596.5	1.62	87.8
6	Mercado del Carmen	T6	1.98	295.6	2.02	60.3
7	Trigo orgánico "GREEN CORNER"	T7	1.81	234.7	1.76	46.1

Como se puede observar, en la *tabla 11* y *tabla 12*, en cuanto a la pureza (relación 260/280) se obtuvieron valores inferiores y en algunos casos superiores a 1.8, lo cual significa

que el ADN extraído estaba contaminado por proteínas o por ARN respectivamente, sin embargo fue posible utilizarlos.

En cuanto a las concentraciones finales, al realizar las diluciones a partir de las concentraciones iniciales, se obtuvieron algunos valores mayores a 60 ng/ μ L y otros menores, sin embargo aunque lo ideal es que se encuentren los más cercanos posible a 60 ng/ μ L, fue posible utilizarlos y no afecto a su amplificación como se muestra más adelante.

3.4 Concentración de ADN de las muestras de Cerveza

Se realizó la extracción y purificación de dieciséis muestras de cerveza comerciales de origen nacional e internacional, las cuales son líderes en el mercado. De igual manera el ADN se llevó a una concentración de 60 μ L/mg aproximadamente y se leyó su pureza y concentración espectrofotométricamente en un NanoDrop ND-1000. La extracción de cervezas por medio del protocolo de Sambrook fue eficiente, mediante una centrifugación previa a su extracción, sin embargo tal como reportan Hotzel *et al.*, 1999, quienes también realizaron una centrifugación a la cerveza y posteriormente llevaron a cabo la extracción de ADN con un protocolo similar, basado en fenol/cloroformo y etanol, no obtuvieron buenos resultados en la visualización del gel de agarosa, lo cual atribuyeron a que había muy poco ADN en la muestras, no obstante estos investigadores creen que con unos *primers* específicos debería ser posible amplificar las secuencias de interés. Lo cual se confirmó en este estudio ya que aunque no fue posible observar la integridad del ADN en el gel de agarosa de la extracción de cerveza, si se pudo leer mediante el nanoespectrofotómetro y como se muestra más adelante fue posible su amplificación con los *primers* utilizados.

Los resultados de dicha extracción se muestran en la *tabla 13* y como se observa, la pureza de ADN es inferior a 1.8, lo cual indica que los ADN estaban contaminados por proteínas, sin embargo no hubo problema al utilizarlos, a excepción de la cerveza Bohemia y Dos equis, como se verá más adelante. En cuanto a las concentraciones finales todas estaban cerca de 60 ng/ μ L, lo cual es ideal para su correcta amplificación.

Tabla 13. Concentración de ADN de distintas cervezas comerciales de origen nacional e internacional, líderes en el mercado.

# De muestra	Cerveza	Nomenclatura	Inicial		Final	
			260/280	ng/ μ L	260/280	ng/ μ L
1	Bohemia	Bo	1.71	221.4	1.40	59.7
2	Dos equis	Dx	1.75	224.5	1.44	68.0
3	Heineken	He	1.66	115.7.3	1.43	67.6
4	Modelo negra	Mn	1.54	62.1	1.54	62.1
5	León	Ln	1.56	60.6	1.56	60.6
6	Corona light	Cl	1.62	120.0	1.69	62.0
7	Tempus	Te	1.59	84.4	1.59	84.4
8	Hofbräu Maibock	Hm	1.60	258.6	1.60	52.2
9	Barrilito	Bt	1.72	185.9	1.63	59.4
10	Harvest Ale	Ha	1.66	130.0	1.62	64.4
11	London Porter	Lp	1.63	844.1	1.57	67.3
12	Indio	Id	1.75	226.6	1.59	70.4
13	Sol cero	So	1.94	343.6	1.65	51.2
14	Tecate	Tc	1.75	232.4	1.59	61.8
15	Victoria	Vt	1.97	445.3	1.63	64.0
16	O'Douls	Ds	2.17	537.5	1.60	69.0

3.5 Concentración del ADN de Maíz transgénico y de *Saccharomyces cerevisiae*.

También se realizó la extracción de maíz, del cual se tenía la seguridad de que se trataba de un maíz transgénico, esto para utilizarlo como control positivo. De igual manera se hizo extracción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para utilizarla posteriormente en la prueba de especificidad y asegurarnos que los *primers* para cebada y maíz no amplificaban con esta levadura. En la *tabla 14* se observa su extracción por medio del protocolo de

Sambrook. Como se muestras, la pureza final indica que el ADN está contaminado por ARN, ya que el valor es superior a 1.8 y la concentración final aunque fue superior a 60 ng/μL, al no estar tan alejado de este valor es posible utilizarlos.

Tabla 14. Concentración de ADN de maíz transgénico y de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Muestra	Nomenclatura	Inicial		Final	
		260/280	ng/μL	260/280	ng/μL
Maíz transgénico	Mt	2.02	2815.4	2.04	87.2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sc	1.16	5279.3	2.14	74.1

3.6 Calidad e integridad del ADN

Aunque el espectrofotómetro nos proporciona información sobre la cantidad y calidad del ADN extraído, no proporciona información sobre el tamaño del ADN, lo cual se requiere para concluir que las extracciones fueron exitosas. Con la electroforesis es posible visualizar y verificar el tamaño de las moléculas de ADN dentro de cada extracción de ADN (Cseke, 2012), por lo que la concentración e integridad del ADN extraído, se verifico mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 60 V.

En la *figura 14*, se muestra la electroforesis en gel para el ADN de granos de cebada a) y el ADN de *Saccharomyces cerevisiae* y maíz transgénico b). Como se puede observar las franjas que se encuentran en la parte superior representan el ADN; las manchas a lo largo del gel es el ADN degradado y al final se muestra contaminación por ARN, lo cual puede indicar que tenemos un ADN con calidad regular como en el caso del ADN de la cebada C6, C7 y del ADN de maíz transgénico (Mt), esto no es posible verlo, por medio de un espectrofotómetro. Por otra parte en las muestras C1, C5 y C9 no se observa que tengamos ADN.

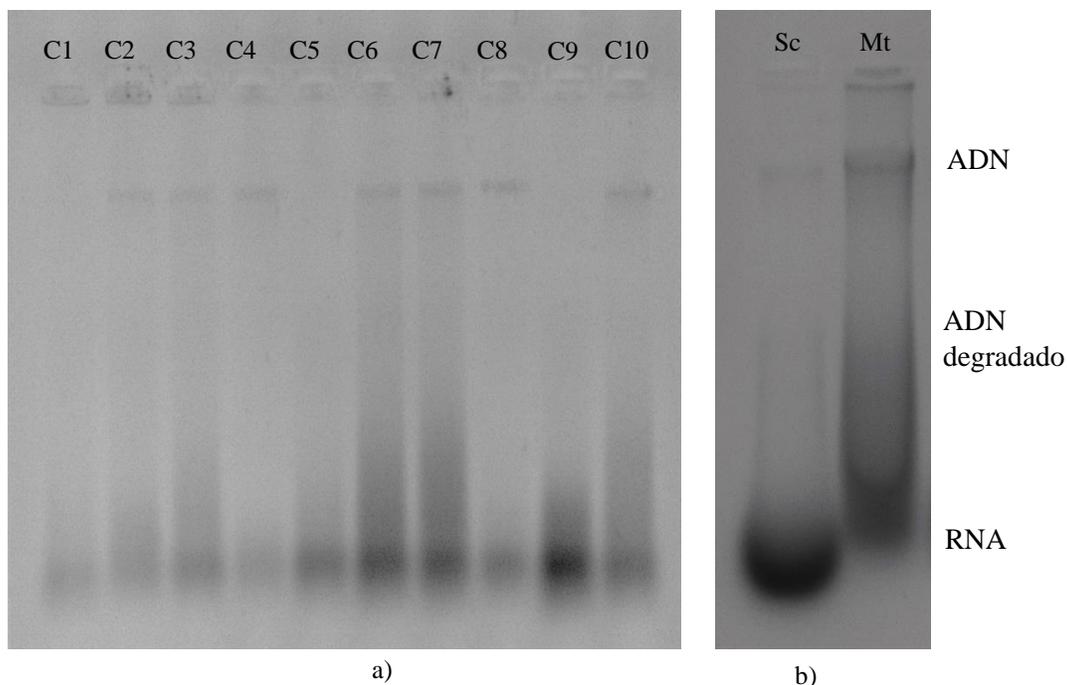


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% a 60 V, para verificar la concentración e integridad del ADN a) ADN de granos de cebada maltera: C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 y C10; b) ADN de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) y maíz transgénico (Mt).

Para el ADN de las muestras de cerveza se hizo lo mismo solo que no se observó nada mediante el gel de electroforesis como se mencionó anteriormente. Sin embargo, por medio de la cuantificación con el espectrofotómetro sí fue posible leer la cantidad de ADN obtenida mediante la extracción, y aunque se obtuvo una concentración baja de ADN, ésta fue suficiente para poder trabajar (tabla 13).

3.7 Controles positivos de cebada maltera

Se eligieron tres muestras de ADN extraído de los granos de cebada para verificar su amplificación con el programa diseñado y así poder obtener un control positivo, esto fue en base a su pureza, es decir las muestras en las que la relación 260/280 fuera lo más cercano a 1.8 y también de acuerdo a la calidad e integridad de ADN que pudimos observar en la electroforesis en gel de agarosa de la figura 14. Aunque fueron varias las muestras que presentaban éstas características, las que se eligieron fueron las muestras de cebada maltera C2, C3 y C10.

En la *figura 15* se muestra la electroforesis en gel de agarosa de las muestras de cebada maltera antes mencionadas, como se observa las tres muestras elegidas amplificaron correctamente obteniendo amplificados de 242 pb y en este caso la muestra C2, fue la que se utilizó como control positivo para cebada maltera durante la experimentación.

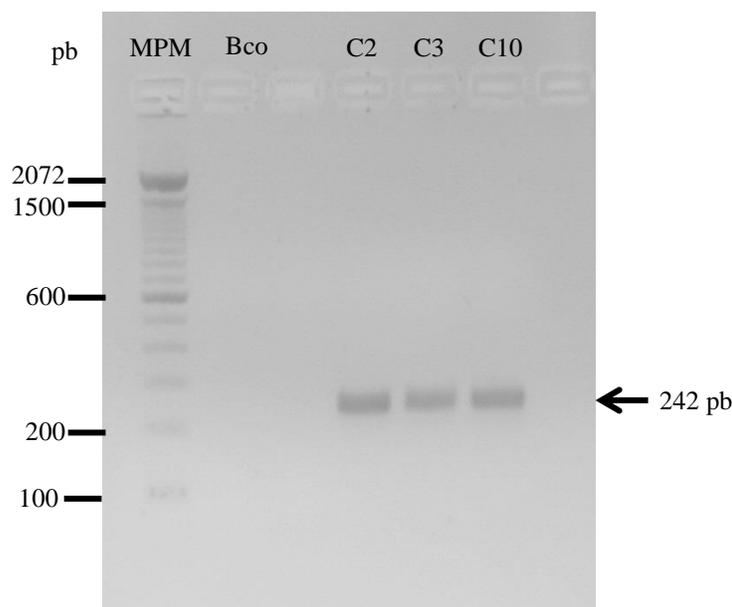


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60V de los fragmentos amplificados de ADN de cebada maltera de 242 pb, con los primers Cebada F/Cebada R para comprobar su amplificación con el programa diseñado y para la obtención de un control positivo. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C2, C3 y C10: controles positivos de cebada.

3.8 Controles positivos de trigo

Lo mismo se realizó para trigo, en *figura 16*, se puede observar el gel de agarosa de las muestras de trigo, solo que en éste caso las muestras que se eligieron fueron las T1, T4 y T7. Las tres muestras amplificaron muy bien obteniendo amplificados de 234 pb y la que se eligió como control positivo para la detección de trigo en la experimentación fue la muestra T1.

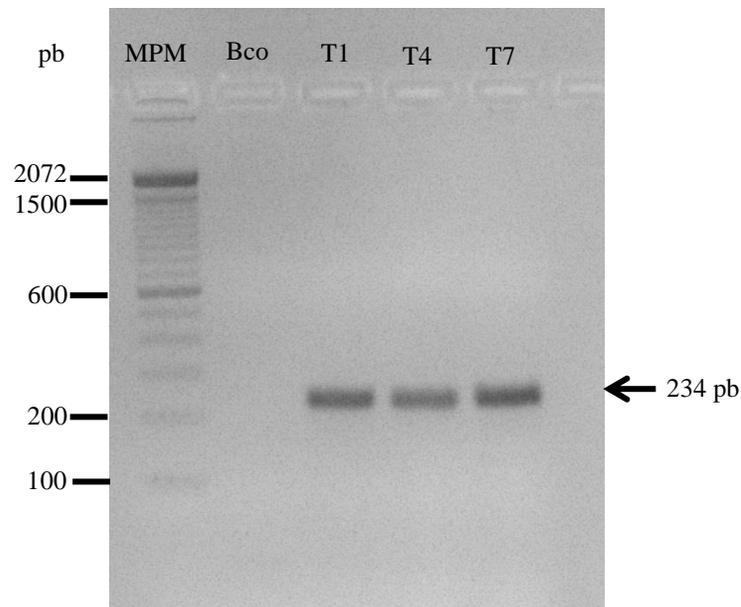


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60V de los fragmentos amplificados de ADN de trigo de 234 pb, con los primers Trigo F/Trigo R para comprobar su amplificación con el programa diseñado y para la obtención de un control positivo. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, T1, T4 y T7 controles positivos.

3.9 Especificidad de los primers para cebada y trigo

Para comprobar la especificidad de los primers diseñados para cebada maltera y trigo, se realizó una PCR, utilizando diferentes ADN de diversas especies (tabla 15), ya que es muy importante que los primers sean específicos para la especie que se quiere evaluar.

También se decidió comprobar la especificidad de los primers con la especie *Saccharomyces cerevisiae*, como se mencionó anteriormente porque es la levadura utilizada para la elaboración de cerveza, y esto sirvió para verificar si los primers estaban amplificando con las especie deseada (cebada y trigo) y no con la levadura.

Tabla 15. Concentración del ADN extraído de diferentes especies para la prueba de especificidad para los primers de cebada maltera y trigo.

Muestras	Nomenclatura	260/280	ng/ μ L
Leche	Le	1.59	67.4
Cerdo	Cd	1.57	60.1
Jitomate	Ji	1.62	70.4
Papa	Pa	1.59	72.2

Zanahoria	Za	1.59	83.3
Res	Rs	1.56	62.8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sc	2.14	74.1

En la *figura 17*, se puede observar la electroforesis en gel de agarosa a 2.5% a 60V realizada para comprobar la especificidad de los *primers* de cebada maltera. Los *primers* diseñados resultaron ser específicos, observándose solo un amplificado de 242 pb en cebada maltera y ninguna amplificación para las otras especies evaluadas y tampoco para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Por lo cual fueron utilizados para la experimentación.

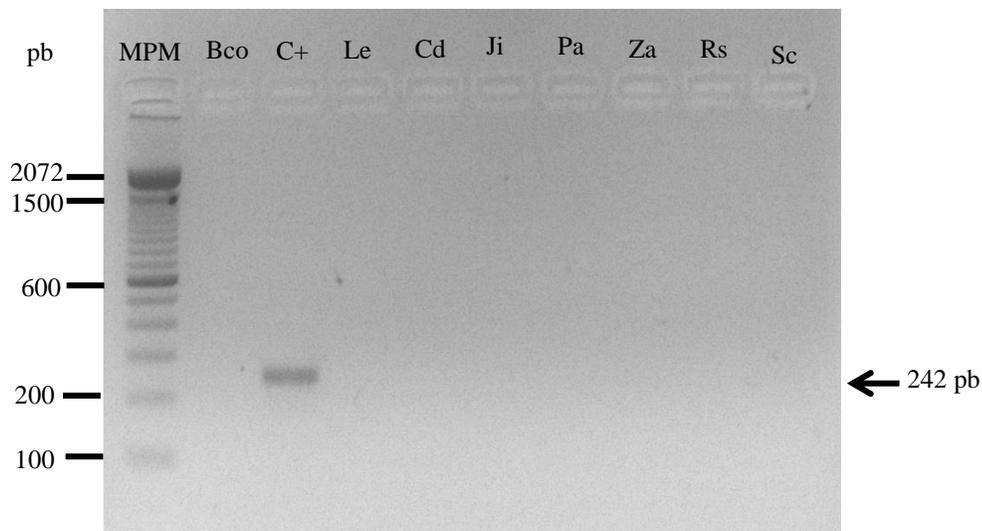


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60V de un fragmento amplificado de ADN de cebada maltera de 242 pb, con los primers Cebada F/Cebada R, para comprobar la especificidad de los primers. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo de cebada, Le: leche, Cd: cerdo, Ji: jitomate, Pa: papa, Za: zanahoria, Rs: res y Sc: Saccharomyces cerevisiae.

Por otra parte en la *figura 18*, se muestra el gel de electroforesis para la especificidad de trigo. Para esto se incluyó una muestra de cebada, ya que fue de suma importancia que los *primers* de trigo no amplificaran con otras especies y mucho menos con cebada maltera, ya que lo que se quería era detectar trigo en cerveza. Y como podemos observar los *primers* de trigo resultaron ser específicos para trigo, obteniéndose solo un amplificado de 234 pb para la muestra que solo tenía ADN de trigo, y ningún amplificaron para otra especie, por lo que también estos *primers* pudieron ser utilizados para la experimentación.

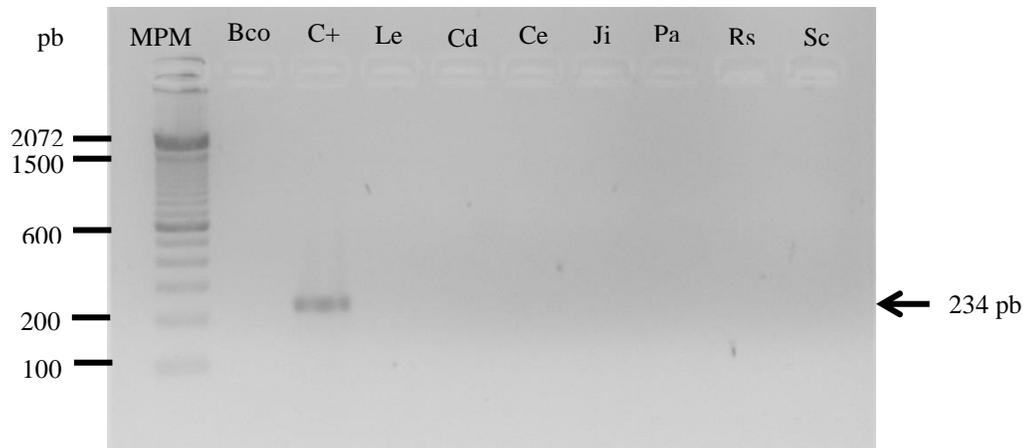


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60V de un fragmento amplificado de ADN de trigo de 234 pb, con los primers Trigo F/Trigo R para comprobar la especificidad de los primers de trigo. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo de trigo, Le: leche, Cd: cerdo, Ji: jitomate, Pa: papa, Za: zanahoria, Rs: res y Sc: *Saccharomyces cerevisiae*.

3.9.1 Amplificación de los primers Trigo F/Trigo R con granos de cebada

Se realizó otra prueba para corroborar que los primers de Trigo F/Trigo R no amplificaban con cebada, se llevó a cabo una PCR y se utilizaron cuatro muestras de cebada. Posteriormente se hizo una electroforesis en gel al 2.5% a 60V figura 19 donde se comprobó que los primers fueron específicos y no amplificaron con ninguna de las muestras de cebada utilizadas.

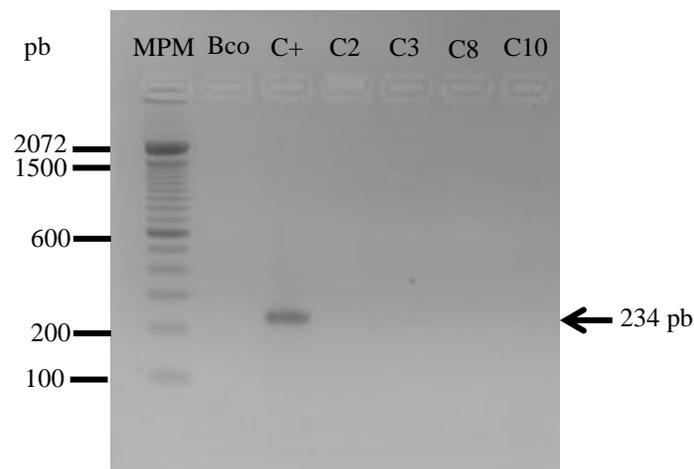


Figura 19. Electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% a 60V de un fragmento amplificado de ADN de trigo de 234 pb, con los primers Trigo F/Trigo R para comprobar la especificidad de los primers de trigo con muestras de cebada. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo de trigo, C2, C3, C8 y C10: muestras de cebada.

3.10 Amplificación de los *primers* Cebada F/Cebada R con granos de cebada.

Una vez que se comprobó que el programa de amplificación diseñado era el correcto para la amplificación de los *primers*, y que estos eran específicos para la detección de cebada maltera, se prosiguió a realizar la PCR con todas las muestras de los ADN de cebada que se habían extraído en la *tabla 11*. En la *figura 20* se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60 V, realizada para ver los amplificados de las muestras de cebada. En total se evaluaron nueve muestras (C1, C3, C4, C5, C6, C7, C8 Y C9) más el control positivo y como se puede observar todas las muestras de ADN de cebada maltera amplificaron correctamente, ya que se obtuvo un amplificado en todas las muestras de 242 pb).

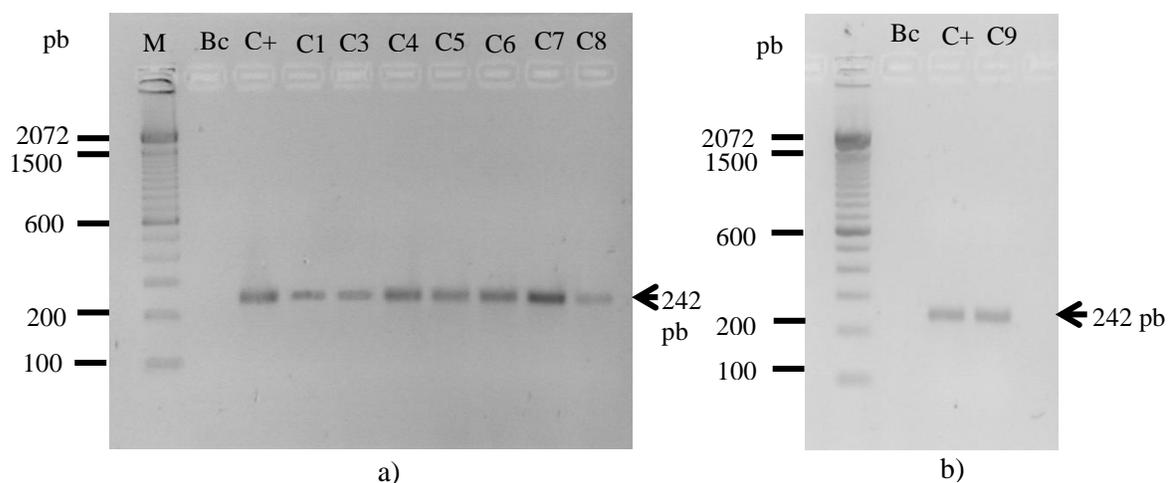


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60V de los fragmentos amplificados de ADN de cebada maltera de 242 pb, con los *primers* Cebada F/Cebada R, de diferentes muestras de ADN de grano de cebada maltera, a) muestras C1 y C3-C8; b) Continuación muestra de cebada C9. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo de cebada.

3.11 Amplificación con los *primers* Trigo F/Trigo R con granos de trigo

También se realizó la PCR con todas las muestras de ADN de trigo con los *primers* Trigo F/Trigo R, una vez que se comprobó que el programa y *primers* diseñados amplificaban al trigo. En la figura 21 se muestra la electroforesis llevada a cabo, todas las muestras amplificaron, obteniéndose amplificados de 234 pb, en total fueron 7 muestras más el control positivo.

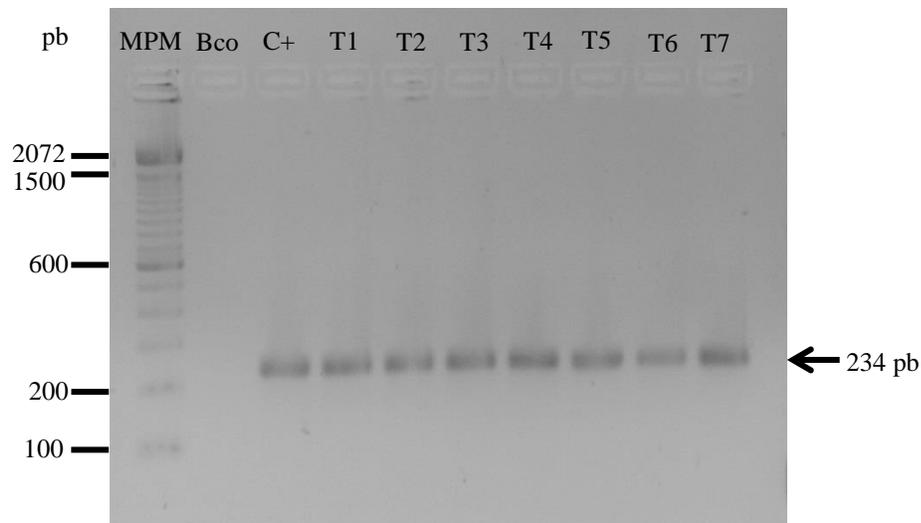


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60V de los fragmentos amplificados de ADN de trigo con los primers Trigo F/Trigo R de las muestras de ADN de grano de trigo. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo de trigo, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7: muestras de trigo.

○ OBJETIVO PARTICULAR 3

Evaluar diferentes tipos de cervezas comerciales, para determinar si existe la presencia de cebada y trigo en su composición por medio de la amplificación por PCR.

3.12 Identificación de cebada maltera en cervezas

Mientras bebidas fermentadas pueden ser producidas a partir de un sin número de granos, la cerveza tradicionalmente se elabora principalmente de cebada (*Hordeum vulgare L.*). Esto se debe a que de todos los granos comunes, la cebada es la que produce la mayor cantidad de enzimas diastasa en la germinación, aunque el trigo es el segundo cereal en producir esta enzima (aproximadamente 50% de la cebada). Como consecuencia, la cebada también produce más maltosa durante el malteado y proporciona un grano ideal para la producción de cerveza. Más malta significa más azúcar y por lo tanto más azúcar permite la producción de mayores cantidades de alcohol (Rasmussen, 2014). Como se mencionó antes, además de cebada, también se identificó trigo en las cervezas, ya que el trigo no es reportado en la etiqueta de la mayoría de las cervezas analizadas y la identificación de cervezas transgénicas puede deberse a la presencia de cebada o trigo genéticamente modificado o incluso a los dos.

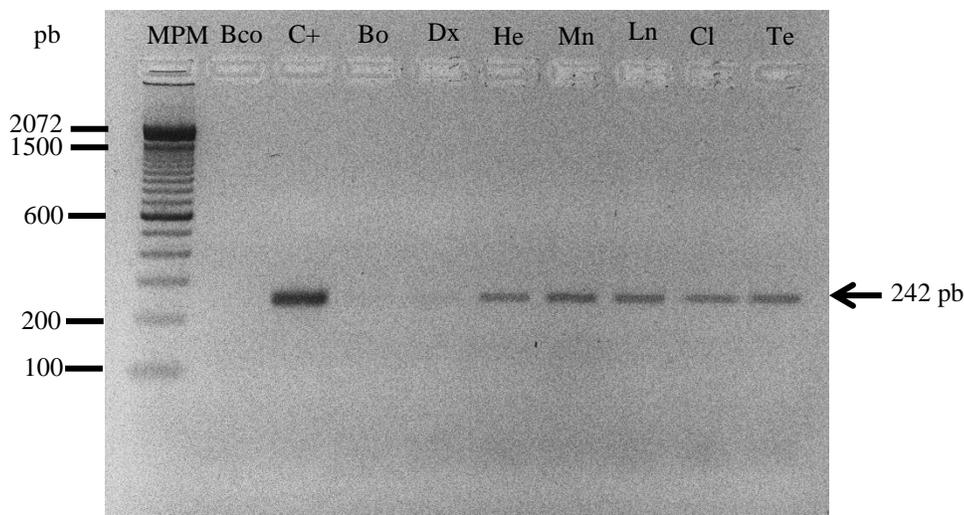


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60V de fragmentos amplificados de ADN de cebada maltera con los primers Cebada F/ Cebada R, para la detección de cebada maltera en cervezas. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo, Bo: Bohemia, Dx: Dos equis, He: Henineken, Mn: Modelo, Ln: Leon, Cl: Corona light y Te: Tempus.

En la figura 22, se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60V, con los primers Cebada F/ Cebada R, para la identificación de cebada maltera en las cervezas Bo: Bohemia, Dx: Dos equis, He: Henineken, Mn: Modelo, Ln: Leon, Cl: Corona light y Te: Tempus. Como se puede observar en el gel en la mayoría de las cervezas se encuentra la presencia de cebada maltera, observándose un amplificado de 242 pb, a excepción de la cerveza Bohemia y Dos equis, en estas dos cervezas no se obtuvo ningún amplificado de 242 pb, esto se puede atribuir a la pureza final del ADN extraído, ya que fueron de los valores más bajos que se obtuvieron (Tabla 13), lo cual pudo afectar a su amplificación. Por otra parte también se puede deber a que en la elaboración de estas dos cervezas, se llevó a cabo un proceso en el que su ADN quedó muy degradado y por lo tanto no fue posible su detección.

Por otra parte en las figuras 23 y 24 se observan la electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60V, con los primers Cebada F/ Cebada R, para la detección de cebada maltera en las cervezas Hm: Hofbräu Maibock, Bt: Barrilito, Ha: Harvest Ale, Lp: London Porter, Id: Indio, So: Sol, Tc: Tecate y Vt: Victoria y Ds: O'Douls. En todas estas cervezas se confirmó la presencia de cebada maltera observándose un amplificado de 242 pb.

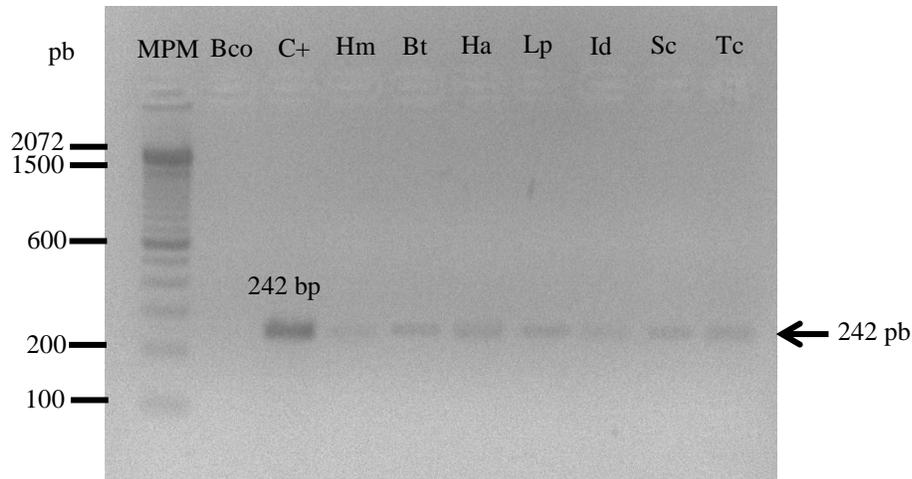


Figura 23. Electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% a 60V de fragmentos amplificados de ADN de cebada maltera con los primers Cebada F/ Cebada R, para la detección de cebada maltera en cervezas. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo de cebada, Hm: Hofbräu Maibock, Bt: Barrilito, Ha: Harvest Ale, Lp: London Porter, Id: Indio, So: Sol, Tc: Tecate.

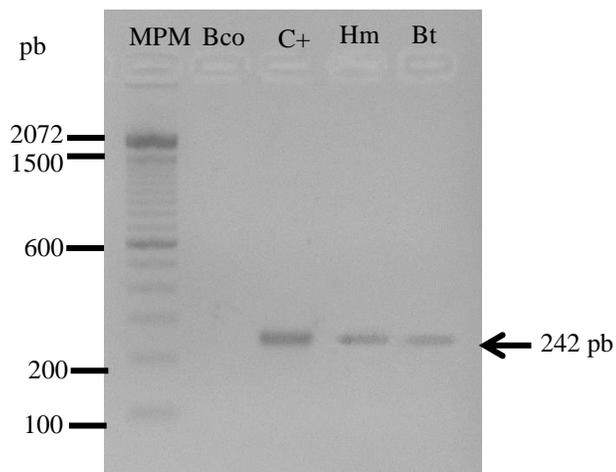


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60V de los fragmentos amplificados de ADN de cebada maltera con los primers Cebada F/ Cebada R, para la detección de cebada maltera en cervezas. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo, Vt: Victoria y Ds: O'Douls.

3.13 Identificación de trigo en cerveza

Como se mencionó anteriormente, se decidió detectar si en las cervezas existía la presencia de trigo, ya que es un ingrediente que se suele usar en la elaboración de cervezas y al menos en el caso de las cervezas analizadas, no se reporta en su etiqueta.

En la *figura 25* se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60V con los *primers* Trigo F/ Trigo R, para la detección de trigo en cervezas, para las cervezas Bohemia, Dos equis, Henineken, Modelo, Leon, Corona light y Tempus. Como se puede observar todas estas cervezas contenían trigo, excepto en las cervezas Bohemia y Dos equis en las cuales no se obtuvo ningún amplificado de 234 pb, en estas dos cervezas tampoco se obtuvo un amplificado para la detección de cebada (*figura 22*).

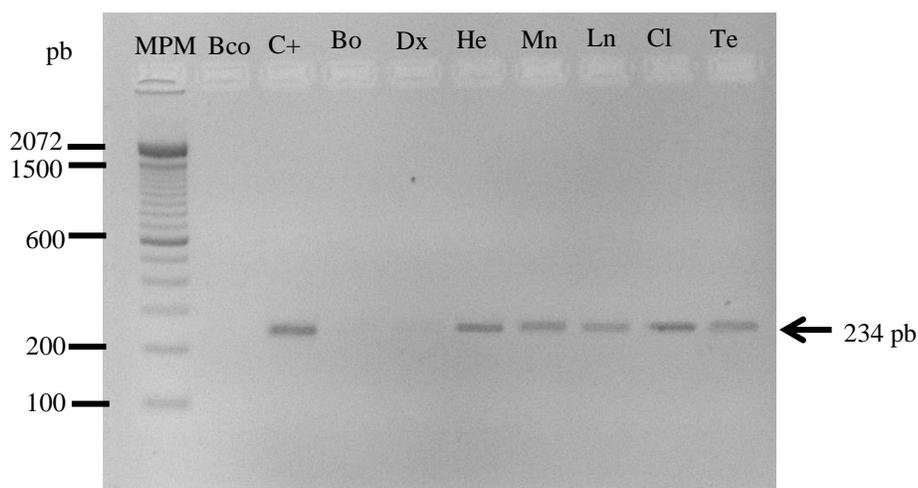


Figura 25. Electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% a 60V de los fragmentos amplificados de ADN de trigo con los primers Trigo F/ Trigo R, para la detección de trigo en cervezas. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo de trigo, Bo: Bohemia, Dx: Dos equis, He: Henineken, Mn: Modelo, Ln: Leon, Cl: Corona light y Te: Tempus.

En las *figuras 26 y 27* se muestra la electroforesis para la identificación de trigo en las cervezas Hofbräu Maibock, Barrilito, Harvest Ale, London Porter, Indio, Sol, Tecate y Victoria y O'Douls, las cuales también contenían trigo, ya que se obtuvo un amplificado de 234 pb.

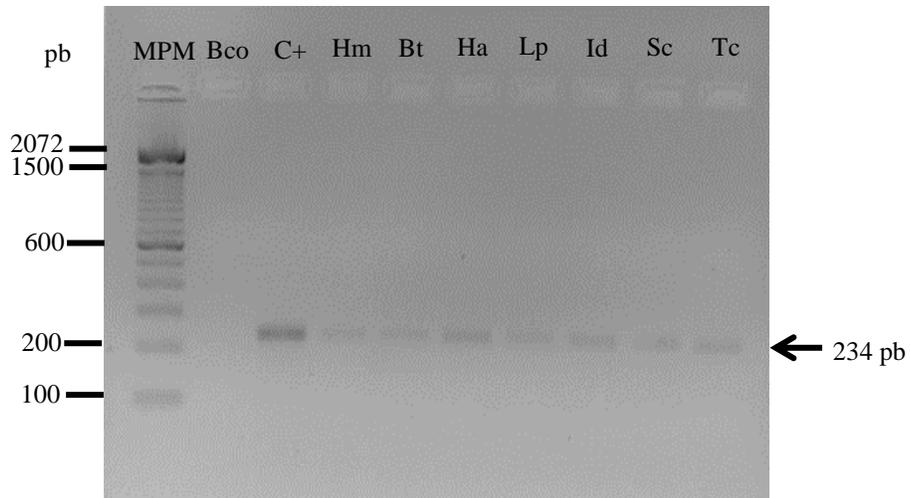


Figura 26. Electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% a 60V de los fragmentos amplificados de ADN de trigo con los primers Trigo F/ Trigo R, para la detección de trigo en cervezas. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo de trigo, Hm: Hofbräu Maibock, Bt: Barrilito, Ha: Harvest Ale, Lp: London Porter, Id: Indio, So: Sol, Tc: Tecate.

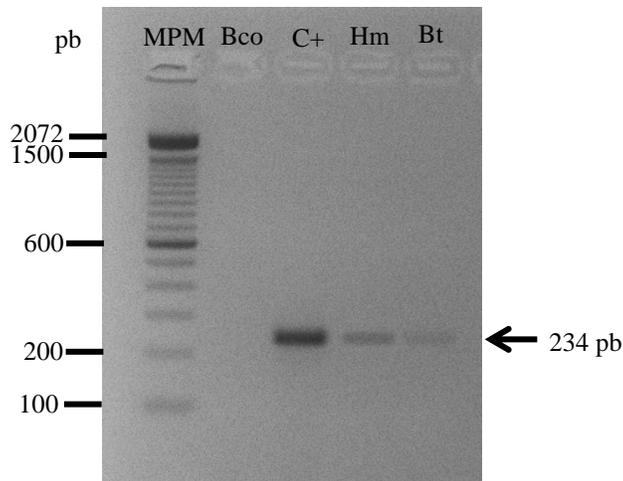


Figura 27. Electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% a 60V de los fragmentos amplificados de ADN de trigo con los primers Trigo F/ Trigo R, para la detección de trigo en cervezas. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo de trigo, Vt: Victoria y Ds: O'Douls.

○ **OBJETIVO PARTICULAR 4**

Evaluar diferentes muestras de grano de cebada maltera, para determinar si ha sido genéticamente modificada, por medio de la amplificación por PCR.

La detección de un organismo modificado genéticamente (OGM) o un producto derivado de un OGM puede ser realizada por la identificación de una nueva proteína expresada o un fragmento de la construcción genética integrado en el genoma de la planta. Las proteínas sujetas a la degradación durante un proceso de transformación de productos (por ejemplo, cocción) no son objetivos ideales; sin embargo, las técnicas basadas en el ADN son típicamente menos dependientes de las alteraciones o daños.

Hasta la fecha, la mayoría de las pruebas de detección se basan en la detección del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) promotor 35S (p35S) o del terminador *Agrobacterium tumefaciens* de la nopalina sintasa (tNOS). Estos objetivos han sido ampliamente aplicados para cubrir un gran número de eventos transgénicos (Debode *et al.*, 2013). Es por esto que la detección de OGM en cebada y en cerveza se hizo en base a la identificación de este promotor y a este terminador.

3.14 Identificación del promotor CaMv en grano de cebada

El genoma de la cebada es estructuralmente muy similar al de otros cereales, por lo que es considerablemente más susceptible a las investigaciones de la genética clásica y molecular. El establecimiento de potentes sistemas de transformación genética para la cebada es vital para la introducción de varias características útiles, tales como mejorar la alimentación y el valor de los alimentos, la mejora del malteado y cualidades cerveceras y una mayor resistencia a enfermedades (Goedeke *et. al*, 2007).

De acuerdo a Goedeke *et. al*, 2007, los promotores que se han utilizado hasta ahora en la cebada transgénica para la expresión de transgenes se muestran en la *tabla 16*:

Tabla 16. Promotores que se han utilizado en la cebada transgénica

Promotor	Especificidad
Maize ubiquitin 1	Ubicuo
CaMV 35S	Ubicuo

Rice Actin1	Ubicuo
Barley Hor B1	Endospermo
Barley Hor D	Endospermo
Oat Glo1	Endospermo
Rice GluB-1	Endospermo
Barley Jekyll	Proyección nucelar
Barley Asi	Embrión
Barley Em	Embrión
Barley Lem1	Lema / palea
Barley Lem2	Lema / palea

En este caso solo se utilizaron los *primers* CaMV F/ CaMV R, para la identificación del promotor CaMV en los granos de cebada maltera y se llevó a cabo la PCR utilizando el programa para su amplificación mostrado en la *figura 13*, tomando como control positivo ADN de maíz trasngénico con el promotor CaMV.

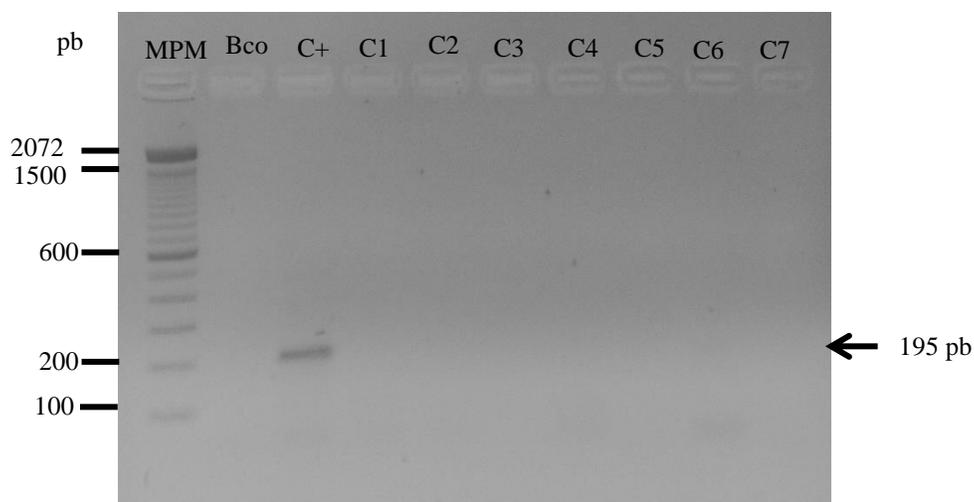


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60V de la amplificación del promotor CaMV con los primers CaMV F/ CaMV R, para la detección de cebada genéticamente modificada. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo de CaMV, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7: muestras de granos de cebada.

En la *figura 28* y *29* se muestra la electroforesis realizada para la detección de cebada genéticamente modificada en muestras de granos de cebada, en un gel de agarosa al 2.5% a

60V, y como se observa de las nueve muestras de cebada analizadas en ninguna se encontró la presencia de este promotor, ya que no se obtuvo un amplifica de 195 pb, lo cual no descarta que la cebada pueda ser un organismo genéticamente modificado, ya que pudieron haber utilizado otro promotor para la expresión de transgenes.

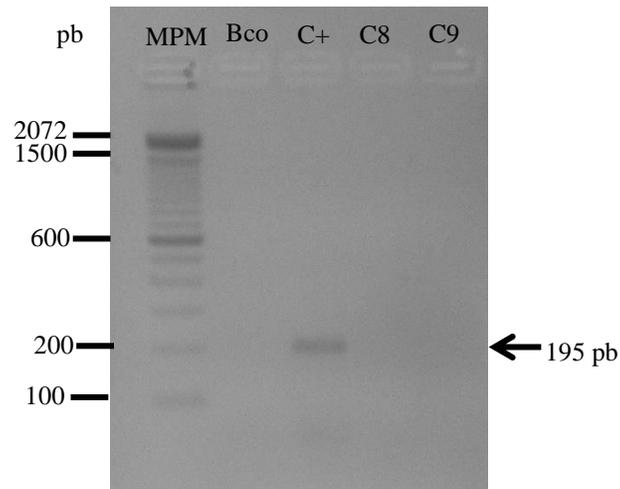


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60V de la amplificación del promotor CaMV con los primers CaMV F/ CaMV R, para la detección de cebada genéticamente modificada. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo de CaMV, C8 y C9: muestras de grano de cebada.

3.15 Identificación del terminador tNOS en grano de cebada

Los cultivos de cereales han sido los principales objetivos de mejora de la transformación genética. Siendo uno de los cultivos más importantes del mundo la cebada, la cual ha recibido considerable atención en todo el mundo respecto a la investigación para su transformación genética. Sistemas de suministro de genes de transferencia directa de genes a través de bombardeo de microproyectiles y por *Agrobacterium tumefaciens-mediated* han sido utilizados con éxito en la transformación genética de la cebada (Shrawat, *et al.*, 2007). Por este motivo se decidió identificar si había la presencia del terminador tNOS en el grano de cebada maltera.

En total se analizaron nueve muestras de cebada maltera. En la *figura 30* se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60V para la amplificación de un fragmento de ADN del terminador tNOS con los *primers* tNOS F/ tNOS R, para la detección de cebada

genéticamente modificada en las muestras de grano de cebada: C1, C2, C3, C4, C5 y C6 y como se observa ninguna de las muestras contiene este terminador, no se observó ningún amplificado de 180 pb.

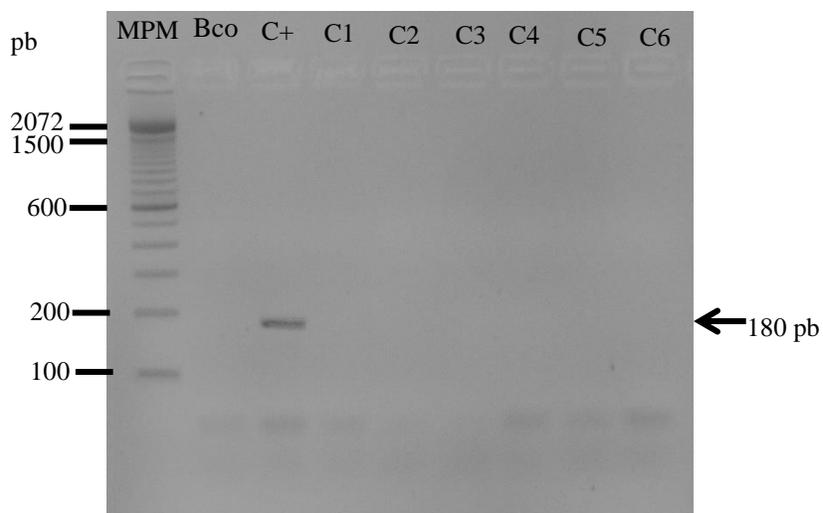


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60V de la amplificación del terminador tNOS con los primers tNOS F/ tNOS R, para la detección de cebada genéticamente modificada. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo de tNOS, C1, C2, C3, C4, C5 y C6: muestras de grano de cebada.

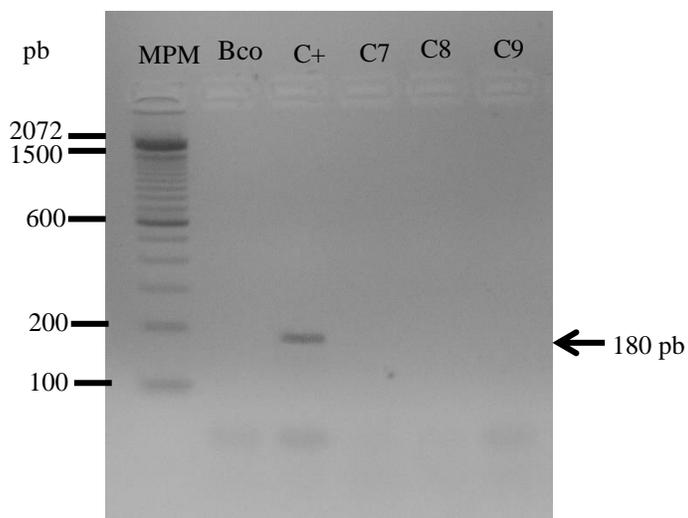


Figura 31. Electroforesis en un gel de agarosa al 3% a 60V de la amplificación del terminador tNOS con los primers tNOS F/ tNOS R, para la detección de cebada genéticamente modificada. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo de tNOS, C7, C8 y C9: muestras de grano de cebada.

En la *figura 31*, se muestra la misma electroforesis, pero para las muestras C7, C8 y C9, y tampoco presentaron el terminador tNOS. Lo cual puede significar que ninguna es cebada genéticamente modificada porque no se obtuvo un amplificado de 180 pb, o tal vez se utilizó otro terminador.

○ OBJETIVO PARTICULAR 5

Evaluar diferentes tipos de cervezas comerciales, para determinar la presencia de organismos genéticamente modificada por medio de la amplificación por PCR.

3.16 Identificación del promotor CaMV en cervezas.

Se llevó a cabo una PCR con el programa de amplificación mostrado en la *figura 13*, con los *primers* CaMV F/ CaMV R, para identificar la presencia de organismos genéticamente modificados en distintas cervezas comerciales, líderes en el mercado de origen nacional e internacional. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60V y se decidió no realizar la prueba a las cervezas Bohemia y Dos equis, ya que como se muestra en las *figuras 22 y 25*, no se obtuvo ningún amplificado para la presencia de cebada y trigo respectivamente, por lo cual no amplificaría con los *primers* CaMV F/ CaMV R en caso de tenerlos y no podríamos asegurar que no amplificaron porque estén libres de este promotor.

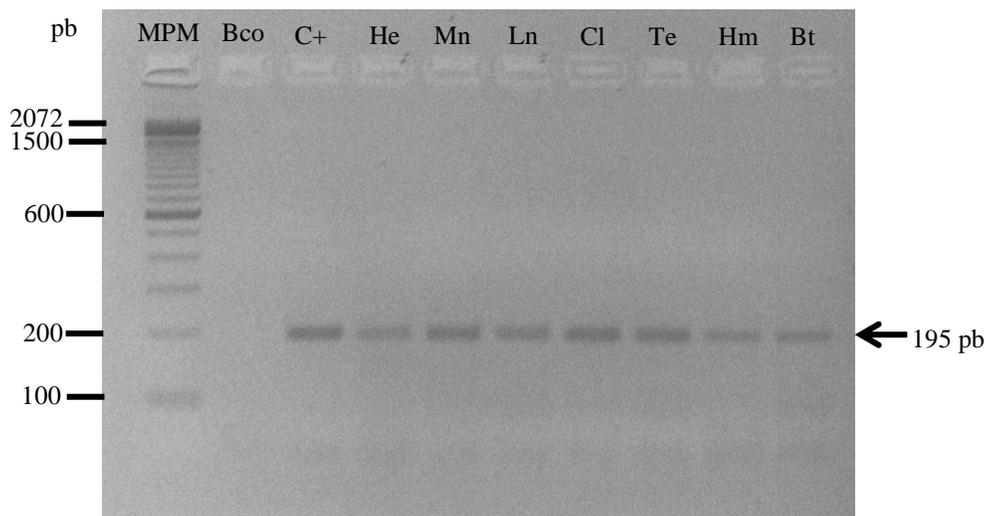


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60V de la amplificación del promotor CaMv con los primers CaMV F/ CaMV R, para la detección de organismos genéticamente modificados en cervezas. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo de CaMV, He: Henineken, Mn: Modelo, Ln: Leon, Cl: Corona light, Te: Tempus, Hm: Hofbräu Maibock y Bt: Barrilito.

En la *figura 32* se muestra la electroforesis realizada con los *primers* CaMV F/ CaMV R, para la detección de organismos genéticamente modificados para las cervezas Henineken, Modelo, Leon, Corona light, Tempus, Hofbräu Maibock y Barrilito, y como se puede ver en el gel de agarosa todas las cervezas tienen un amplificado de 195 pb que corresponde al promotor CaMV y por lo tanto esto nos indica que la cerveza fue elaborada con organismos genéticamente modificados.

Lo mismo ocurrió para las cervezas: Harvest Ale, London Porter, Indio, Sol, Tecate, Victoria y O'Douls (*figura 33*), en las cuales también se identificó la presencia del promotor CaMV, al observarse el amplificado de 195 pb.

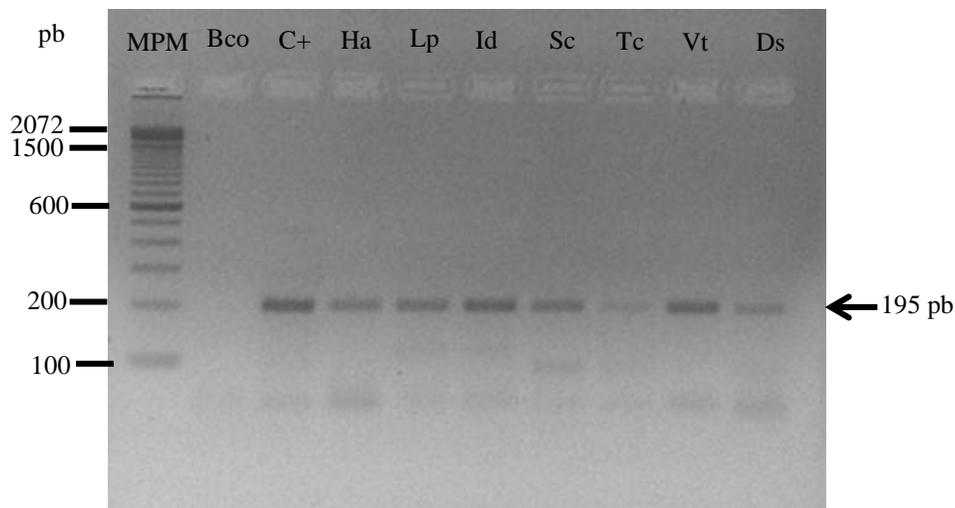


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60V de la amplificación del promotor CaMv con los primers CaMV F/ CaMV R, para la detección organismos genéticamente modificados en cervezas. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo de CaMV, Ha: Harvest Ale, Lp: London Porter, Id: Indio, So: Sol, Tc: Tecate, Vt: Victoria y Ds: O'Douls.

Aunque en las pruebas realizadas, no se identificó el promotor CaMV en grano de cebada maltera, eso no significa que nuestro país se encuentre libre de cebada transgénica, ya que fueron pocas muestras que no representan a todas las cebadas producidas en México. Por otra parte en el caso de las cervecerías mexicanas, éstas no siempre utilizan cebada de nuestro país para la elaboración de cerveza, por ejemplo de acuerdo a *Martínez (2008)* en la industria de la cerveza se usan dos tipos de cebada: la mexicana y la americana. El Grupo Modelo utiliza cebada mexicana que es de una calidad superior a la americana y se produce en el centro del país, y la Cervecería Cuauhtémoc, que es del norte, utiliza cebada americana.

Así mismo aunque no se especifican todos los ingredientes en la mayoría de las cervezas, como se mencionó anteriormente se suelen utilizar adjuntos para mejorar algunas propiedades, en este estudio se pudo ver que todas las cervezas analizadas contenían trigo y aunque no se realizó la detección de otros adjuntos como arroz, maíz, etc. Existe una probabilidad de que también los contengan, lo que significa que las cervezas no están elaboradas 100% de malta de cebada, por lo que la presencia de organismos genéticamente modificados en la cerveza no pueden solo deberse a la presencia de cebada transgénica, sino a que algunos de los adjuntos utilizados en su elaboración sean transgénicos.

3.17 Identificación del terminador tNOS en cervezas

También se realizó lo mismo para la detección del terminador tNOS en las diferentes muestras de cerveza.

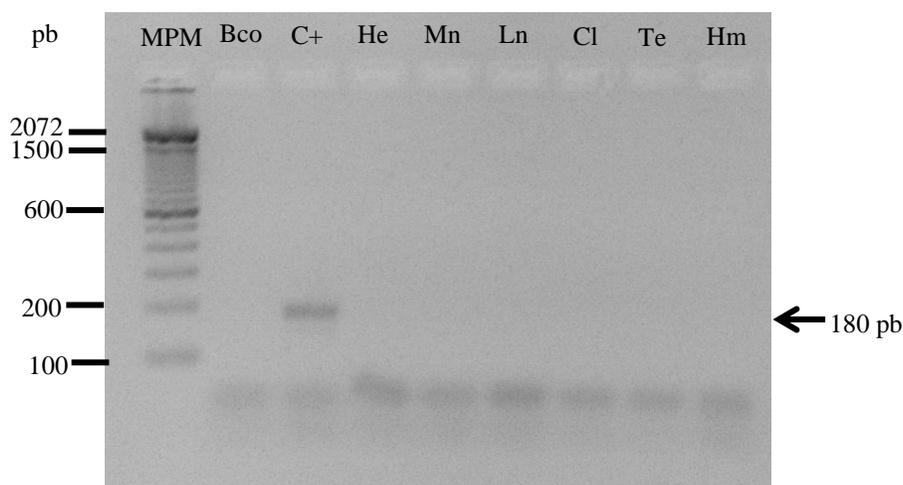


Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60V de la amplificación del terminador tNOS con los primers tNOS F/ tNOS R, para la detección de organismos genéticamente modificados en cervezas. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo de CaMV, He: Henineken, Mn: Modelo, Ln: Leon, Cl: Corona light, Te: Tempus, Hm: Hofbräu Maibock y Bt: Barrilito.

En la figura 34 se muestra la amplificación de un fragmento de ADN del terminador tNOS con los primers tNOS F/ tNOS R en un gel de agarosa al 3% a 60V, para la detección organismos genéticamente modificados en las cervezas Henineken, Modelo, Leon, Corona light, Tempus, Hofbräu Maibock y Barrilito y como se observa, en ninguna de las muestras existe la presencia del terminador tNOS, ya que no se obtuvo un amplificado de 180 pb en ninguna muestra de cerveza.

En la *figura 35* se muestra la electroforesis en un gel de agarosa al 3% a 60V, para las cervezas: Barrilito, Harvest Ale, London Porter e Indio, y en la *figura 36* para las cervezas Sol, Tecate, Victoria y O'Douls. No se observa ningún fragmento amplificado de 180 pb. Esto nos indica que no contenían el promotor tNOS estas muestras de cerveza.

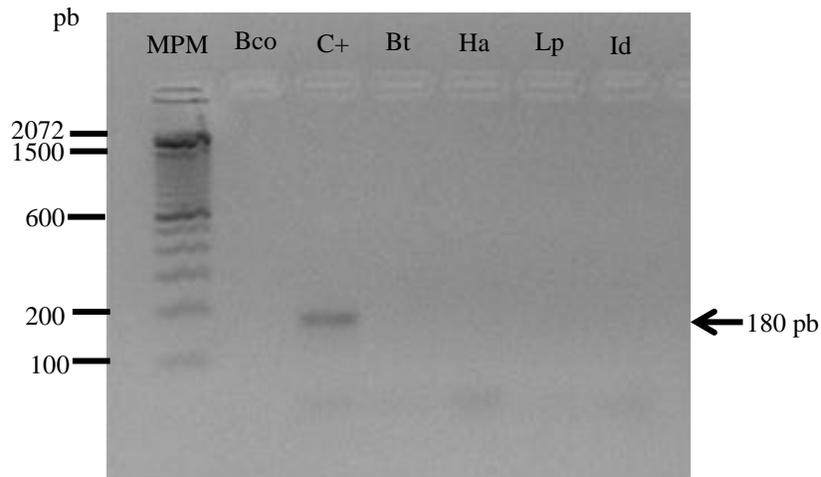


Figura 35. Electroforesis en un gel de agarosa al 3% a 60V de la amplificación del terminador tNOS con los primers tNOS F/ tNOS R, para la detección de organismos genéticamente modificados en cervezas. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo, Bt: barrilito, Ha: Harvest Ale, Lp: London Porter e Id: Indio.

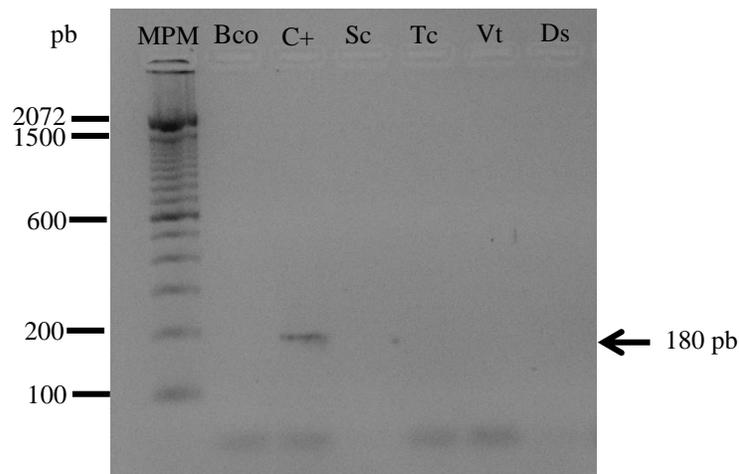


Figura 36. Electroforesis en un gel de agarosa al 3% a 60V de la amplificación del terminador tNOS con los primers tNOS F/ tNOS R, para la detección de organismos genéticamente modificados en cervezas. MPM: marcador de peso molecular, Bco: blanco, C+: control positivo, Sc: Sol, Tc: Tecate, Vt: Victoria y Ds: O'Douls.

El promotor p35S y el terminador tNOS son los dos objetivos principales para la expresión de organismos genéticamente modificados (OGM), sin embargo un número

creciente de construcciones genéticas no contienen p35S ni elementos tNOS (Debode *et al.*, 2013), por lo que, como se mencionó anteriormente el hecho de que no se haya identificado el terminador tNOS en cebada ni en cervezas, no descarta la posibilidad de que hayan sido modificados genéticamente, ya que no es el único terminador que se usa en la expresión de los genes. Algunos de los promotores usados son: pFMV, pNOS, pSSuAra, pTA29, pUbi, pRice actin y en cuanto a los terminadores son: tE9, tOCS, tg7 (Debode *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que el ADN se puede recuperar de la cerveza, abriendo así la posibilidad de detectar la presencia de secuencias genómicas transgénicas (Hotzel *et al.*, 1999).

De acuerdo a la lista roja y verde de alimentos transgénicos de GREENPEACE, 2015 las cervezas que marcan como transgénicas son: Carta Blanca, Corona, Estrella, Indio, Modelo, Sol, Superior, Tecate y XX Lager, de las cuales se evaluaron seis, en las que cinco resultaron ser transgénicas y en una no se pudo realizar la extracción.

Los organismos genéticamente modificados (OGM) y ciertas sustancias producidas por ellos a través de procesos biotecnológicos, se están utilizando de manera creciente como materias primas y aditivos en los alimentos nuevos. En cuanto a los ingredientes potenciales de la cerveza, es concebible sustituir cepas de producción convencionales de levadura, así como variedades de cebada y lúpulo, por sus homólogos modificados genéticamente para mejorar los parámetros de calidad seleccionados y/o mejorar la eficacia del proceso de elaboración de cerveza (Hotzel *et al.*, 1999).

CONCLUSIONES

Los *primers* diseñados para la identificación de cebada maltera, así como los diseñados para trigo, son específicos para dichas especies, por lo cual se pueden utilizar para futuros estudios. Así mismo los *primers* para la detección de organismos genéticamente modificados mediante el promotor CaMV y el terminador tNOS obtenidas del artículo también resultaron eficientes para la identificación de transgénicos.

Los programas de PCR diseñados, amplificaron de manera correcta las secuencias de interés.

La extracción de ADN mediante el protocolo de Sambrook resulto eficiente para la extracción de ADN de cereales y de cerveza.

Se evaluaron 9 muestras de grano de cebada maltera, de las cuales ninguna contenía el promotor CaMV ni el terminador tNOS.

Se analizaron 16 muestras de cervezas comerciales de origen nacional e internacional, líderes en el mercado, pero solo en 14 muestras fue posible su amplificación. De esas 14, todas contenían cebada maltera y trigo en su composición, lo cual no se reporta en la etiqueta de algunas cervezas, debido a que la NORMA Oficial Mexicana NOM-142-SSA1/SCFI-2014, establece que la lista de ingredientes solo debe figurar en la etiqueta de las bebidas alcohólicas preparadas, licores o cremas y en todas las bebidas alcohólicas, que después de destiladas y/o antes de embotellar utilicen ingredientes como por ejemplo: trigo, centeno, cebada, avena, etc. Por lo cual en el etiquetado de algunas cervezas no se reportaban todos los ingredientes o ninguno, lo cual es importante considerar para estudios como este, en el que los resultados pueden depender de la presencia desconocida de ingredientes en la composición de un producto.

De las 14 muestras de cervezas, en las cuales fue posible su amplificación, todas resultaron ser transgénicas, ya que amplificaron con el promotor CaMV, sin embargo no contenían el terminador tNOS.

De las muestras de cerveza evaluadas, ninguna señalaba en su etiquetado la presencia de organismos genéticamente modificados en su composición, a pesar de que la “Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados” indica que los OGM o productos

que contengan organismos genéticamente modificados, autorizados por la SSA, deberán garantizar la referencia explícita de estos, y señalar en la etiqueta la información de su composición alimenticia o sus propiedades nutrimentales, en aquellos casos en que estas características sean significativamente diferentes respecto de los productos convencionales.

Es por esto que existe la necesidad de un etiquetado más estricto, para reportar los ingredientes en los alimentos, así como para indicar la presencia de Organismos Genéticamente Modificados en los mismos, para que el consumidor al estar informado pueda decidir lo que desea adquirir.

ANEXOS

I. Diseño de *primers*

Para la realización de éste objetivo, se obtuvo del artículo de Pegels *et al.*, 2014 la región ITS1 (Internal Transcribed Spacer-espaciadores internos transcritos) para cebada (*H. vulgare*).

El diseño de los *primers* se realizó con un programa bioinformático, ingresando a la siguiente página electrónica:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Una vez en la página se selecciona la opción *Nucleotide* y se introduce la clave de acceso indicada en el artículo antes mencionado, para que nos lleve a la región ITS1

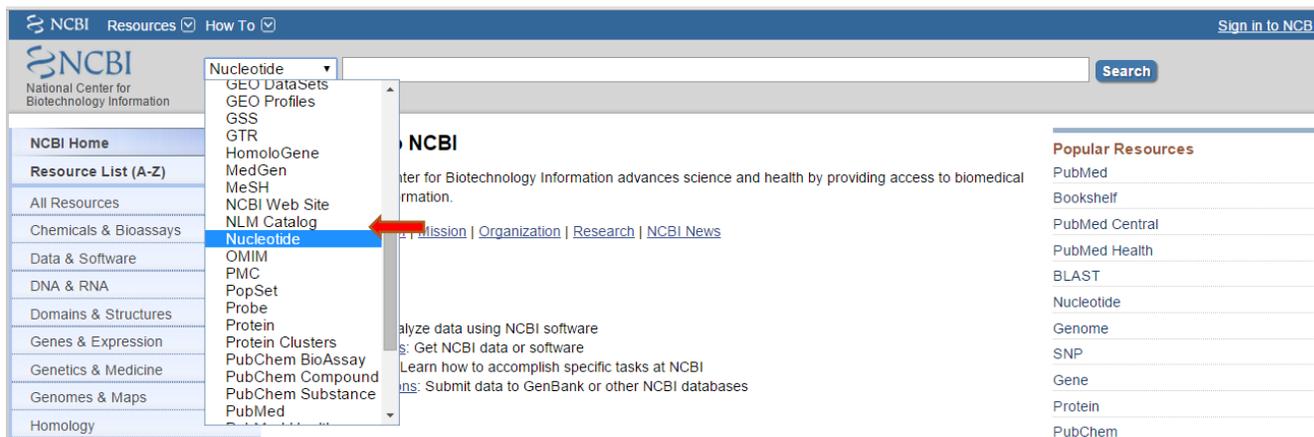


Figura 37. Página principal del programa bioinformático NCBI para el diseño de *primers*.

Ya que se introdujo la clave, dar click en *Search*.



Figura 38. Página principal donde se ha introducido la opción *Nucleotide* y la clave obtenida del artículo.

En seguida nos muestra algunas características del gen deseado, así como su secuencia, que es de donde partiremos para el diseño de los *primers*.

```

ORIGIN
      1  tcgtgacct  gacaaaaaca  gaccgtgctc  gcgtcatcca  attctccgac  gatggcattg
     61  ttcgtcgttc  ggccaattcc  acgaccgcct  ccactcctag  gagcgggggc  tcgtggtaaa
    121  agaaccacg  gcgccgaagg  cgtcaaggaa  cactgtgcct  aaccggggga  gatggctagc
    181  ttgctggctg  tcacctgtgt  tgcaaatata  tttaatccac  acgactctcg  gcaacggata
    241  tctcggctct  cgcctcgtat  aagaacgtag  cgaaatgcga  tacctgggtg  gaattgcaga
    301  atccccgaa  ccatcgagtc  tttgaacgca  agttgcgccc  gaggcactc  ggccgagggc
    361  acgcctgcct  gggcgtcacg  ccaaaacacg  ctcccaacca  cctcttcgga  gaattgggat
    421  gcggcatatg  gtccctcgtc  ctgcaagggg  cggtgggccg  aagatcgggc  tgccggcgta
    481  ccgctcgga  cacagcgcac  ggcgggcgct  cttgctttat  caatgcagtg  catccgacgc
    541  gtagacggca  tcatggcctc  gaaacgacc  atcgaacgaa  gtgcacgtcg  cttcgacc
//
  
```

Figura 39. Secuencia de nucleótidos del gen seleccionado.

Para que el programa nos proporcionara varias propuestas de *primers*, se dio click en *Pick Primers*.

The screenshot shows the NCBI GenBank interface. The main title is "Hordeum vulgare subsp. vulgare ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, specimen voucher BCC1302(Angora), clone a". Below the title, there are links for "FASTA" and "Graphics". A "Go to" dropdown menu is open, showing "Design and test primers for this sequence using Primer-BLAST." A red arrow points to the "Pick Primers" button in the "Analyze this sequence" section. Other sections include "Change region shown", "Customize view", "Related information", and "Recent activity".

Figura 40. Página donde se muestran las características del gen seleccionado y donde se encuentra la opción *Pick Primers* necesaria para el diseño de *primers*.

Nos lleva a otra página en la que se introduzcan las características que deseas que tengan tus *primers*, en este caso se dejaron los valores ya establecidos por el programa y solo se modificó el amplificado de los *primers*, que se eligió que estos fueran de 200 a 300 pb.

Figura 41. Página donde se introdujeron las características deseadas para los primers diseñados.

Y en la opción *Database*, se eligió *Genome (chromosomes from all organisms)*. Una vez modificado se dio click en *Get Primers*.

Figura 42. Página donde se introdujeron las características deseadas para los primers diseñados (continuación).

En seguida el programa proporciono varias parejas de *primers*, y se eligieron las que tenían similar temperatura de hibridación, una longitud de 20 oligos y un porcentaje de GC% mayor a 50.

Primer pair 2

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CGACGATGGCATTGTTCGTC	Plus	20	47	66	59.97	55.00	7.00	3.00
Reverse primer	ACCAGGTATCGCATTTCGCT	Minus	20	288	269	59.82	50.00	5.00	3.00
Product length	242								

Figura 43. Pareja de primers proporcionadas por el programa y seleccionados para la amplificación de cebada maltera (*Hordeum vulgare*).

En éste caso se eligió la pareja 2, ya que cumplió con las características antes mencionadas.

Se realizó la misma metodología para el diseño de *primers* del trigo.

Para comprobar que los *primers* elegidos fueran específicos para la especie deseada, se dio click en Run BLAST.

The screenshot shows the NCBI GenBank interface. At the top, there are navigation links for 'NCBI', 'Resources', and 'How To'. Below that is a search bar with 'Nucleotide' selected and a 'Search' button. The main content area displays the sequence information for 'Hordeum vulgare subsp. vulgare ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, specimen voucher BCC1302(Angora), clone a'. A red box highlights the 'Run BLAST' option under the 'Analyze this sequence' dropdown menu. A tooltip points to this option with the text: 'Find regions of similarity between this sequence and other sequences using BLAST.'

Figura 44. Página donde se muestra la opción Run BLAST, necesaria para verificar que los primers elegidos fueran específicos para la especie deseada.

Se seleccionó *Align two or more sequences* y en el primer cuadro se escribió la secuencia de los *primers* frontales de la cebada que se diseñaron y en el segundo cuadro el número Gi. Todo lo demás se deja igual y se da click en BLAST.

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI/BLAST/blastn suite **Align Sequences Nucleotide BLAST**

blastn blastp blastx tblastn tblastx

BLASTN programs search nucleotide subjects using a nucleotide query. [more...](#) [Reset page](#) [Bookmark](#)

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#) [Query subrange](#)

CGACGATGCGCATTGTTGTC From
To

Or, upload file [Seleccionar archivo](#) Ningún archivo seleccionado [Job Title](#)
Enter a descriptive title for your BLAST search [Align two or more sequences](#)

Enter Subject Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#) [Subject subrange](#)

51965660 From
To

Or, upload file [Seleccionar archivo](#) Ningún archivo seleccionado

Program Selection

Optimize for

- Highly similar sequences (megablast)
- More dissimilar sequences (discontiguous megablast)
- Somewhat similar sequences (blastn)

[Choose a BLAST algorithm](#)

BLAST Search nucleotide sequence using Megablast (Optimize for highly similar sequences)
 Show results in a new window

[Algorithm parameters](#)

Figura 45. Página donde se introdujeron cada una de las secuencias de los primers y el número Gi, para verificar que los primers diseñados fueran específicos para la especie deseada.

Y enseguida se abrió otra página donde nos indicó las secuencias con las que se pueden producir alineamientos significativos.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Hordeum vulgare subsp. vulgare ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, specimen voucher BCC1302(Angora), clone a	40.1	40.1	100%	7e-09	100%	AJ608147.1

Figura 46. Página donde se verificó que la especificidad de los primers diseñados fuera del 100%.

Como se puede observar los primers frontales seleccionados presentan 100% de identidad con la especie *Hordeum vulgare*.

II. Hidratación de los *primers*

CEBADA

Primer R

$$nmoles = 33.7$$

$$33.7 \text{ nmoles} \left(\frac{1 \text{ } \mu\text{moles}}{1000 \text{ nmoles}} \right) = 0.0337 \text{ } \mu\text{moles}$$

$$U = \frac{0.0337 \text{ } \mu\text{moles} * L}{250 \text{ } \mu\text{moles}} = \frac{0.0001348}{1 \times 10^{-6}} = 134.8 \text{ } \mu\text{L de H}_2\text{O L. N.}$$

Primer F

$$nmoles = 32.2$$

$$32.2 \text{ nmoles} \left(\frac{1 \text{ } \mu\text{moles}}{1000 \text{ nmoles}} \right) = 0.0322 \text{ } \mu\text{moles}$$

$$U = \frac{0.0322 \text{ } \mu\text{moles} * L}{250 \text{ } \mu\text{moles}} = \frac{0.0001288}{1 \times 10^{-6}} = 128.8 \text{ } \mu\text{L de H}_2\text{O L. N.}$$

TRIGO

Primer R

$$nmoles = 30.1$$

$$30.1 \text{ nmoles} \left(\frac{1 \text{ } \mu\text{moles}}{1000 \text{ nmoles}} \right) = 0.0301 \text{ } \mu\text{moles}$$

$$U = \frac{0.0301 \text{ } \mu\text{moles} * L}{250 \text{ } \mu\text{moles}} = \frac{0.0001204}{1 \times 10^{-6}} = 120.4 \text{ } \mu\text{L de H}_2\text{O L. N.}$$

Primer F

$$nmoles = 35$$

$$35 \text{ nmoles} \left(\frac{1 \text{ } \mu\text{moles}}{1000 \text{ nmoles}} \right) = 0.035 \text{ } \mu\text{moles}$$

$$U = \frac{0.035 \text{ } \mu\text{moles} * L}{250 \text{ } \mu\text{moles}} = \frac{0.00014}{1 \times 10^{-6}} = 140 \text{ } \mu\text{L de H}_2\text{O L. N.}$$

REFERENCIAS

- [1]. Agrawal, P. K., Kohli, A., Twyman, R. M., y Christou, P. (2005). Transformation of plants with multiple cassettes generates simple transgene integration patterns and high expression levels. *Mol. Breed*, 16 (3), 247-260.
- [2]. Asensio, L., González, I., García, T., y Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, 19(1), 1-8.
- [3]. Bamforth, C. W. (2002). Nutritional aspects of beer—a review. *Nutrition Research*, 22(1–2), 227-237.
- [4]. Bamforth, C. W. (2009). Beer : tap into the art and science of brewing. (3° ed.) Oxford: Oxford University Press.
- [5]. Bueno i Torrens, D. (2011). ¿Para qué sirven los transgénicos? : todas las claves de una tecnología útil y controvertida. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- [6]. CANICERM (2014). Cámara Nacional de la Industria de la Cerveza y de la Malta. <<http://canicerm.org.mx/economia.html>> [1 de septiembre de 2014].
- [7]. Cseke, L.J. y Herdy, J.R. (2012). Methods in Cell Biology. U.S.A.: *Academic Press*.
- [8]. COFEPRIS (2014). Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Obtenido de <<http://www.cofepris.gob.mx/Paginas/Inicio.aspx>> [27 de agosto del 2014].
- [9]. Debode, F., Janssen, E. y Berben, G. (2013). Development of 10 new screening PCR assays for GMO detection targeting promoters (pFMV, pNOS, pSSuAra, pTA29, pUbi, pRice actin) and terminators (t35S, tE9, tOCS, tg7). *European Food Research and Technology*, 236(4), 659-669.
- [10]. Deloya, M. C. (2011). 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. (Informe). <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/GRANOS.pdf> Recuperado de SAGARPA [24 de agosto de 2014].
- [11]. Dendy, D. A. V., y Dobraszczyk, B. J. (2004). Cereales y productos derivados, Química y Tecnología. Zaragoza, España: Acribia.

- [12]. Díaz G., A. F. (2015). El juicio de los transgénicos. *Orbis: Revista Científica Ciencias Humanas*, 10(30), 17-30.
- [13]. El Economista. (2014, 5 de Junio). Mayor consumo de cerveza, reto de la industria nacional. <<http://eleconomista.com.mx/industrias/2014/06/05/mayor-consumo-cerveza-reto-industria-nacional>>[28 de marzo del 2015].
- [14]. Giraldo, A. C. (2009). La selección natural y los cultivos transgénicos: ¿Un hiato darwinista? *Acta Biológica Colombiana*, 14, 365-381.
- [15]. Goedeke, S., Hensel, G., Kapusi, E., Gahrtz, M. y Kumlehn, J. (2007). Transgenic Barley in Fundamental Research and Biotechnology. *Transgenic Plant Journal*, 1(1), 104-117.
- [16]. Greenpeace. (2015). Guía roja y verde de alimentos transgénicos. pdf. <www.greenpeace.es>[28 de Abril del 2015].
- [17]. Greiner, R., y Konietzny, U. (2008). Presence of genetically modified maize and soy in food products sold commercially in Brazil from 2000 to 2005. *Food Control*, 19(5), 499-505.
- [18]. Greiner, R., Konietzny, U., y Villavicencio, A. L. C. H. (2005). Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. *Food Control*, 16(8), 753-759.
- [19]. Hensel, G., Valkov, V., Middlefell, J. W. y Kumlehn, J. (2008). Efficient generation of transgenic barley: The way forward to modulate plant–microbe interactions. *Journal of Plant Physiology*, 165(1), 71-82.
- [20]. Hornsey, S. I. (2002). Elaboración de cerveza. Microbiología, bioquímica y tecnología. Zaragoza, España: Acribia.
- [21]. Hotzel, H., Müller, W. y Sachse, K. (1999). Recovery and characterization of residual DNA from beer as a prerequisite for the detection of genetically modified ingredients. *European Food Research and Technology*, 209(3-4), 192-196.
- [22]. Hughes, P. S., y Baxter, E. D. (2003). Cerveza: Calidad, higiene y características nutricionales. Zaragoza, España: Acribia, S.A.
- [23]. Iimure, T., y Sato, K. (2013). Beer proteomics analysis for beer quality control and malting barley breeding. *Food Research International*, 54(1), 1013-1020.

- [24]. ISAAA (2014). International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. Obtenido de < <http://www.isaaa.org/default.asp> > [1 de septiembre del 2014].
- [25]. Jones, H. D., y Shewry, P. R. (2009). Transgenic wheat, barley and oats : production and characterization protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- [26]. Karamollaoglu, I., Avni, O.H. y Mutlu, M., (2009). QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs). *Biochemical Engineering Journal*, 44, 142-150.
- [27]. Koontz, L. (2013). Methods in Enzymology. U.S.A.: Academic Press.
- [28]. Ley DOF 18-03-2005: Ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados, Diario Oficial de la Federación, México, 18 de marzo de 2005.
- [29]. López P, P., Prieto G, F., Gaytán M, M., y Román G, A. D. (2007). Caracterización fisicoquímica de diferentes variedades de cebada cultivadas en la región centro de México. *Revista chilena de nutrición*, 34 (1), 71-77.
- [30]. MacRitchie, F. (2010). Concepts in cereal chemistry. Boca Raton: CRC Press.
- [31]. Martínez T., M, Cabrera P., José L. y Herrera E., L.(2004). Las plantas transgénicas: una visión integral. *e-Gnosis* 2(2), 1-28.
- [32]. Martínez, G. A. (2008). Tequila, mezcal y cerveza: de México para el mundo. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 5(2), 143-150.
- [33]. Massieu, T. Y. C. (2009). Cultivos y alimentos transgénicos en México: El debate, los actores y las fuerzas sociopolíticas. *Argumentos*, 22, 217-243.
- [34]. Mayer, K. F., Waugh, R., Brown, J. W., Schulman, A., Langridge, P., Platzer, M., Fincher, G.B., Muehlbauer, G. J., Sato, K., Close, T. J., Wise, R. P. y Stein, N. (2012). A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, 491(7426), 711-716.
- [35]. Mignani, A. G., Ciaccheri, L., Mencaglia, A. A., Ottevaere, H., Báca, E. E. S., y Thienpont, H. (2013). Optical measurements and pattern-recognition techniques for identifying the characteristics of beer and distinguishing Belgian beers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 179(0), 140-149.
- [36]. Miraglia, M., Berdal, K.G., Brera, C., Corbisier, P. *et al.* (2004) Detecion and traceability of genetically modifies organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology*. 42(7), 1157-1180.

- [37]. Mrízová, K., Holasková, E., Öz, M. T., Jiskrová, E., Frébort, I., y Galuszka, P. (2014). Transgenic barley: A prospective tool for biotechnology and agriculture. *Biotechnology Advances*, 32(1), 137-157.
- [38]. NORMA Oficial Mexicana NOM-142-SSA1/SCFI-2014, Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial, Diario Oficial de la Federación, 8 de marzo de 2013.
- [39]. Özgen, A. Ö., Yılmaz, F., y Muratoğlu, K. (2013). PCR detection of genetically modified maize and soy in mildly and highly processed foods. *Food Control*, 32(2), 525-531.
- [40]. Pegels, N., González, I., García, T. y Martín, R. (2014). Authenticity testing of wheat, barley, rye and oats in food and feed market samples by real-time PCR assays. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 867-875.
- [41]. Pires, E. y Brányik, T. (2015). *Biochemistry of Beer Fermentation*. New york: Springer.
- [42]. Preedy, V. R. (2009). *Beer in health and diseases prevention*. Burlington, Massachusetts: Academic/Elsevier.
- [43]. PROFECO (2013). Procuraduría Federal del Consumidor. Comunicado 074: Importante para la economía nacional la industria cervecera. <<http://www.profeco.gob.mx/prensa/prensa13/abril13/bol074.asp>>[16 de Diciembre del 2014].
- [44]. Rasmussen, S. (2014). Cap. 3 Beer. En *The Quest for Aqua Vitae*. (pp. 29-48). Estados Unidos: Springer International Publishing.
- [45]. Rodríguez R., P., y González R., O. (2007). Plantas transgénicas: una revisión de los principales cultivos básicos en México. *e-Gnosis*, 5(9), 1-22.
- [46]. Rodríguez Y., E. (2013). Temas éticos en investigación internacional con alimentos transgénicos. *Acta Bioethica*, 19(2), 209-218.
- [47]. SAGARPA (2011). Estimación de las exportaciones Agroalimentarias a Nivel de Entidad Federativa. Obtenido de < http://2006-2012.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Estima_Exp_Edo.pdf> [12 de enero del 2015].
- [48]. Saldívar, S. R. O. S. (2009). *Química, almacenamiento e industrialización de los cereales México*, D.F. : AGT Editor.

- [49]. Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*. (3° ed.). U.S.A.: C. S. H. L. Press.
- [50]. Shrawat, A. K., Becker, D. y Lörz, H. (2007). Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science*, 172(2), 281-290.
- [51]. Tozzini, A. C., Martínez, M. C., Lucca, M. F., Vázquez Rovere, C., Distéfano, A. J., Del Vas, M., y Hopp, H. E. (2000). Semi-quantitative detection of genetically modified grains based on CaMV 35S promoter amplification. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3 (2), 149-153.
- [52]. Travella, S., Ross, S. M., J., H., Everett, C., Snape, J. W., y Harwood, W. A. (2005). A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and Agrobacterium-mediated techniques. *Plant cell Rep.*, 23, 780-789.
- [53]. Ullrich, S. E. (2011). *Barley production, improvement and uses*. Ames, IA, USA: Wiley-Blackwell.
- [54]. van Pelt-Verkuil, E., van Belkum, A. y Hays, J. (2008). *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer Netherlands.
- [55]. Villalobos A., V. M. (2008). *Los transgénicos : oportunidades y amenazas*. (1° ed.). Madrid: Mundi-Prensa.
- [56]. Villegas, V. E., Sánchez, M. C. y Chuaire, L. (2009). Reacción en cadena de la polimerasa y diagnóstico molecular. *Colombia Médica*, 40(3), 347-352.
- [57]. Zhang, G., y Li, C. (2009). *Chemical Composition in Barley Grains and Malt Quality*. Australia: Springer Berlin Heidelberg.