



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

“DETECCIÓN DE FRUTOS DE PAPAYA (*Carica papaya L.*)
GENÉTICAMENTE MODIFICADOS, COMERCIALIZADOS
EN MÉXICO POR REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

ARTURO HUERTA OLGUÍN

ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA

COASESOR: M. EN M. JOSEFINA MORENO LARA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE ESTADOS UNIDOS
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 Frutos de papaya (Carica papaya L.) genéticamente modificados, comercializados en México por Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Que presenta el pasante: Arturo Huerta Olguín
Con número de cuenta: 410038004 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 25 de Agosto de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	I.A. María Guadalupe López Franco	
SECRETARIO	Dra. María de la Luz Zambrano Zaragoza	
1er. SUPLENTE	M. en C. Araceli Ulloa Saavedra	
2do. SUPLENTE	M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza	

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

BHM/mmgm*

DEDICATORIAS

A ti mamá, por darme tanto amor y cariño, por ser una gran consejera en las decisiones que he tomado durante toda mi vida, que con los regaños, consentimientos y confianza, siempre procuras hacerme una mejor persona, lo cual estoy sumamente agradecido, recuerda que eres un gran ejemplo para mí y nunca olvides que... Te amo Susana Olguín.

A ti papá, que con tanto esfuerzo y amor me has apoyado en todo, gracias por siempre ser esa persona que me motiva a luchar por lo que quiero, eres mi admiración, te agradezco de corazón que siempre me brindes tu amor y consejos, porque gracias a ello, pude terminar este logro importante, que es igual tuyo gracias por todo.....Te amo Carmelo Huerta.

A mis hermanas, por todo el apoyo que me han dado, gracias por estar siempre en los momentos tristes y felices a mi lado, por todas las risas, juegos y alegrías que pasamos a diario, saben que el amor que nos tenemos es muy grande y que gracias a eso, hemos superado cualquier obstáculo que se nos ponga por delante, recuerden que siempre contarán conmigo para lo que sea.....Las amo Dianita y Susy

A ti abuelita, por haberme dado tanto cariño durante todo el tiempo que estuviste conmigo, me hubiera encantado que estuvieras presente para ver este logro, pero desde allá arriba sé que lo observas, te quiero mucho y siempre estarás conmigo mami Paula.

A Omar, Chema, Lalo, Lidia y Flor, con quienes compartí gratos e inolvidables momentos en la universidad, fue increíble conocerlos, son amistades que uno siempre quiere conservar y espero que así siga siendo, gracias por todo.

A Lalo, Gil, Carrillo, Gosha, Axel, Ellian, Tania y demás amigos que he conocido a lo largo de toda mi vida, gracias por la amistad que me han brindado durante tantos años, me alegra tanto todo lo que hemos logrado y más por todo los momentos compartidos con ustedes, gracias por ser mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

A usted don Poly, por el gran apoyo que me ha dado para la culminación de la carrera y sobre todo por ser un gran amigo de toda la vida, se le quiere y aprecia mucho.

A doña Gloria y don Carlos, por abrirme las puertas de su hogar durante 5 años, por la amistad y la confianza que me brindaron, por esas largas conversaciones que tenía con ustedes a la hora de comer que fueron muy lindas, aprecio mucho lo que hicieron por mí, mil gracias.

A Héctor y Jair por el aprecio y amistad que me han brindado durante este tiempo que hemos convivido, gracias cuñados.

Al Dr. José Francisco Montiel Sosa por el apoyo para la realización de este proyecto.

A la M. en C. Josefina Moreno Lara, por llevarme de la mano durante la realización del proyecto, apoyarme cuando las cosas no salían bien durante la experimentación y no dejarme caer en la desesperación, así como el tiempo que me dedico para terminar el proyecto, muchas gracias.

A mis sinodales, por las observaciones, recomendaciones y tiempo que dedicaron a esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México que a través de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, y con la formación académica recibida aquí, hicieron posible mi desarrollo como Ingeniero en Alimentos, es un gran orgullo ser egresado de esta prestigiosa universidad.

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

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE CUADROS	IX
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES	4
1.1 Origen.....	5
1.2 Clasificación y Descripción Botánica	5
1.2.1 Descripción Botánica	6
1.2.2 La Papaína	11
1.3 Variedades de papaya.....	12
1.3.1 Variedades de papaya en México.....	14
1.4 Producción mundial de papaya	15
1.4.1 Producción de papaya en México.....	15
1.5 Plagas y enfermedades	17
1.5.1 Enfermedades.....	17
1.5.2 Plagas	19
1.6 Organismos Genéticamente Modificados.	22
1.6.1 Papaya genéticamente modificada.	23
1.6.2 Creación de plantas transgénicas.....	24
1.6.3 Promotores y Terminadores	29
1.6.4 Regulación Internacional de Organismos Genéticamente Modificados.....	30
1.6.5 Legislación y regulación nacional de OGM.....	32
1.6.6 Cultivos genéticamente Modificados (GM).....	34
1.6.7 Debate de los alimentos genéticamente modificados.....	36
1.7 Métodos de análisis basados en la detección de proteínas	38
1.8 Análisis basados en la detección de ADN. Reacción en Cadena de la Polimerasa	40
1.8.1 Fundamento de la técnica de PCR.....	41
1.8.2 Etapas de la Reacción.....	41

1.8.3 Componentes de la PCR.....	43
1.8.4 Análisis del producto de una PCR.....	45
CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	47
2.1 Cuadro Metodológico.....	47
2.1.1 Descripción del cuadro metodológico.....	47
2.2 Materiales y Métodos.....	48
2.2.1 Material biológico.....	48
2.2.2 Extracción de ADN.....	50
2.2.3 Cuantificación de la concentración y pureza de ADN.....	51
2.2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	53
2.2.5 Programas de PCR.....	55
2.2.6 Electroforesis en gel de agarosa.....	56
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
3.1 Objetivo Particular 1.....	60
3.2 Objetivo Particular 2.....	60
3.3 Objetivo Particular 3.....	62
3.4 Objetivo Particular 4.....	62
CONCLUSIONES.....	74
GLOSARIO.....	76
REFERENCIAS.....	78
ANEXOS.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes vegetativas de la planta de papaya.....	6
Figura 2. Flor Masculina.....	8
Figura 3. Flor Femenina	8
Figura 4. Flor Hermafrodita Pentándrica.....	9
Figura 5. Flor Hermafrodita Elongata.....	10
Figura 6. Papaya variedad Solo	12
Figura 7. Papaya variedad Maradol	13
Figura 8. Papaya variedad Cariflora	13
Figura 9. Papaya Variedad Sunrise.....	14
Figura 10. Papaya Variedad Waimanalo	14
Figura 11. Regiones productoras de papaya en México	16
Figura 12. <i>Tetranychus urticae</i>	19
Figura 13. <i>Aphis spp. Myzus persicae</i>	20
Figura 14. <i>Empoasca spp</i>	20
Figura 15. <i>Trialeurodes variabilis</i>	21
Figura 16. <i>Toxotrypana curvicauda</i>	21
Figura 17. Papaya infectada de mancha anillada de la papaya (VMAP).....	23
Figura 18. Obtención de plantas transgénicas mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
Figura 19. Procedimiento de obtención de plantas transgénicas resistente a virus	28
Figura 20. Cultivos de Transgénicos los principales son soya, maíz y algodón hasta 2013.	35
Figura 21. Esquema de funcionamiento de un Western Blot	40
Figura 22. Desnaturalización del ADN	42
Figura 23. Inicio de la reacción de la PCR.....	42
Figura 24. Progreso de la reacción de la PCR a la temperatura óptima del ADN	43
Figura 25. Etapas y condiciones de programa de PCR para la identificación de papaína.....	55
Figura 26. Etapas y condiciones de programa de PCR para la identificación de CaMV y	56
Figura 27. Esquema representativo de una corrida de electroforesis	57

Figura 28. Identificación específica de papaya en cuatro muestras de papaya a partir de los primers de papaína en gel de agarosa al 2.5%. (M1, M2, M3, M4).....	63
Figura 29. Identificación específica de papaya en cuatro muestras de papaya a partir de primers de papaína en gel de agarosa al 2.5%. (M5, M6, M7,M8).....	65
Figura 30. Identificación específica de papaya en siete muestras de papaya a partir de primers de papaína en gel de agarosa al 2.5%. (M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15)...	65
Figura 31. Identificación específica de papaya en tres muestras de papaya de variedad hawaiana a partir de primers de papaína en un gel de agarosa al 2.5%. (M16, M17, M18).....	66
Figura 32. Identificación del promotor CaMV en cinco muestras de papaya a partir de los primers del mismo promotor en un gel de agarosa al 2.5%. (M1, M2, M3, M4, M5).....	67
Figura 33. Identificación del promotor CaMV en cuatro muestras de papaya a partir de los primers del mismo promotor en un gel de agarosa al 2.5%. (M6, M7, M8, M9).....	68
Figura 34. Identificación del promotor CaMV en cinco muestras de papaya a partir de los primers del mismo promotor en un gel de agarosa al 2.5%. (M11, M12, M13, M14, M15).....	69
Figura 35. Identificación del promotor CaMV en 3 muestras de papaya de variedad hawaiana a partir de los primers del mismo promotor en un gel de agarosa al 2.5%. (M16, M17, M18).....	70
Figura 36. Identificación del terminador T-NOS en siete muestras de papaya a partir de los primers del mismo terminador en un gel de agarosa al 2.5%. (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7).	71
Figura 37. Identificación del terminador T-NOS en siete muestras de papaya a partir de los primers del mismo terminador en un gel de agarosa al 2.5%. (M8, M9, M11, M12, M13, M14, M15).	72
Figura 38. Identificación del terminador T-NOS en muestras de papaya de variedad hawaiana a partir de los primers del mismo terminador en un gel de agarosa al 2.5%. (M16, M17, M18).....	73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación Taxonómica de la Papaya.....	5
Cuadro 2. Composición Química de la Fruta de la Papaya.....	11
Cuadro 3. Principales países productores de papaya en 2013.	15
Cuadro 4. Principales productores de papaya por estado en México. Años 2010 al 2013.....	17
Cuadro 5. Alimentos Transgénicos permitidos en México por autoridades gubernamentales.....	34
Cuadro 6. Criterios principales a considerar para la selección adecuada de primers	44
Cuadro 7. Muestras de papaya utilizadas en la experimentación	49
Cuadro 8. Materiales, equipos y reactivos empleados en la extracción de ADN.....	50
Cuadro 9. Reactivos, materiales y equipos utilizados durante la cuantificación de ADN	52
Cuadro 10. Reactivos, materiales y equipos utilizados en la PCR.....	53
Cuadro 11. Primers utilizados en la PCR para la detección de papaína	53
Cuadro 12. Primers utilizados en la PCR para la detección de CaMV y T-NOS.....	54
Cuadro 13. Reactivos utilizados para la realización de PCR	54
Cuadro 14. Reactivos, Materiales y Equipos utilizados en electroforesis y visualización del gel.....	57
Cuadro 15 Cuantificación de ADN en muestras de papaya	61
Cuadro 16. Cuantificación de ADN de maíz y canola transgénicas.	62

RESUMEN

Actualmente la humanidad vive una crisis alimentaria y deterioro ecológico a nivel global, por consecuencia se busca diversas salidas, una de las cuales es la implementación de nuevas tecnologías, sin embargo éstas generan controversias en cuanto a qué problemas puede causar para la salud humana, el medio ambiente y la alimentación, como es el caso de la biotecnología agrícola.

La papaya genéticamente modificada, fue implementada porque la mayor limitante del cultivo lo constituye la enfermedad virus de la mancha anular (PRSV), que representa un problema importante desde el punto de vista económico. El uso de la ingeniería genética para la obtención de papayas transgénicas, ha sido utilizado con éxito en diversas partes del mundo como es el caso de Hawai.

La importancia de estudiar la presencia de papaya transgénica en México es debido a que es uno de los principales productores y el principal exportador de papaya en el mundo, además de que se considera al país como posible centro de origen de la papaya.

Debido a esto en el presente trabajo se analizaron 13 muestras de papaya en fresco y 5 productos que contuvieran papaya (la variedad que se analizó fue “maradol” ya que representa el 90% de la superficie sembrada y cosechada en el país) con la finalidad de detectar si contenían el promotor del virus mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador de la nopalina sintetasa (T-NOS), (generalmente utilizados para la transformación de plantas genéticamente modificadas) a través de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Finalmente la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es funcional para la identificación de eventos transgénicos, sin embargo en el caso de la papaya analizada, el resultado arrojó ausencia de eventos transgénicos, por lo que se llega a la conclusión que en México aún no se produce, comercializa y consume papayas transgénicas con este promotor y terminador.

INTRODUCCIÓN

México ocupa el quinto lugar como productor de papaya a nivel mundial y es el principal exportador, seguido de Belice y Guatemala. La mayor parte de las exportaciones de papaya se destinan a los Estados Unidos con un 84% y a Canadá con un 16%. Debido a esto, este fruto juega un papel sumamente importante en la economía del país (Feitó y Portal, 2013).

El cultivo de papaya es altamente susceptible al virus de mancha anular de la papaya (PRSV), por ello es que se planteó la obtención de plantas transgénicas de papaya resistentes a este virus mediante ingeniería genética (García *et al.*, 2009).

El PRSV es de los enemigos más peligrosos de este cultivo en todo el mundo y se transmite con suma rapidez. El PRSV fue descubierto en Hawai en los años 40. Una década más tarde, destruyó una gran parte de la producción de la isla hawaiana de Oahu (Cartón, 2002).

A finales de la década de los ochenta iniciaron un proyecto de investigación para desarrollar un tipo de papaya modificada genéticamente utilizando el nuevo concepto de “resistencia derivada del patógeno” (Cartón, 2002).

Con la innovación de técnicas de ingeniería genética, los organismos genéticamente modificados (OGM) se han desarrollado para mejorar parámetros de resistencia y tolerancia a herbicidas e insectos. Para el 2012, 170 millones de hectáreas se han cultivado OGM en 28 países. Sin embargo las controversias son muy grandes, sobre si estos productos presentan un riesgo hacia la salud de las personas y un peligro para el medio ambiente, por lo anterior, el etiquetado de productos con ingredientes que contengan OGM es obligatorio en varios de ellos como es en la Unión Europea, Japón y Corea (Fang *et al.*, 2014).

En México la SAGARPA a través del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) y La Secretaria de Salud (SS), a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) han permitido la liberación de organismos genéticamente modificados para uso agrícola como son: algodón, maíz, soya, canola, trigo del 2008 al 2014, para consumo humano y animal, los permitidos son: jitomate, papa, algodón, soya, canola, maíz, alfalfa, remolacha azucarera, que comprende desde 1995 hasta el 2014 (SENASICA, 2015).

La importancia de saber si en nuestro país exista o no papaya transgénica, se debe a que no se encuentra en los alimentos permitidos por la Secretaría de Salud (SS) y la SAGARPA haya autorizado hasta el día de hoy.

Se sabe que la introducción de semillas de papaya transgénica en los estados productores en México, es nula, sin embargo para tratar de prevenir pérdidas en el sector papayero causadas principalmente por el PRSV, se pudiera estar recurriendo al uso de semilla resistente a este virus, sin la autorización de las autoridades competentes (Scotto, 2010).

Los métodos de análisis dirigidos a identificar la presencia y la cantidad de elementos transgénicos en los alimentos están actualmente disponibles y constituyen una herramienta para la evaluación de la seguridad alimentaria. El método de detección de ADN más confiable es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ya que actualmente es el método de detección rápida, sensible y específica de los marcadores genéticos presentes en los transgénicos (Guan *et al.*, 2005).

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES



1.1 Origen

La papaya se obtiene del árbol conocido como papayo (*Carica papaya* L.), es una especie probablemente originaria de las zonas tropicales de Centroamérica y Sur de México, aunque existe cierta controversia de su origen, ya que algunos investigadores sugieren que es nativa del Caribe, en tanto otros la ubican entre Nicaragua y Honduras, o al Noroeste de América del Sur, en la vertiente oriental de los Andes (Venezuela, Colombia, Brasil y Bolivia) (SENASICA, 2012).

La dispersión de la papaya, inicia aproximadamente en 1500, cuando los españoles llevaron semillas a Panamá y República Dominicana. En el siglo XVI, marinos españoles y portugueses las llevaron a Filipinas, Malasia y la India. Para 1600 aproximadamente, estaban cultivando papayas en regiones cálidas de Sur y Centro América, Sur de México, las Antillas, Bahamas, Bermudas y Florida. A Hawái llegó entre 1800 y 1820. Hasta 1900, la semilla de papaya fue llevada a Florida, probablemente de Bahamas. La variedad “Solo” se cultiva en Hawái desde 1911, es originaria de Barbados y Jamaica. En 1978 se introdujeron a México las primeras semillas de la variedad Maradol, a través de la CONAFRUT, en Xalapa (SENASICA, 2012).

1.2 Clasificación y Descripción Botánica

Cuadro 1. Clasificación Taxonómica de la Papaya

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Violales
Familia	Caricaceae
Genero	<i>Carica</i> L.
Especie	<i>Papaya</i> L.

Fuente: Jiménez, 2002

1.2.1 Descripción Botánica

El papayo es una planta con hojas grandes, de crecimiento rápido, no maderada, herbácea y duradera de muchos años. Botánicamente *Carica papaya* no se puede calificar claramente como árbol, ni planta vivaz, ni arbusto. Alcanza una altura de 10 m y una edad de 15 a 30 años. El tamaño de la fruta varia, pues puede pesar entre 100 g y 6 kg. Su forma es redonda-ovalada hasta oblonga, el color de su pulpa es blanco amarillento, amarillo profundo, anaranjado o amarillo rojizo (Augstburger *et. al*, 2000).

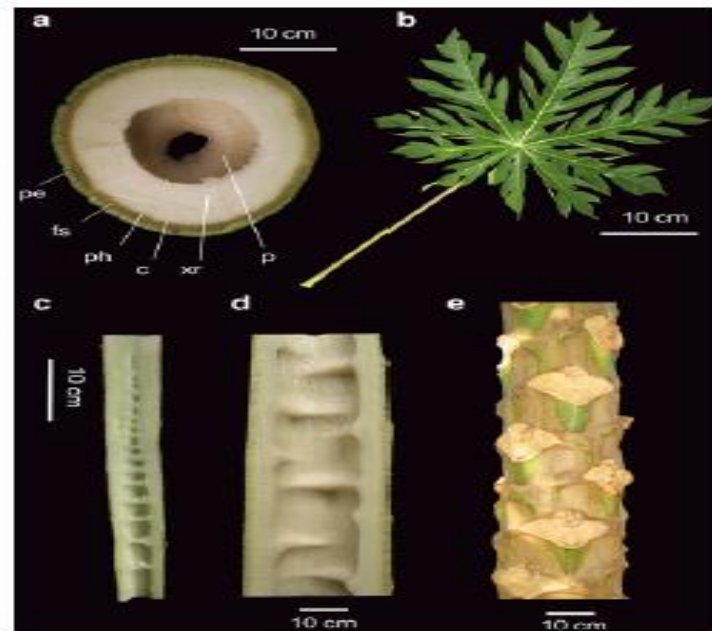


Figura 1. Partes vegetativas de la planta de papaya. A) tallo de papayo de un año de edad. B) hoja de papayo. C) tallo de papayo a 3 meses de edad. D) longitud del tallo de papayo de un año de edad. E) tallo de un año de edad que muestra cicatrices en su exterior.

Fuente: Ming y Moore, 2014

Raíz

La raíz principal es desarrollada y ramificada en forma radial y puede crecer hasta 1.5 metros de profundidad, dependiendo de las limitaciones físicas o químicas del suelo donde se siembre (Arango *et. al*, 2000).

Las raíces secundarias se desarrollan en un radio de 80 cm y la mayor concentración de raíces absorbentes se encuentra en los primeros 20 cm (Alfonso, 2010).

Tallo

Generalmente es único, no ramificado y puede alcanzar alturas hasta 12 metros. Con el transcurso de los años el tronco tiende a volverse más fibroso y hueco; a medida que envejece va tomando una coloración grisácea y se notan unas cicatrices triangulares en los puntos de inserción de las hojas ya caídas (Figura 1) (Arango *et. al*, 2000).

Hojas

Las hojas del papayo crecen en forma simple, alternas y son palmeadas. El limbo mide entre 25 a 75 cm y puede tener de 7 a 10 lóbulos, el pecíolo es largo alcanzando hasta 125 centímetros de longitud y su color puede variar entre verde y morado según la variedad. La planta de papayo produce un promedio semanal de 2 hojas, desarrollándose en el año unas 100. Una planta adulta, normal en su desarrollo, posee alrededor de 30 hojas (Figura 1) (Alfonso, 2010).

Flores

Las flores nacen en la axila de cada hoja, dando lugar a plantas femeninas, masculinas o hermafroditas, por lo que se considera que es una planta polígama (Arango *et. al*, 2000). Las flores del papayo son de color blanco, la polinización de las flores femeninas y hermafroditas se da por el viento y muchas veces por insectos (Alfonso, 2010).

Flores Masculinas o Estaminada

Se forman en las plantas machos y se encuentra en ramilletes nacen en las axilas de las hojas (Figura 2) (Arango *et. al*, 2000).

Se desarrollan en largas panículas colgantes en forma de racimo, la corola está formada por 5 pétalos que se unen en las 3 cuartas partes de su longitud, formando un tubo fino que posee en su base un ovario rudimentario. Posee 10 estambres, algunas veces estas flores, de acuerdo a condiciones ambientales, derivan en flores hermafroditas y producen frutos no comerciales (Alfonso, 2010).

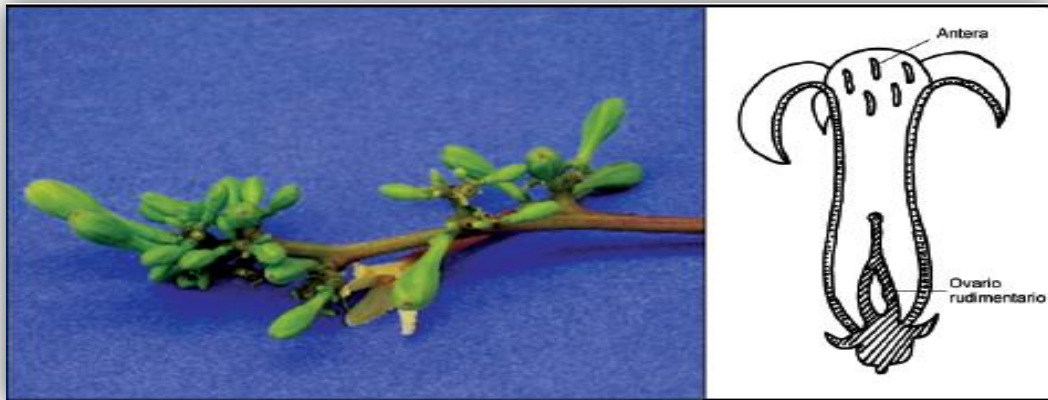


Figura 2. Flor Masculina

Fuente: Alfonso, 2010.

Flor Femenina

Es una flor grande que al abrir sus cinco pétalos lo hacen hasta la base. El ovario, que se convertirá en un fruto después de ser polinizado es grande, de contorno circular, esférico. Las plantas que producen este tipo de flor son muy estables para producir frutos durante el año, los frutos de esta flor tiene valor comercial en el mercado (Figura 3) (INIFAP, 2010).



Figura 3 Flor Femenina

Fuente: Alfonso, 2010

Flor Hermafrodita

Presenta órganos masculinos y femeninos, crecen en racimos cortos y el árbol que las posee tiene a su vez tres clases de flores diferentes; pentándrica, elongata y la intermedia o irregular.

La Hermafrodita pentándrica, su corola se compone de 5 pétalos unidos en su base. El ovario es bien desarrollado, globoso y de lóbulos, presenta la misma forma de una flor femenina. Producen frutos globosos con lóbulos o surcos muy marcados (Figura 4) (Alfonso, 2010).



Figura 4. Flor Hermafrodita Pentándrica

Fuente: Alfonso, 2010.

La Hermafrodita elongata es la flor más corriente y su corola está formada por 5 pétalos únicos en la tercera parte inferior de su longitud. Los frutos provenientes de esta flor son alargados, lisos en su primera mitad y ligeramente lobulados hacia la punta. Estos frutos son de buena calidad, carnosos y con el espacio interno más reducido que los frutos redondos o lobulados (Figura 5) (Alfonso, 2010).

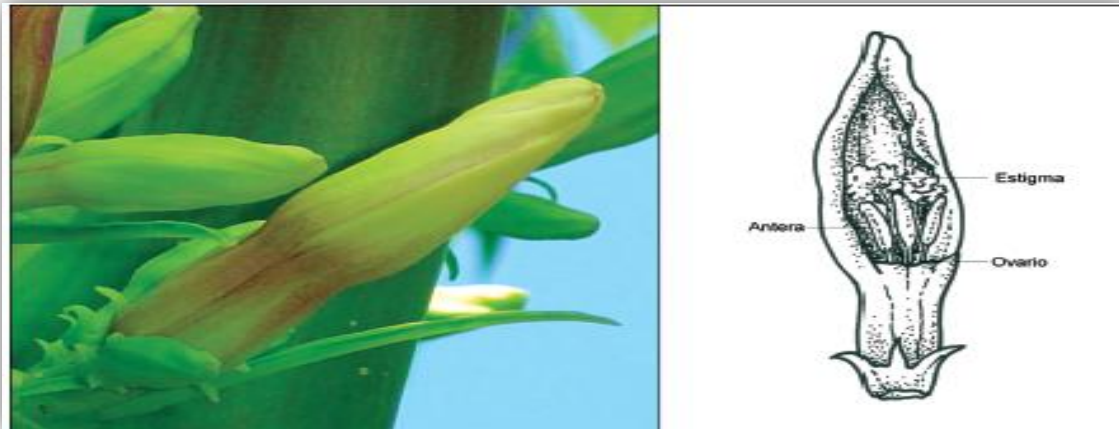


Figura 5. Flor Hermafrodita Elongata

Fuente: Alfonso, 2010

La Hermafrodita Intermedia tiene de 2 a 10 estambres, colocados irregularmente en el tubo de la corola y que nacen de la mitad interna de los pétalos. Los filamentos se funden con la pared del ovario y originan frutos de diversas formas y de bajo valor comercial en algunos casos (Alfonso, 2010).

Fruto

El fruto es una baya de corteza débil, lisa de color verde cuando esta inmadura y se torna amarilla o naranja al madurarse. Su forma es variable dependiendo del tipo de flor que la origine, pudiendo ser redondo, elíptico o en algunos casos, en forma de pera (Arango *et. al*, 2000).

El tamaño del fruto, oscila entre los 10 a 25 cm o más de largo y 7 a 15 cm o más de diámetro y el peso es entre 400 gramos y 6 kilos dependiendo de la variedad y de su posición en la planta; los más grandes son los ubicados en la parte baja del tallo y conforme aumenta la altura disminuye el tamaño del mismo (Pro-papaya, 2009).

La piel que la envuelve es suave y delgada, de color verde amarillento, amarillo o naranja cuando madura. Algunas variedades siguen siendo verdes cuando ya están maduras, aunque por lo general la piel se pone amarilla con la maduración (Pro-papaya, 2009).

Posee una cavidad cuyo tamaño puede ser pequeña o mayor de la mitad del diámetro del fruto. Esta cavidad contiene las semillas que pueden ser muy numerosas o prácticamente no existir. La pulpa es de color amarillo anaranjado o rojizo, aromática, de sabor agradable y dulce. Es rica en agua, azúcares, vitaminas, minerales y sustancias colorantes (SEDERCOL, 2010).

Cuadro 2. Composición Química de la Fruta de la Papaya

Elemento	Cantidad
Agua	88.1%
Carbohidratos	9.8%
Fibra	0.8%
Proteína	0.6%
Ceniza	0.6%
Grasa	0.1%
Calorías	39 (100 gramos)

Fuente: Alfonso, 2010

1.2.2 La Papaína

La papaya contiene una enzima llamada papaína; que es un sulfhidrilo proteasa, que es una molécula formada por una cadena de 212 residuos de aminoácidos. La cual ayuda a la digestión de proteínas en el cuerpo (Propapaya, 2009).

La papaína es una enzima proteolítica (deshace las proteínas de los alimentos), cuya acción es similar a la pepsina que está presente en nuestro jugo gástrico, lo que le confiere sus beneficiosas propiedades digestivas. En afecciones tales como la gastritis, la pirosis o acidez, resulta muy adecuada ya que contribuye a neutralizar el exceso de acidez del estómago (Propapaya, 2009).

Industrialmente, la papaína es producida y comercializada por su empleo como ablandador de carnes, en la industria cervecera como clarificador, para el tratamiento de la lana y de la seda antes de la coloración textil (Propapaya, 2009).

1.3 Variedades de papaya

Debido a que el papayo se produce por semilla, se han desarrollado un gran número de variedades, empleándose en cada zona de cultivo las mejor adaptadas a sus condiciones climatológicas (SENASICA, 2012).

Solo. Es una variedad de tipo hermafrodita procedente de Hawái, la más conocida y sembrada a nivel mundial, por su calidad y tamaño de la fruta. Se produce en forma de pera, con un peso promedio de 450 gramos, con pulpa amarilla o rosada. Las mejores selecciones que se han cultivado son: Línea 5 y Línea 8, Línea 10, Kapoho y Masamuto Solo, Sunrise Solo y Waimanolo (Figura 6) (Arango *et. al*, 2000).



Figura 6. Papaya variedad Solo

Fuente: Ming y Moore, 2014

Maradol. Es una variedad hermafrodita originaria de Cuba, con dos selecciones de frutos con pulpa amarilla y roja. Es alargada, cilíndrica, de gran tamaño y puede llegar a pesar hasta 1 y 3 kg. Su piel es lisa y delgada, de color verde y se torna amarilla conforme va madurando. Su sabor es dulce aunque no tan intenso como las variedades Hawaianas (Figura 7) (SEDER de Colima, 2010).



Figura 7. Papaya variedad Maradol

Fuente: SEDERCOL, 2010

Cariflora. Es una variedad recientemente creada en la florida. Es un fruto de plantas hembras, son casi esféricas y de un peso entre 500 y 750 gramos. La pulpa es de color amarillo intenso, de buena calidad y sabor agradable. En Florida es citada como tolerante al virus de la mancha anular (Figura 8) (Arango *et. al*, 2000).

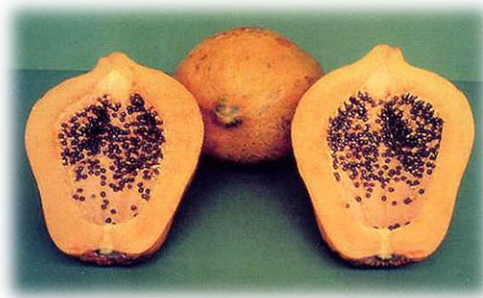


Figura 8. Papaya variedad Cariflora

Fuente: SEDER de Colima, 2010.

Sunrise. Es derivada de un cruce entre el Eshed rojo-fl línea 9 (variedad hawaiana o solo) y una línea de cría en solitario Eshed amarillo-fl llamado “Karilla”. Se trata de una papaya de alta calidad, tiene una carne blanda de color amarillo-naranja y tiene un peso de 425 a 625 gramos. Desde su lanzamiento ha sido popular entre los criadores como una línea ejemplar para el desarrollo de papayas híbridas en países como Taiwán y Malasia (Figura 9) (Ming y Moore, 2014).



Figura 9. Papaya Variedad Sunrise

Fuente: Ming y Moore, 2014.

Waimanalo. Esta variedad fue derivada de una cruce hecha entre la línea 5 y una línea enana de la Florida llamada “Betty” con la intención de crear una alta calidad en papayas. Estas papayas pesan entre 675 a 900 gramos y posee una forma más esférica que la “Solo” o “Sunrise”. Este híbrido se destaca por su resistencia relativa a la del hongo patógeno *Phytophthora palmivora*, su desventaja es que solo se cultiva en la región de Oahu, Hawai, por lo que solo se puede encontrar en esa región del mundo (Figura 10) (Ming y Moore, 2014).



Figura 10. Papaya Variedad Waimanalo

Fuente: Ming y Moore, 2014

1.3.1 Variedades de papaya en México

En México, se han cultivado diversas variedades como son: materiales criollos como el Cera, Coco y Mamey, Maradol, Solo, Tainung I y II, Amarilla; cultivares hawaianos como Red Lady y Cari. Actualmente en México, la variedad más importante es la papaya Maradol, las

primeras semillas de esta variedad se introdujeron a nuestro país en 1978, en Xalapa, Veracruz, esta variedad es muy atractiva para el consumidor, se ha destacado por su sabor y valores nutritivos, además, por sus excelentes cualidades de comercialización y la rentabilidad que ofrece al productor, por ello ha desplazado paulatinamente del mercado a los tipos criollos (SENASICA, 2012).

1.4 Producción mundial de papaya

El incremento de la cosecha de papaya ha sido espectacular durante la última década. Brasil e India han sido los países con mayor incremento porcentual, del 6% y 19% respectivamente. Se espera que la producción siga aumentando hasta 2014 y alcanzar los 13 millones de toneladas (FAOSTAT, 2014).

Cuadro 3. Principales países productores de papaya en 2013.

País	Producción (ton)
India	5,544,000
Brasil	1,582,638
Indonesia	871,275
Nigeria	773,000
México	764,514
República Dominicana	531,601.20
República Democrática del Congo	225,000
Tailandia	215,000
Venezuela	199,002
Cuba	197,482

Fuente: FAOSTAT, 2014

1.4.1 Producción de papaya en México

México es uno de los principales productores y exportadores de papaya “Maradol”, con un constante crecimiento en los mercados de Estados Unidos de América y Canadá (SAGARPA; INIFAP, 2010).

En el país existen 5 regiones representativas para la producción de papaya fresca. La región sur sureste se ubicó en primer lugar con un promedio de 577 mil toneladas, que representa el

79.41% de la producción nacional. Le sigue la región centro occidente con un promedio de 129 mil toneladas que representa el 17.59% del volumen. En tercer lugar se encuentra la región Noroeste que promedia 14 mil toneladas, lo que representa el 1.84% del volumen nacional. Cuarto lugar se encuentra la región centro con un promedio de 6 mil toneladas, lo que es el 0.77% nacional. Finalmente la región noroeste con un 0.40%, con 2 mil toneladas en promedio de producción (Figura 11) (Pro-papaya, 2009).

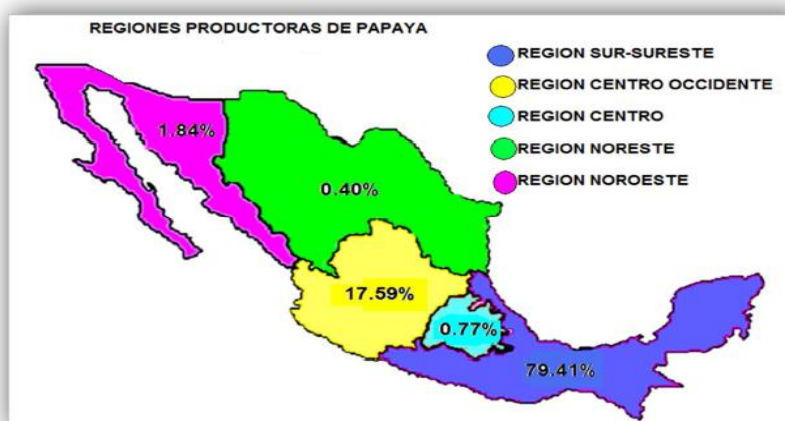


Figura 11. Regiones productoras de papaya en México

Fuente: Gutiérrez y Juárez, 2011

En México, un total de 20 entidades siembran papaya, sin embargo, 8 estados de la república mexicana son los más importantes en cuanto a la producción del frutal, estos son: Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Colima, Michoacán, Campeche y Jalisco (SENASICA 2012).

En el aspecto de producción, los estados de Oaxaca, Chiapas y Veracruz, concentraron el 59% del volumen nacional de papaya fresca producida en los años 2010, 2011, 2012 y 2013 (Cuadro 4) (SIAP 2014).

Cuadro 4. Principales productores de papaya por estado en México (miles de toneladas).

Producción agrícola de los años 2010 al 2013.

ESTADO	AÑO/PRODUCCIÓN (TON)			
	2010	2011	2012	2013
Oaxaca	116,957.61	113,705.25	122,690.75	213,116.75
Chiapas	115,048.00	140,721.50	147,942.40	153,990.48
Veracruz	91,044.96	115,058.50	121,676.20	102,944.20
Colima	51,375.25	59,134.31	82,391.00	89,967.49
Guerrero	46,604.75	45,180.30	45,601.46	42,470.07
Michoacán	48,687.62	45,147.26	42,777.64	35,368.63
Campeche	23,092.90	13,077.95	23,641.76	20,497.62
Jalisco	29,961.60	12,383.20	24,938.10	20,429.30

Fuente: SIAP, 2014.

1.5 Plagas y enfermedades

La producción de papaya se encuentra afectada por la presencia de enfermedades endémicas cuyo manejo es deficiente. Como consecuencia de ello, la producción y la calidad de la fruta disminuye (Acosta y Martínez, 2003).

1.5.1 Enfermedades

Estas enfermedades han sido reportadas por todas las regiones tropicales y subtropicales en el mundo (Calderón y Cepeda, 2002).

- **Mancha Anular de la Papaya (PRSV)**

Esta enfermedad es una de las más destructivas en el cultivo de la papaya. Los primeros síntomas observados son amarillez y aclaramiento de las venas en las hojas jóvenes. Más tarde se observa un moteado amarillo muy pronunciado y formación de bolsillos en las hojas. En los tallos se observan rayas y anillos. La enfermedad toma su nombre de los síntomas observados en los frutos, donde se observan anillos de color verde oscuro, levemente hundidos. Los frutos se deforman y las hojas se quedan pequeñas. La planta en general no crece.

Este virus es diseminado por áfidos. No se ha probado su transmisión a través de la semilla. La infección puede ocurrir rápidamente cuando las siembras están cercanas a otras siembras que tienen la enfermedad y donde hay altas poblaciones de áfidos y técnicas de control deficientes (Almodóvar, 2000).

- **Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*)**

Ataca principalmente en la época de floración y maduración de la papaya. En la flor se nota una mancha marrón que seca el cáliz y ocasiona la caída de la flor. En la fruta se notan puntos hundidos impregnados de agua con numerosas esporas de color rosado o de color salmón (Calderón y Cepeda, 2002).

- **Cogollo Racimoso de la Papaya (Buchy Top)**

El primer síntoma que se observa es un moteado leve de las hojas superiores. El crecimiento de los peciolos y las hojas se reduce y es de apariencia rígida, los entrenudos se acortan (Almodóvar, 2000).

- **Declinamiento bacterial (*Erwina* sp.)**

Sus síntomas en el follaje son la hoja colgando y lesiones angulares. En el tallo, lesiones acuosas bien definidas. En el fruto, se presentan pequeñas lesiones acuosas en la epidermis de los frutos verdes y en estado bien avanzado estas lesiones se hunden. Ya avanzada, causa la muerte de la planta al quebrarse el tallo por la lesión o la caída total de las hojas (Calderón y Cepeda, 2002).

- **Pudrición de la raíz y del fruto por *Phytophthora***

Esta enfermedad es causada principalmente por *Phytophthora palmivora*. El hongo ataca principalmente las raíces laterales y la enfermedad se extiende entonces a la raíz principal y todo el sistema de raíces se observa de color marrón. Los árboles se estancan y las hojas se ponen amarillas y se ven colgando alrededor del tallo. (Almodóvar, 2000).

- **Pudrición Interna del fruto**

Esta enfermedad ocurre cuando uno o más hongos infectan la cavidad donde se encuentra las semillas. Los hongos comúnmente encontrados son *Cladosporium sp.* y *Fusarium sp.* Una vez dentro del fruto el hongo penetra la semilla, la cual seca y oscurece, el tejido infectado se observa acuoso al principio, pero en las etapas finales de la infección toma un color negro y apariencia firme (Almodóvar, 2000).

- **Pudrición Interna del fruto**

Esta enfermedad ocurre cuando uno o más hongos infectan la cavidad donde se encuentra las semillas. Los hongos comúnmente encontrados son *Cladosporium sp.* y *Fusarium sp.* Una vez dentro del fruto el hongo penetra la semilla, la cual seca y oscurece, el tejido infectado se observa acuoso al principio, pero en las etapas finales de la infección toma un color negro y apariencia firme (Almodóvar, 2000).

1.5.2 Plagas

- **Ácaros (*Tetranychus urticae*)**

Son pequeños y difíciles de ver, hasta que son abundantes y el daño es visible. Causan la caída prematura de las hojas, reducen el vigor del árbol y causan imperfecciones externas sobre la superficie de la fruta (Figura 12) (Calderón y Cepeda, 2002).



Figura 12. *Tetranychus urticae*

Fuente: Vinetur, 2010.

- **Áfidos o pulgones (*Aphis spp. Myzus persicae*)**

Son alados, de color verde, amarillos o negros. Se alimentan de la savia extraída del envés de la hoja; son importantes debido a que son vectores de enfermedades virosas como la mancha anillada (Figura 13) (Calderón y Cepeda, 2002).



Figura 13. *Aphis spp. Myzus persicae*

Fuente: Agrológica, 2007.

- **Lorito verde (*Empoasca spp.*)**

Son de forma de cuña, la hoja presenta un moteado blancuzco y encorvamiento hacia el envés. Se alimentan de la savia en el envés de las hojas. También pueden ser transmisores de virus (Figura 14) (Calderón y Cepeda, 2002).



Figura 14. *Empoasca spp*

Fuente: Vinetur, 2010.

- **Mosca Blanca (*Trialeurodes variabilis*)**

Se presenta en colonia, especialmente en el envés de las hojas jóvenes; se alimentan de la savia de las hojas, deformándolas; son transmisoras de virus (Figura 15) (Calderón y Cepeda, 2002).



Figura 15. *Trialeurodes variabilis*

Fuente: UF, 2004.

- **Mosca de la papaya (*Toxotrypana curvicauda*)**

Ataca las frutas que están en formación (sus primeros 30 días). La mosca pone los huevos dentro del fruto recién formado; las larvas se alimentan de la semilla y la pulpa del fruto, el que ya afectado generalmente cae al suelo (Figura 15) (Calderón, 2002).



Figura 16. *Toxotrypana curvicauda*

Fuente: Vinetur, 2010.

1.6 Organismos Genéticamente Modificados.

La Biotecnología es una actividad multidisciplinaria sustentada en el conocimiento básico generado en diferentes disciplinas (biología molecular, ingeniería bioquímica, genómica, bioinformática, ingeniería de proteínas, entre las más importantes) y que tiene un impacto importante en sectores como los de la salud, alimentos, agrícola, pecuario, control de la contaminación y el marino (Bolívar, 2003).

De acuerdo a la ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados, un OGM: “Es cualquier organismo vivo, con excepción de los seres humanos, que han adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna que se define en esta ley, siempre que se utilicen técnicas que se establezcan en esta ley o en las normas oficiales mexicanas que deriven de la misma” (Cámara de Diputados, 2005).

Los organismos genéticamente modificados (OGM) son productos que se obtienen mediante ingeniería genética, y productos de ADN recombinante (ADNr), cuyo material genético ha sido manipulado mediante la incorporación de un gen que exprese un rasgo deseable. El uso de OGM para mejorar el rendimiento del cultivo y reducir los gastos de producción se inició a mediados de la década de los 90. Desde entonces, una amplia variedad de rasgos se han expresado a través de la biotecnología moderna, incluyendo rasgos que ayudan en el crecimiento de las plantas y los que se supone son en beneficio para los consumidores (Rabiei y Sardari, 2014).

Son muchas las variedades de plantas transgénicas aprobadas que se consumen como alimento y que han permitido una reducción importante de las cantidades de pesticidas químicos que se utilizan para eliminar plagas (muchos de estos carcinogénicos y recalcitrantes) y virus. Hoy más de 134 millones de hectáreas se cultivan con plantas transgénicas en 27 países, los organismos transgénicos y sus productos se consumen en más de 50 países hasta ahora por más de 300 millones de habitantes (Bolívar, 2011).

1.6.1 Papaya genéticamente modificada.

El cultivo de papaya se ve afectada por el número de enfermedades causadas por diversos patógenos y virus. Hoy en día la enfermedad más destructiva de la papaya en todo el mundo es la mancha anular de la papaya causada por el virus de la mancha anular de la papaya (PRSV, siglas de papaya Ringspot Spotty Virus) de tipo P. PRSV se agrupa en dos tipos, donde tipo P (PRSV-P) infecta cucurbitáceas y papaya, mientras que el tipo W (PRSV-W) solo infecta a las cucurbitáceas, ambos virus son transmitidos por áfidos (Jayavalli *et al.*, 2015).

Esta enfermedad reduce el rendimiento y calidad de la fruta, debido a la presencia de clorosis, los síntomas más notorios son: La deformación o atrofia de las hojas, la aclaración de la nervadura, anillos de color verde oscuro en los frutos y la pérdida de hojas. (Scotto, 2010).

El PRSV fue descubierto en Hawai en los años 40. Una década más tarde, destruyó gran parte de la producción de papaya de la isla hawaiana de Oahu. El zarpazo del virus y las enormes pérdidas que había provocado animaron a varios expertos a investigar en las posibles soluciones (Cartón, 2002).



Figura 17. Papaya infectada de mancha anillada de la papaya (VMAP)

Fuente: Scotto, 2010.

Para erradicar este problema hay cuatro principales estrategias de control: 1) Cuarentena y desplazamiento geográfico. 2) Raleo y de compensación. 3) De protección cruzada, 4) De resistencia transgénica. La resistencia transgénica es por mucho la forma más eficaz para proteger las plantas contra las infecciones virales incluyendo el PRSV (Wentao *et al.*, 2014).

A finales de la década de los 80 iniciaron un proyecto de investigación para desarrollar un tipo de papaya modificada genéticamente utilizando el nuevo concepto de “resistencia derivada del patógeno”. Mediante este procedimiento, se consiguió una línea de papaya transgénica (55-1) que mostraba resistencia al virus (Cartón, 2002).

A partir del año 1995 se empezaron a producir variedades de papayos transgénicos denominados “Rainbow” y “SunUp”. Ambas presentaban mayor resistencia que las demás variedades frente al ataque del virus de la mancha anillada de la papaya. Una vez que fueron liberadas las variedades transgénicas, la industria de la papaya lentamente incrementó su producción, la disponibilidad de estas variedades rescató a la agroindustria y mejoró el empleo para los pequeños productores de papaya. Estas variedades poseen resistencia contra PRSV y contienen el promotor CaMV 35S. Es así, que algunos países en vías de desarrollo donde ya se han realizado investigaciones para la obtención de papaya transgénica así como su identificación y detección para segregarlos de los no transgénicos desde hace muchos años son: Guatemala, Venezuela, México, Jamaica, Filipinas y Brasil, comprobaron que las plantaciones de papayas transgénicas tienen un impacto limitado en los microorganismos del suelo comparado con las plantaciones no transgénicas. Se concluyó que los genes insertados en las líneas de papaya transgénica, no da lugar a efectos nocivos ni posee un impacto significativo sobre los organismos no diana, incluidas las amenazas y especies en peligro de extinción o de organismos benéficos (Scotto, 2010).

Las papayas transgénicas resistentes a PRSV son diseñadas con el gen de la proteína cubierta (CP) que se ha comercializado en Hawai desde 1998, lo que representa la primera cosecha de la fruta transgénica comercializada. Esta papaya ha revolucionado a la industria de la papaya en Hawai. Por su parte en China hay otra variedad designada Huanong No. 1, contiene el PRSV replicasa (*NIb* gen). Esta nueva variedad fue producida comercialmente en la provincia de Guangdong por el gobierno chino en 2006 (Wentao *et al.*, 2014).

1.6.2 Creación de plantas transgénicas

La modificación genética de las plantas, con el propósito de obtener un cambio útil desde el punto de vista alimentario, consta de dos procedimientos de transferencia de ADN:

- **Utilización de Vectores**

Un vector suele ser habitualmente un plásmido, es decir un fragmento de ADN no cromosómico (libre en el citoplasma), dotado de capacidad de replicación autónoma, que suelen ser habituales en el genoma de muchas bacterias. Algunos de éstos plásmidos llevan genes que codifican para caracteres de mucho interés. En *Agrobacterium tumefaciens*, (una bacteria que suele encontrarse en el suelo), aparece un plásmido denominado “Ti” (“inductor de tumores”) y cuando la bacteria infecta la planta, se forman tumores que suelen ser muy evidentes en plantas dicotiledóneas (legumbres).

La particularidad de este plásmido reside en que posee un fragmento denominado T-ADN que le permite transferirse, debido a las características de las secuencias flanqueantes (las partes del ADN que limitan con el fragmento movilizable). Durante el proceso de transgénesis, el T-ADN se sustituye por el gen deseado (transgén) (Rodríguez *et al.*, 2003).

- **La transferencia directa del gen (o genes)**

Desde un organismo a otro distinto mediante varios métodos:

Biobalística (o Biolística): Es un procedimiento muy utilizado, sencillo y barato, que permite en la práctica el bombardeo de una célula con fragmentos del gen que interesa introducir mediante el uso de aparatos denominados “cañones de genes”, aunque poseen limitaciones (Rodríguez *et al.*, 2003).

Transformación de protoplastos: Sólo es aplicable en el caso de plantas que puedan regenerarse a partir de protoplastos (células sin pared externa). Para introducir el ADN pueden aplicarse métodos químicos, físicos (mediante electroporación) o puede realizarse la fusión de los protoplastos con gotas de grasa denominadas liposomas, que llevan en su interior el gen deseado (Rodríguez *et al.*, 2003).

Microinyección directa de ADN: Es un procedimiento poco útil pues solo puede trabajarse con una célula por experimento y precisa de personal muy calificado (Rodríguez *et al.*, 2003).

Producción de plantas genéticamente modificadas mediante el uso de vectores

Como se ha señalado anteriormente se utilizan plásmidos de origen bacteriano, de la bacteria vegetal *Agrobacterium tumefaciens*, que porta el plásmido Ti (figura 18). La particularidad de este plásmido reside en que posee un fragmento denominado T-ADN que le permite movilizarse (transferirse), debido a las características de las secuencias flanqueantes (las partes del ADN que limitan con el fragmento movilizable). Durante el proceso de transgénesis, el T-ADN se sustituye por el gen deseado (transgén) (Rodríguez *et al.*, 2003).

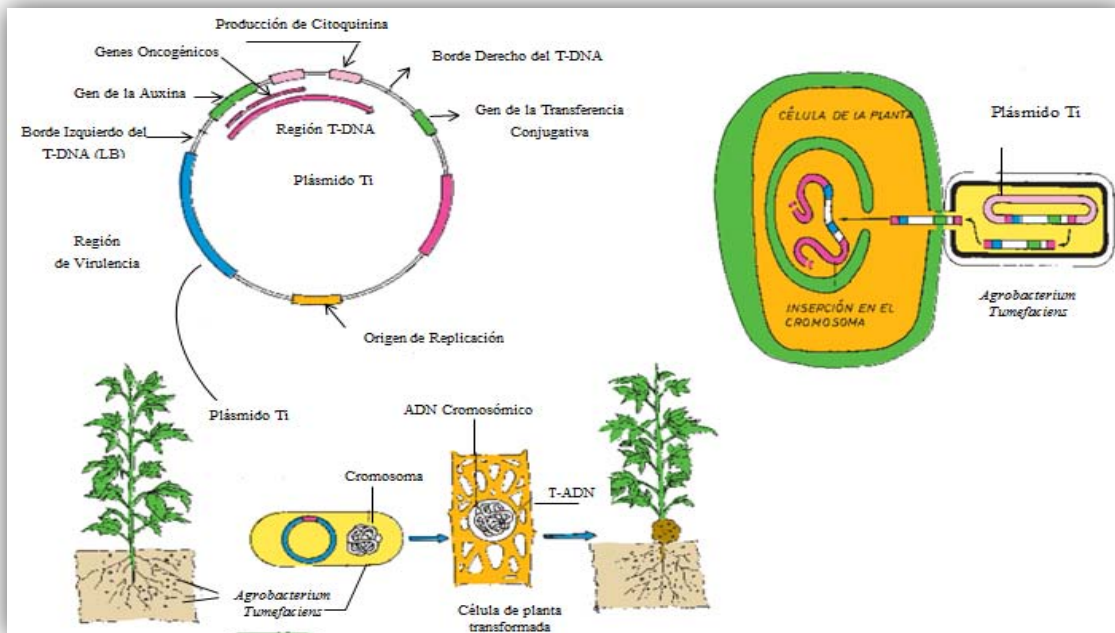


Figura 18. Obtención de plantas transgénicas mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Fuente: Rodríguez *et al.*, 2003.

En el ADN del plásmido, junto al transgén de interés, se introducen también uno o dos genes que codifican resistencia a antibióticos. Esa característica, que pasa igualmente al OGM, permite su selección cuando las hojas transformadas se colocan en un medio que contiene los antibióticos en cuestión, pues sólo ellas sobrevivirán, mientras que las plantas no transformadas son eliminadas por la acción del antibiótico. La producción de plantas transgénicas mediante el uso de vectores se ha utilizado mucho en plantas dicotiledóneas (ejemplo: en el brócoli) (Rodríguez *et al.*, 2003).

Producción de plantas transgénicas mediante transferencia directa del ADN

El sistema de transferencia directa de ADN es un procedimiento más versátil. Es útil en plantas monocotiledóneas. Incluyendo todo tipo de cereales (arroz, trigo, maíz, centeno, cebada, etc.) y además admite la transferencia tanto de ADN simple como incorporado a un vector. Pueden utilizarse tres métodos principales:

- a) Cañón de genes (Biolística o biobalística): El sistema utiliza un dispositivo que permite, primero, precipitar los genes (es decir, el ADN de interés, que está flanqueado por un fragmento que codifica una resistencia antibiótica) con micropartículas de oro o de tungsteno formado microbolitas metálicas recubiertas con el transgén, con las que luego se bombardean las células vegetales consiguiéndose la penetración de algunas de ellas. Más tarde, las células transformadas (en las que se ha llevado a cabo la recombinación) se seleccionan en un medio que contiene los antibióticos para los que ellas son ahora resistentes, mientras que las células no transformadas no son capaces de crecer y mueren por acción de estas sustancias. El sistema ha sido utilizado en la producción de cereales transgénicos como el trigo o el maíz, además en otros tipos de vegetales y cultivos como álamo, arándano, caña de azúcar, papaya, soja o tabaco.
- b) Transgénesis mediante electroporación: Se trata de un procedimiento que utiliza descargas eléctricas para producir pequeños poros en la pared de la célula vegetal que permiten la entrada del transgén. También se puede conseguir la entrada de ADN y transformación celular, mediante el uso de liposomas (gotas de lípidos que actúan como vehículos del transgén). Por este procedimiento se han conseguido cultivos transgénicos de arroz, soja, cítricos, fresa, maíz, tabaco.
- c) Transgénesis mediante microinyección: Es el procedimiento de uso más restringido, tanto por su dificultad de ejecución como por las exigencias operativas. Utiliza un capilar de vidrio con el que se transfiere directamente el ADN a una célula receptora. Se ha utilizado en la obtención de soja y arroz transgénicos (Rodríguez *et al.*, 2003)

Caracteres deseados en las plantas genéticamente modificadas

La construcción de este tipo de plantas permite desarrollar nuevas variedades de cultivo con nuevas características de interés.

Con las nuevas técnicas se han obtenido plantas resistentes a organismos perjudiciales y por lo tanto más productivos y se están desarrollando nuevas variedades que resulten más nutritivas (Sociedad Española de Biotecnología, 2000).

Plantas resistentes a microorganismos patógenos

Resistentes a virus: Se ha seguido la estrategia de introducir un gen (o varios) del propio virus agresor contra el que se pretende crear resistencia o incluso de virus próximos relacionados, que actúa como vacuna. Así, se han transformado plantas como el tabaco, tomate, alfalfa, papa y arroz, haciéndolas resistentes a determinados virus de interés (Rodríguez *et al.*, 2003).

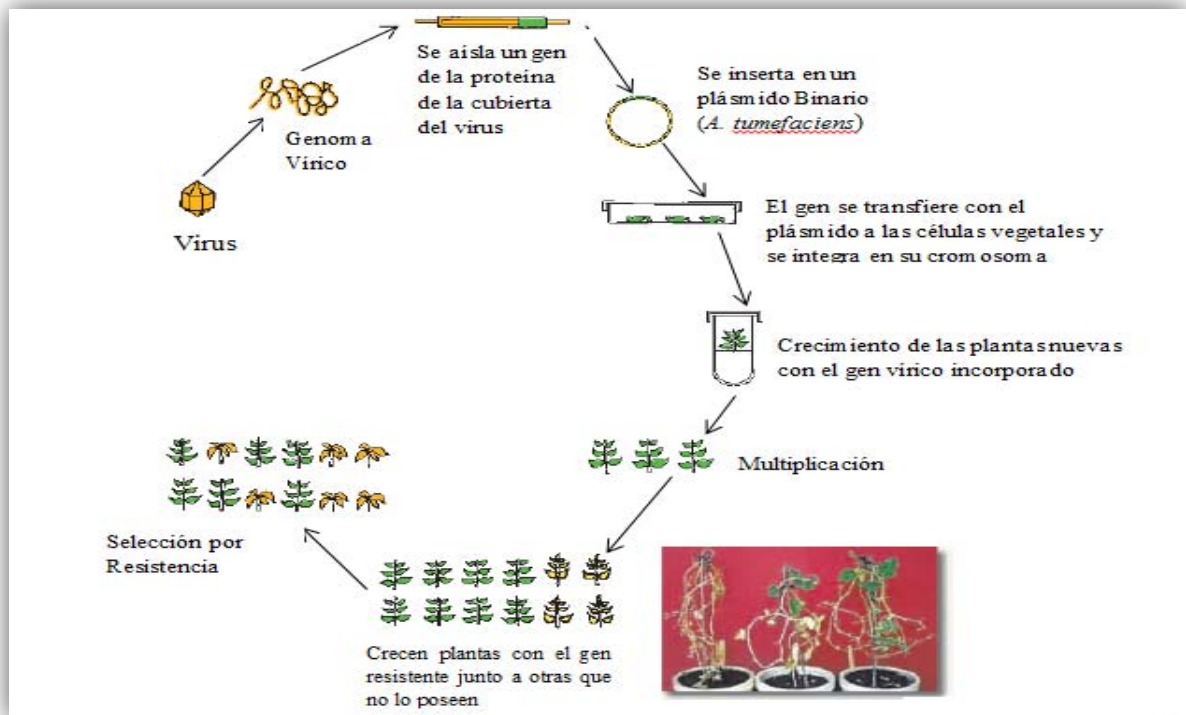


Figura 19. Procedimiento de obtención de plantas transgénicas resistente a virus

Fuente: Rodríguez *et al.*, 2003.

Plantas resistentes a bacterias: Al igual que antes, la transformación de células vegetales por la entrada de genes procedentes de otras plantas e incluso de insectos o de animales, permite la expresión de proteínas (como la cercopina B o la sarcotoxina, etc.) que confiere resistencia a algún tipo de bacteria.

Plantas resistentes a hongos: Se sigue la misma estrategia y mediante genes de distintas procedencias se introducen genes capaces de expresar proteínas (denominadas proteínas de respuesta) con actividad enzimática que degradan la pared del hongo y provocan su muerte. También se han ensayado genes capaces de producir proteínas con acción tóxica para los hongos, como es el caso de tioninas u osmotinas.

Plantas resistentes a insectos: El ataque por insectos representa uno de los aspectos más importantes del cultivo vegetal. Son numerosas las plagas de todo tipo de plantas producidas por las fases larvarias de muchos insectos o por los individuos adultos. Su interés es enorme desde el punto de vista económico y social en países subdesarrollados.

Se han utilizado genes de bacterias que expresan proteínas que resultan tóxicas para los insectos. También se ha utilizado genes de plantas que expresan proteínas inhibidoras de enzimas digestivas de los insectos (proteasas y amilasas).

De igual forma se pueden obtener plantas resistentes a insectos incorporando genes que dan lugar a proteínas que inhiben enzimas digestivas de los insectos. Así se han conseguido plantas de tabaco y arroz resistentes a insectos.

Plantas resistentes a herbicidas: Las malas hierbas son un factor negativo en la producción vegetal de muchísima importancia económica, se ha estimado que el 10% de las cosechas a nivel mundial se pierden por la contaminación de los cultivos vegetales con malas hierbas

1.6.3 Promotores y Terminadores

Para la transformación de plantas genéticamente modificadas se han insertado secuencias promotoras y terminadoras que permitan a la planta expresar el gen de interés. Uno de los promotores más utilizados es el virus mosaico de la coliflor (CaMV).

El promotor 35S CaMV es un promotor funcional, bien caracterizado y constitutivamente expresado. Por lo que se ha incorporado en numerosas construcciones y utilizado para producir muchos de los cultivos transgénicos que se encuentran en la producción comercial, tales como maíz, soja, canola y papaya. Del mismo modo el sitio de poliadenilación de ARN (que indica el final de la transcripción) de la secuencia de *Agrobacterium tumefaciens*, el gen de la nopalina sintasa (T-nos) ha servido como un sitio de poliadenilación en algunas de las mismas construcciones (Holden *et al.*, 2009).

La primera generación de organismos genéticamente modificados, (con la mayoría de los actuales) que son comercializados, fueron producidos mediante la tecnología enzimática de cortar y pegar. En estos OGM la característica deseada en el gen se combina con promotores y elementos de terminación universalmente funcional como el virus mosaico de la coliflor (CaMV) 35S, el promotor (P35S), terminador (T35S), promotor de la nopalina sintasa (P-nos) y el terminador (T-Nos) derivada de *Agrobacterium tumefaciens* (Holst, 2012).

El promotor CaMV 35S es el más utilizado para transformaciones de plantas. Es eficaz en conducir la expresión del transgén en ambos dicotiledóneas y monocotiledóneas. En general, se considera que es un promotor constitutivo, sin embargo, algunos informes sugieren que no se expresa en todos los tipos de células y tejidos (Sunilkumar, 2002).

1.6.4 Regulación Internacional de Organismos Genéticamente Modificados

Las nuevas aplicaciones biotecnológicas proyectan un aporte positivo frente a las crecientes demandas de necesidades alimenticias de la población mundial. Pero al mismo tiempo, científicos y empresarios advierten que el avance de la ciencia, no sólo ofrece beneficios a la sociedad, sino que también plantea riesgos de orden ético, ambiental y sanitario (Larach, 2001).

Lo anterior ha permitido a través de discusiones y procesos de revisión por expertos, la creación de acuerdos internacionales, como legislaciones nacionales para el manejo de los OGM. El protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología es un acuerdo internacional que se centra en regular el movimiento transfronterizo de Organismos Genéticamente Vivos Modificados entre los países que son parte del protocolo. Las negociaciones de este tratado internacional iniciaron en el año de 1995. Su contenido fue

adoptado el 29 de enero del 2000 como un acuerdo suplementario del convenio sobre la diversidad biológica. México rectificó el protocolo de Cartagena por acuerdo del senado de la república en 2002. El protocolo entró en vigor el 11 de septiembre de 2003. (CIBIOGEM, 2015).

El objetivo del protocolo es contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización seguras de los organismos vivos modificados resultantes de la biotecnología moderna que puedan tener efectos adversos para la conservación de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana, concentrándose concretamente en los movimientos fronterizos (SCDB, 2000).

Después de varios años de negociaciones, se completó un acuerdo internacional conocido como Protocolo de Nagoya-Kuala Lumpur sobre Responsabilidad y Compensación suplementario al Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de Biotecnología este fue adoptado en Nagoya, Japón, el 15 de Octubre de 2010 en la quinta reunión de la Conferencia de las partes que actúa como reunión de las partes en el protocolo.

Con el Protocolo suplementario se adopta un enfoque administrativo para proporcionar medidas de respuestas en aquellos casos en que haya daños o probabilidad suficiente de daños a la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica como resultado de organismos vivos modificados cuyo origen provenga de movimientos transfronterizos.

Al igual que el tratado precursor, el Protocolo de Cartagena sobre la Seguridad de la Biotecnología, la adopción del Protocolo de Nagoya –Kuala Lumpur Suplementario está siendo vista como el desempeño de una función con la que por un lado se impiden daños y por otro lado se ofrecen medidas de creación de confianza en el desarrollo y aplicación de la biotecnología moderna. Con esto se adelanta aún más el entorno favorable a la obtención de los máximos beneficios del potencial de los organismos vivos modificados proporcionando normas de compensación o medidas de respuesta en caso de que algo no vaya por buen camino y se produzcan, o haya probabilidad de daños a la diversidad biológica.

El objetivo de este Protocolo Suplementario es contribuir a la conservación e utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana, proporcionando normas y procedimientos internacionales en la esfera de la responsabilidad y compensación en relación con los organismos vivos modificados. (SCDB, 2011).

1.6.5 Legislación y regulación nacional de OGM

Las plantas genéticamente modificadas tuvieron su primera incursión formal en el campo mexicano en 1988, año en el que se presentó ante la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) la primera solicitud para importar y liberar en campo, (específicamente en el área de Culiacán, Sinaloa.) fue el tomate, con la característica de resistencia a insectos, esta fue aprobada y dio pauta para iniciar la formación de un grupo de expertos que apoyaran al sector oficial en la toma de decisiones sobre futuras solicitudes de experimentación de estos productos. (SENASICA, 2015).

Es por ello que la utilidad de las aplicaciones de la biotecnología moderna, en particular de los cultivos genéticamente modificados (GM) promovió la creación de un marco legal que permite el aprovechamiento sustentable de los mismos mediante un manejo seguro y responsable. Así en México, se elaboró durante más de 10 de años de discusión, aportes de los distintos actores involucrados, entre los que se encuentran legisladores, servidores públicos así como representantes de la academia de la sociedad civil organizada de la cadena agroindustrial, uno de los marcos regulatorios más rigurosos a nivel mundial para poder incorporar estas tecnologías innovadoras a la producción agrícola nacional (Agrobio, 2012).

El marco regulatorio está conformado por cuatro instrumentos básicos:

1. Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la Biotecnología (Protocolo de Bioseguridad): Garantiza un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización seguras de los organismos vivos modificados, resultantes de la biotecnología moderna y previniendo cualquier efecto adverso para la conservación y uso sostenible de la diversidad biológica, considerando los riesgos para la salud humana. (Agrobio, 2012).

2. Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM): Garantiza un nivel adecuado y eficiente de protección al ambiente de la salud humana, del medio ambiente y la diversidad biológica, así como de la sanidad animal, vegetal y acuícola, respecto de los efectos adversos que pudieran causarles la realización de actividades con organismos genéticamente modificados. Define los objetivos y actividades para el manejo y aprovechamiento adecuados de OGM. Es decir, en materia de bioseguridad. Establece

mecanismos para la participación pública en aspectos de bioseguridad, materia de esta ley, incluyendo el acceso a la información, la participación de los sectores privado, social y productivo a través del Consejo Consultivo Mixto de la CIBIOGEM y la consulta pública sobre solicitudes de liberación de OGM al ambiente.

Esta ley prohíbe la liberación de OGM en zonas consideradas centros de origen y de diversidad genética, así como en áreas naturales protegidas. (Agrobio, 2012).

3. Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (RLBOGM): Contribuye al cumplimiento de las disposiciones de la LBOGM, estableciendo los procedimientos a seguir y requisitos a cumplir, para la solicitud de permisos y autorizaciones. Contiene el Régimen de Protección especial del maíz. (Agrobio, 2012).

4. Régimen de Protección Especial al Maíz: Establece las disposiciones jurídicas relativas a la bioseguridad necesarias para resolver las solicitudes de liberación de maíces GM: prevención, monitoreo, inspección, vigilancia y medidas de control.

Las autoridades competentes para la aplicación del marco legal son las siguientes:

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA): Analiza las solicitudes para evaluar posibles riesgos a la sanidad vegetal y, si aplica, expide permisos de liberación al ambiente de Organismos Genéticamente Modificados e impone las medidas de bioseguridad que considere necesarias.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT): Analiza las solicitudes para evaluar posibles riesgos al ambiente y a la diversidad biológica. También impone medidas de bioseguridad en los permisos de liberación de OGM.

Secretaría de Salud: Evalúa la inocuidad y expide autorizaciones para el uso o consumo humano directo de Organismos Genéticamente Modificados, incluyendo granos e insumos para procesamiento. De igual forma consideran OGM para consumo humano aquellos que sean para consumo animal y que puedan ser consumidos directamente por el humano. Este procedimiento se lleva a cabo a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

Secretaría de Hacienda y Crédito Público (SHCP): Inspecciona en aduanas que los OGM cuenten con los permisos o autorizaciones correspondientes para ingresar al país. De no ser así impide su entrada (Agrobio, 2012).

La primera norma para regular los OGM fue la norma oficial mexicana NOM-056-FITO-1995 por la que se establecieron los requisitos fitosanitarios para la movilización nacional, importación y establecimiento de pruebas de campo de organismos manipulados mediante la aplicación de ingeniería genética. Esta norma fue creada en 1995 por el Comité Nacional de Bioseguridad Agrícola (CNBA) (actualmente SEA). Surgió a partir de la necesidad de apoyar al sector oficial en la toma de decisiones relacionadas con OGM (Rodríguez y González, 2007).

Cuadro 5. Alimentos Transgénicos permitidos en México por autoridades gubernamentales

Cultivos GM	Autorizaciones para Consumo por COFEPRIS (7-02-14)	Permisos de Cultivo Etapa (año-inicial) por SAGARPA-SEMARNAT
Algodón	30	Comercial (2011)
Soya	18	Comercial (2012)
Maíz	67	Piloto (2011)
Trigo	----	Experimental (2012)
Alfalfa	2	Experimental (2013)
Jitomate y papa	3 y 3	Sin solicitudes para siembra
Canola, arroz y remolacha azucarera	7,1 y 1	Sin solicitudes para siembra

Fuente: Agrobio, 2015.

1.6.6 Cultivos genéticamente Modificados (GM)

Desde 1996 hasta 2011 el 47% de la superficie total de cultivos GM (160 millones de ha) es ocupado por la soya tolerante a herbicidas, que es además el atributo que ha hecho muy rentable este cultivo en varios países de América. Los maíces GM se cultivan ya en más de 50 millones de hectáreas, que se coloca como el segundo con mayor crecimiento en los últimos años después del algodón, EU y Brasil son los que más lo cultivan. El algodón está distribuido en casi 25 millones de ha en países que ahora son autosuficientes y exportadores de fibra como la India. La canola llega a más de 8 millones de ha, donde el país que más aumentado su cultivo es Canadá. La remolacha azucarera es también una especie ya en cultivos comerciales

en los EU como Canadá, caso similar ocurre con la alfalfa que se siembra en algunas regiones estadounidenses. Existen zonas aún pequeñas donde se siembran calabazas resistentes a virus; papaya resistente al llamado virus de la mancha anular, así como el inicio de siembras comerciales de álamo o chopo en China. Las primeras papas para uso industrial, comenzaron en Alemania y Suecia. (Agrobio, 2015).

China fue uno de los primeros países en producir cultivos transgénicos. Comenzó en 1992 y esta actividad ha llegado a ser importante en el país.

En Europa la situación es diferente. Las plantaciones transgénicas son de pequeña escala. España es importador de transgénicos, principalmente de maíz modificado; posee las mayores plantaciones experimentales de productos genéticos dentro de Europa, cuenta con más de 20 plantaciones experimentales y en 1999 fue el primer productor de maíz modificado, dedicando 10 mil hectáreas. En el 2000 las superficies plantadas disminuyeron en Europa, pero se sumaron dos productores, Rumania con soja y papas, y Bulgaria con maíz. Al comenzar 2001, el Parlamento Europeo aprobó la unificación de las diferentes normativas y autorizó la concesión de plazos y etiquetado (Larach, 2001).



Figura 20. Cultivos de Transgénicos los principales son soya, maíz y algodón hasta 2013

Fuente: Agrobio México, 2013.

Monsanto tiene el 80% del mercado de plantas transgénicas, seguida por Aventis (perteneciente a Bayer) con el 7%, Syngenta (antes Novartis) con el 5%, Dow el 3% y DuPont (Pioneer Hi-Bred). Estas empresas también producen el 60% de los plaguicidas y el 23% de las semillas comerciales. Las empresas multinacionales tratan de controlar la alimentación mundial, creando un gran oligopolio mundial, obteniendo grandes beneficios a costa de los agricultores, pequeños comerciantes y consumidores (Santamarta, 2004).

1.6.7 Debate de los alimentos genéticamente modificados

El debate internacional incluye controversias, sobre los beneficios y peligros que resultan del empleo de la nueva biotecnología en el sector agrícola. En el debate intervienen diferentes actores con puntos de vista no coincidentes sobre la manera de identificar y controlar el riesgo (Larach, 2001).

El debate en torno al uso de plantas modificadas genéticamente en la agricultura y la agroindustria continúa a buen ritmo, con la participación de una combinación de aspectos científicos, sociales y políticos. Existe diferencia de opiniones entre los gobiernos y los legisladores sobre los riesgos previsibles que los cultivos transgénicos pueden suponer para la salud humana y el medio ambiente.

Las principales especies de cultivos transgénicos son canola, maíz, algodón y soja, lo que el cultivo de estas se concentra en los países desarrollados, que dominan el comercio mundial de estos productos. Sin embargo, el interés en la producción de cultivos transgénicos está creciendo rápidamente en el mundo en desarrollo. Por el contrario la Unión Europea (UE) es negativo, los cultivos tienen que entrar en una regulación gubernamental (Marmioli *et al.*, 2008).

Actualmente, nos encontramos frente a la realidad del inevitable crecimiento de la población mundial, de disminución de tierras arables disponibles, de expansión de zonas urbanas, de una creciente necesidad de los consumidores por obtener una mejor calidad alimenticia y de una tendencia de los agricultores de producir más intensamente para satisfacer las necesidades presentes (Larach, 2001).

Aunque a la fecha no existen pruebas contundentes de daño a la salud humana por el uso y consumo de los organismos vivos o sus productos que hayan sido objeto de una modificación

genética empleando estas nuevas herramientas, no se descarta que impliquen riesgos (Bolívar, 2011).

Los intereses respecto al uso de estos cultivos son diversos y las posturas polarizadas asociadas a ellos van desde el rechazo definitivo hasta la absoluta aceptación. El problema radica en que no hay suficientes elementos de juicio fundado para adoptar alguna posición extrema, reconociendo que a los actores principales no les interesa que existan posiciones intermedias y quizás más objetivas acerca de este tema. (Acevedo *et al.*, 2009).

Los organismos transgénicos se diseñan y construyen con el propósito de generar una nueva capacidad del organismo receptor, misma que reside en el material genético transferido o transgén. El objetivo de una biotecnología moderna sustentable es llevar a cabo modificaciones genéticas diferentes organismos de la biodiversidad que permitan construir OGM que coadyuven en la solución de problemas en diferentes sectores, con la certeza de que estos organismos son seres vivos que se crean por procesos que ocurren cotidianamente en la naturaleza (Bolívar, 2011).

Al utilizar organismos transgénicos en la producción agrícola, se han comprobado mejoras de algunas características originales en la producción, una mayor resistencia a ciertos pesticidas o herbicidas y a enfermedades o plagas (virus, hongos, insectos y parásitos). Se ofrece una mejor adaptación de la producción a condiciones del medio ambiente, heladas, sequías y suelos, que con las técnicas tradicionales no se destacaban como favorables; se incrementa el nivel de nutrición y se incorpora un mayor contenido vitamínico, en minerales o proteínas; se reduce el contenido de grasa; se introduce mejoramientos en el sabor, color o textura de los alimentos, facilita su procesamiento y almacenamiento.

Los virus constituyen una de las principales dificultades que se presentan en todos los cultivos del mundo. Uno de los aportes de las modificaciones genéticas es la introducción de elementos que disminuyen el riesgo de infección y reducen el uso de sustancias químicas para el control de plagas. Sin embargo, otros señalan que esta resistencia actúa también como una amenaza a la diversidad biológica, porque los agricultores tienden a cultivar variedades de plantas genéticamente uniformes, o porque se afecta la conservación y/o se reduce la utilización de cosechas tradicionales (Massieu *et al.*, 2000).

Es importante tomar en cuenta el riesgo ecológico de las plantas y animales transgénicos. Al liberar organismos genéticamente modificados a gran escala, se saltan millones de años de

coevolución de las especies y los efectos ecosistemáticos son impredecibles, por lo que este tipo de organismos se han comercializado sin un etiquetado claro y distintivo, mezclando el grano transgénico con el grano convencional para evitar que el consumidor pueda elegir lo que compra y desconozca que el alimento consumido ha sido modificado genéticamente, ya que las empresas transnacionales tienen pánico a que se les obligue a etiquetar el producto clara y destacadamente (Martínez, 2008).

Otro resultado desfavorable es el desprendimiento de microorganismos en la tierra, los que pueden generar cambios bioquímicos e impactos en el equilibrio del ecosistema. Se suma el impacto negativo que aportan las cosechas transgénicas en la conservación de cultivos laterales tradicionales, o viceversa al polinizarlos con elementos modificados genéticamente y traspasarlos a nuevas generaciones de cultivos. Por otra parte, la biotecnología moderna ha desarrollado nuevos pesticidas y plaguicidas más potentes que colaboran al destruir las malezas, evitando que disminuya la productividad de los cultivos. Además, su aplicación destruye no sólo las malezas o plagas, sino también puede poner en riesgo otras plantas que son deseables para conservar la diversidad biológica (Massieu *et al.*, 2000).

Además, el cultivo de transgénicos puede provocar cambios socioeconómicos en los países menos desarrollados, al desplazar la mano de obra de una de sus principales actividades económicas. Cabe destacar que en estos países, una labor importante es el cultivo de alimentos básicos como el maíz, por lo que de producirse un desplazamiento de la mano de obra se puede poner en riesgo la fuente de subsistencia de una parte importante de la población (Massieu Trigo, 2000).

1.7 Métodos de análisis basados en la detección de proteínas

La detección de proteínas puede realizarse en muestras de alimentos frescos o procesados, siempre y cuando el procesamiento no haya afectado a las proteínas de la muestra. Por este motivo, las técnicas moleculares que suponen el manejo de proteínas son aplicadas en aquellos casos en los cuales se dispone de muestras con un contenido proteico en cantidad suficiente y con la calidad adecuada. Los métodos más utilizados en el análisis de proteínas para la trazabilidad alimentaria son ELISA, Western Blot (López *et al.*, 2003).

La técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay o ensayo ligado a enzima) detectan o miden la concentración de proteína de interés en una muestra que puede contener

numerosas proteínas distintas. Se utiliza un anticuerpo, fijado a un soporte, que se une específicamente a la proteína diana. Un segundo anticuerpo conjugado a una enzima genera un producto cuyo color es visible al añadir un sustrato determinado y es fácilmente cuantificable mediante una curva patrón de la proteína de interés.

Frente a las técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos (ADN), los análisis ELISA presentan menor sensibilidad y fiabilidad, siendo menos susceptible a originar resultados erróneos (“falsos negativos y falsos positivos”). Por otra parte, se necesita desarrollar previamente anticuerpos que reconozcan específicamente la proteína diana que se desea identificar. La única limitación tecnológica para utilizar este método como análisis rutinario es que se debe de conocer previamente que proteína concreta se busca en cada caso y se deben desarrollar anticuerpos frente a esa proteína. Estas técnicas que permiten cuantificación, están limitadas a alimentos no procesados (López *et al.*, 2003).

El método de Western Blot es un método altamente específico que suministra información cualitativa necesaria para determinar si una muestra contiene una cantidad de proteína por debajo o por encima de un nivel predeterminado.

Una de las ventajas que presenta la técnica de Western Blot consiste en su eficacia en la detección de proteínas insolubles, lo que genera una ventaja adicional en la identificación de especies. Los ensayos por esta técnica se realizan en condiciones desnaturizantes, es decir, en condiciones que provocan la ruptura de los enlaces que mantienen la estructura de la proteína, con el fin de evitar estos problemas (López *et al.*, 2003).

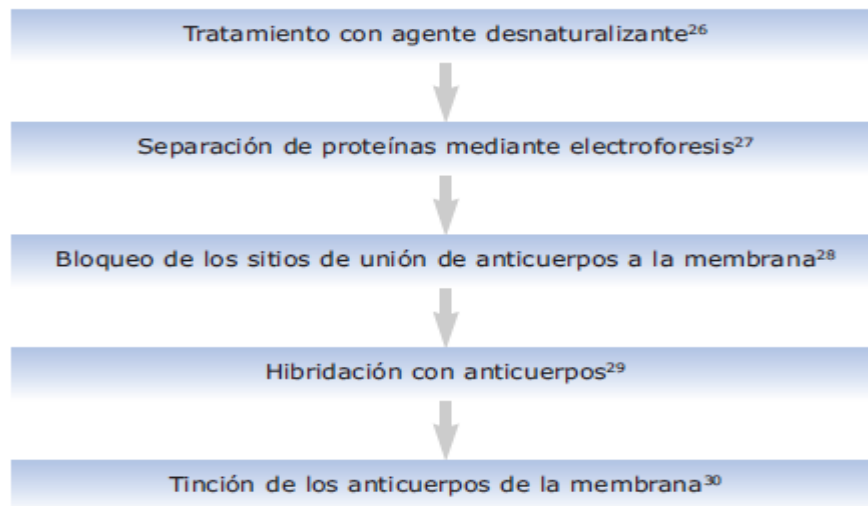


Figura 21. Esquema de funcionamiento de un Western Blot

Fuente: López *et al.*, 2003.

1.8 Análisis basados en la detección de ADN. Reacción en Cadena de la Polimerasa

Los métodos analíticos basados en la detección de ADN suelen emplearse cuando el alimento ha sido procesado o bien tratado fisicoquímicamente (calor, presión, etc.), ya que la proteína puede haberse desnaturado o degradado en el proceso, y los métodos analíticos de proteína se ven afectados por estos cambios.

El ADN, en cambio, puede haberse fragmentado durante el proceso en trozos pequeños pero ello no implica necesariamente que no puedan ser detectados. Aunque el ADN también se degrada durante la esterilización por calor en el proceso de enlatado de alimentos, aún es posible obtener pequeños fragmentos con suficientes diferencias de secuencia como para hacer posible la diferenciación entre especies cercanas.

Para la detección de ADN se utilizan dos técnicas, la técnica el Southern Blot y la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). La primera técnica tiene su principal aplicación en la confirmación de resultados obtenidos en la detección de transgénicos. La segunda técnica, es muy extendida tanto para la detección de transgénicos como en la identificación de especies (López *et al.*, 2003).

Las ventajas de los marcadores de ADN frente a los marcadores proteicos; es que el ADN es más termoestable que la mayoría de las proteínas, por lo que es menos susceptibles a ser degradado durante el procesamiento de los alimentos, aún degradado parcialmente permite

identificar diferencias; las técnicas con marcadores de ADN son más sensibles; por último están presentes en la mayoría de las células de un organismo, y en principio con la misma información independientemente del tejido (López *et al.*, 2003).

El método de Reacción en Cadena de la Polimerasa sirve para amplificar o aumentar la cantidad de ADN que se pretende detectar. La disposición de una cantidad suficiente de ADN es imprescindible para la obtención de resultados fiables (López *et al.*, 2003).

1.8.1 Fundamento de la técnica de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN (ácido desoxirribonucleico). El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores (oligonucleótidos o primer) para que una enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. Una vez complementada la reacción la cantidad fragmento amplificado se puede visualizar mediante técnicas sencillas de separación de fragmentos de ADN (Pérez, 2008).

1.8.2 Etapas de la Reacción

Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión.

Desnaturalización.

En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos; en el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas. (Figura 22) (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

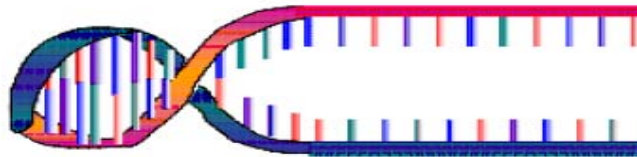


Figura 22. Desnaturalización del ADN

Fuente: Rodríguez y Barrera, 2004.

Hibridación

En esta etapa, los primers se alinean a la cadena sencilla en sitios específicos e hibridan con su secuencia complementaria, para que se formen pequeñas regiones de doble cadena, es importante que la temperatura de hibridación (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente. (Figura 23) (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

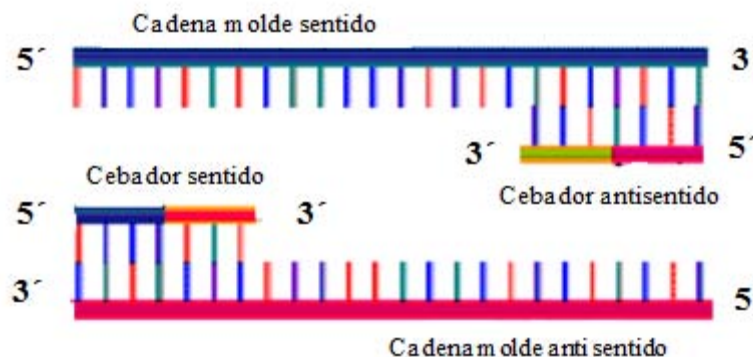


Figura 23. Inicio de la reacción de la PCR

Fuente: Rodríguez y Barrera, 2004.

Extensión

En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre la secuencia diana y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'.

La temperatura óptima para la reacción es de 72°C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador (Figura 24) (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

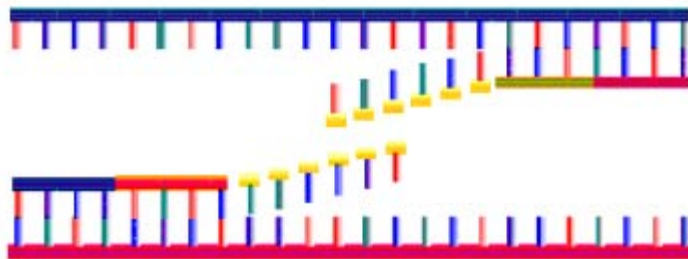


Figura 24. Progreso de la reacción de la PCR a la temperatura óptima del ADN

Fuente: Rodríguez y Barrera, 2004.

1.8.3 Componentes de la PCR

La ADN Polimerasa

Son enzimas que intervienen en la replicación del ADN. Son capaces de adicionar dNTP's a partir de la región 3' de un cebador y copiar una secuencia molde. Las polimerasas sintetizan el ADN en la dirección 5' a 3'. Ninguna ADN polimerasa conocida es capaz de comenzar una nueva cadena. Ella solo puede añadir un nucleótido en un grupo 3'-OH al cual puede añadir el primer nucleótido. Las ADN polimerasas requieren Magnesio como cofactor para ser funcionales (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

La Taq polimerasa de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* resiste los 94-96°C requeridos para la desnaturalización del ADN y solo es necesario añadirla en el comienzo del procedimiento de la PCR, por lo que ha reemplazado el uso del fragmento Klenow de *E. Coli*. (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

La temperatura óptima para la Taq polimerasa es de 72 °C, aun cuando puede ser observada una actividad significativa a temperaturas tan bajas como 55 °C.

Desoxynucleosidos trifosfatos (dNTP's) en exceso

Los dNTP's son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, por ello es importante que su concentración sea la adecuada ya que de lo contrario pueden afectar la función de la Taq polimerasa. Normalmente se utilizan a una concentración que oscila entre 0.2 a 1.0 mM (Tamay de Dios L, 2013).

Primers

Los oligonucleótidos iniciadores o primers son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN.

La selección de oligonucleótidos iniciadores es muy importante en la reacción en cadena de la polimerasa (Cortázar y Silva, 2004).

Cuadro 6. Criterios principales a considerar para la selección adecuada de primers

Tamaño	Tamaño ideal: 20-25 nucleótidos de longitud generalmente: 18-30 nucleótidos de longitud
Base en el extremo	Debe ser una G o una C
Temperaturas de Fusión (Tm)	50-65°C
Contenido Gc	40-60%
Auto-complementariedad	Debe ser evitada Para minimizar la formación de estructuras secundarias y los dímeros de primer
Similaridad	Debe tener un 100% de apareamiento con el molde

Fuente: Cortázar y Silva, 2004

Las concentraciones óptimas de los primers son generalmente entre 0.1 y 0.5 μ M. Altas concentraciones de primer pueden acumular producto no específico (Cortázar y Silva, 2004). El tipo de primer o cebador que se utilice en la PCR dependerá del tipo de identificación que se requiera, para ello se utilizan primers específicos. Si un primer es demasiado corto puede ser complementario a múltiples genes y puede unirse específicamente a una región inapropiada del ADN. Un primer debe de ser de por lo menos de 17 bases de longitud para evitar que se una a una región no deseada. Para una mayor estabilidad para la PCR generalmente son de 20 nucleótidos de longitud. El incremento en la longitud puede afectar la movilidad y el tiempo para unirse al ADN blanco (Reyna, 2000). Por lo general la cantidad de G-C no debe de ser más del 55% de la secuencia, si no se respetan éstas reglas, existe la posibilidad de la formación de dímeros de primers es decir, de productos inespecíficos. (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

1.8.4 Análisis del producto de una PCR

El hecho de que las moléculas de ADN obtenidas al finalizar la reacción en cadena correspondan efectivamente al fragmento de interés queda asegurado por la intervención de los primers que definen los extremos “derecho” e “izquierdo” de ese fragmento. Así, una vez que la reacción ha finalizado, el tamaño del fragmento multiplicado puede determinarse sometiendo los productos de la reacción a una electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, es decir, a un proceso de separación por difusión bajo la acción de un campo eléctrico.

Las muestras colocadas sobre el gel y sometidas a la acción de un campo eléctrico (electroforesis) migran de una manera característica que se puede visualizar por tinción (Coloreado) del ADN con bromuro de etidio, el cual actúa como intercalante y al ser analizado bajo la luz UV emite una fluorescencia naranja. (Cortázar y Silva, 2004).

Contaminación en la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica altamente sensible y específica, por lo que es muy importante evitar contaminaciones que puedan dar origen a la amplificación de ADN no deseado.

La contaminación con ADN extraño puede solucionarse con protocolos y procedimiento que separan las reacciones pre-PCR (mezcla de todos los componentes de la reacción), del ADN molde.

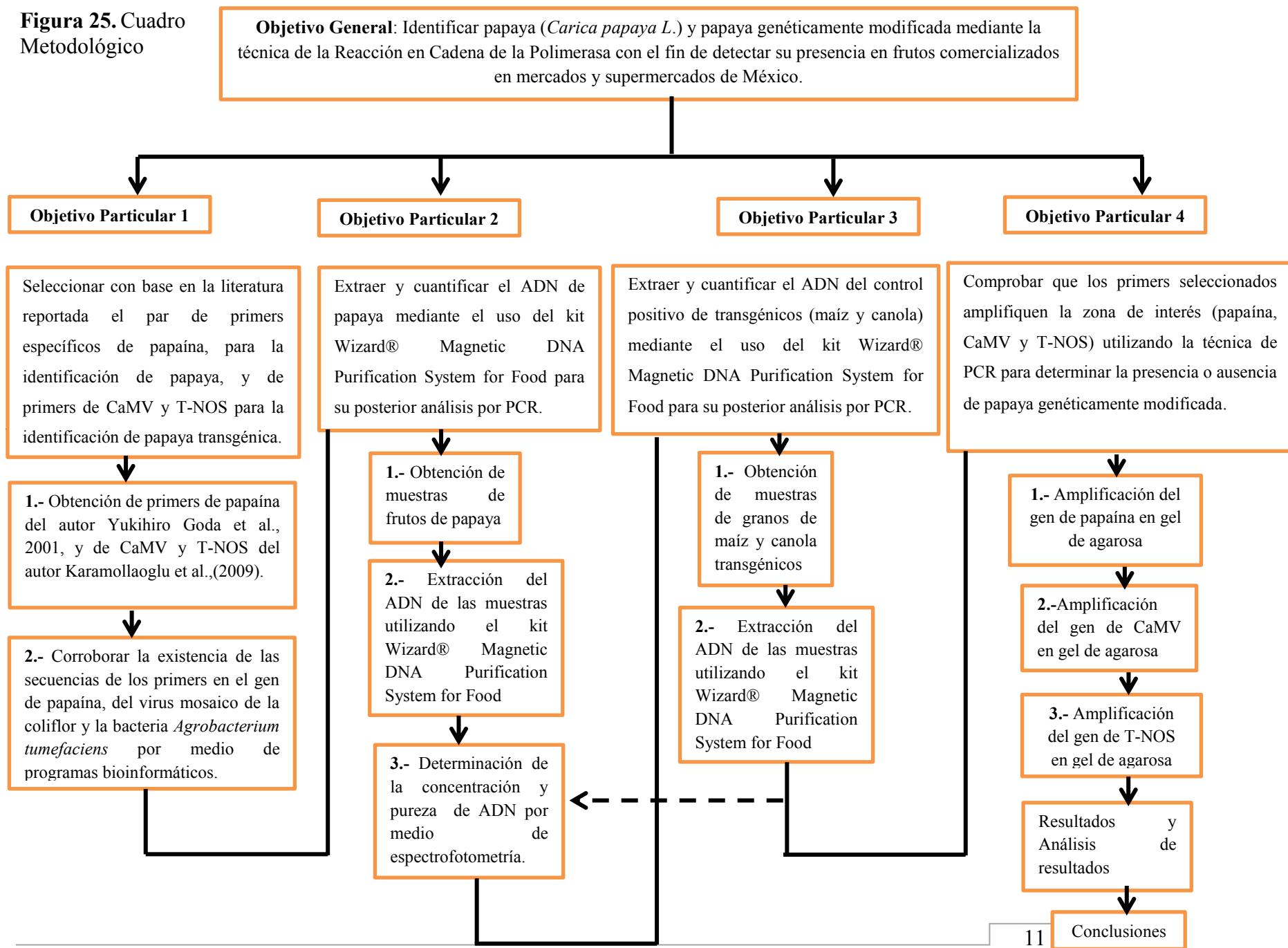
Esto normalmente implica la separación espacial de las áreas de la realización de la PCR de los análisis o purificación de los productos, así como la limpieza exhaustiva de la superficie de trabajo entre la realización de una PCR y el siguiente (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL



Figura 25. Cuadro Metodológico



2.1 Cuadro Metodológico

2.1.1 Descripción del cuadro metodológico

La metodología del trabajo se divide en 1 objetivo general y 4 objetivos particulares, con el fin de identificar la posible presencia de papaya genéticamente modificada en frutos comercializados.

- **Objetivo General**

Identificar papaya (*Carica papaya L.*) y papaya genéticamente modificada mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con el fin de detectar su presencia en frutos comercializados en mercados y supermercados de México.

- **Objetivo Particular 1**

Seleccionar con base en la literatura reportada el par de primers específicos de papaína, para la identificación de papaya, y de primers de CaMV y T-NOS para la identificación de papaya transgénica.

Actividad 1.- Obtención de los primers de papaína y los primers de CaMV y T-NOS.

Actividad 2.- Corroborar la existencia de las secuencias de los primers en el gen de papaína, del virus mosaico de la coliflor y la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* por medio de programas bioinformáticos.

- **Objetivo Particular 2**

Extraer y cuantificar el ADN de papaya mediante el uso del kit Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food para su posterior análisis por PCR.

Actividad 1.- Obtención de muestras de frutos de papaya

Actividad 2.- Extracción de ADN de las muestras reunidas, utilizando el kit Wizard® Magnetic DNA Purification system for food.

Actividad 3.- Determinación de la concentración y pureza de ADN por medio de espectrofotometría

- **Objetivo Particular 3**

Extraer y cuantificar el ADN del control positivo de transgénicos (maíz y canola) mediante el uso del kit Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food para su posterior análisis por PCR.

Actividad 1.-Obtencion de muestras de granos de maíz y canola transgénicos

Actividad 2.-Extraccion de ADN de los granos transgénicos utilizando el kit Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food

Actividad 3.- Determinación de la concentración y pureza de ADN por medio de espectrofotometría.

- **Objetivo Particular 4**

Comprobar que los primers seleccionados amplifiquen la zona de interés (papaína, CaMV y T-NOS) utilizando la técnica de PCR para determinar la presencia o ausencia de papaya genéticamente modificada.1.- Amplificación de la PCR a papaya sin procesar y productos comerciales derivados de la papaya

Actividad 1.- Visualizar por medio de electroforesis la amplificación de los fragmentos de secuencia de ADN de papaína, CaMV y T-NOS de las muestras empleadas para la realización de este trabajo.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Material biológico

Se trabajó con un total de 15 muestras de papaya maradol y 3 de papaya hawaiana, de las cuales 5 muestras de papaya maradol correspondían a productos comerciales que incluyera papaya y las 12 restantes junto con las 3 muestras de papaya hawaiana correspondían a papaya natural, la procedencia de las muestras se reporta en el cuadro 7

Cuadro 7. Muestras de papaya utilizadas en la experimentación

No. de muestra	Tipo de muestra	Procedencia
M1	Papaya maradol	Mercado San Antonio, Texcoco, Edo. De México.
M2	Papaya maradol	Tianguis, Texcoco, Edo. De México.
M3	Papaya maradol	Mercado de San Andrés, Chiautla, Edo. De México.
M4	Papaya maradol	Central de Abastos, Ecatepec, Edo. De México
M5	Papaya maradol	Mercado San Antonio, Texcoco, Edo. De México.
M6	Papaya maradol	Mercado de Jamaica, Distrito Federal.
M7	Papaya maradol	Mercado de San Juan, D.F.
M8	Papaya maradol	Central de Abastos, Iztapalapa, D.F.
M9	Papaya maradol	Mercado de Chiconcuac, Edo. De México.
M10	Gerber (papaya-manzana)	Wal-Mart
M11	Desayunos Escolares	Desarrollo Integral para la Familia (DIF)
M12	Papaya deshidratada en Cereal Fitnes	Wal-Mart
M13	Papaya maradol	Mercado del Carmen, Cuautitlán Izcalli, Edo. De México.
M14	Papaya deshidratada en Granola	Soriana
M15	Papaya deshidratada	Dulcería, tienda Liverpool
M16	Papaya Hawaiana	Chicago, Il., Estados Unidos
M17	Papaya Hawaiana	Mercado del Carmen, Cuautitlán Izcalli, Edo. De México.
M18	Papaya Hawaiana	Mercado del Carmen, Cuautitlán Izcalli, Edo De México.

2.2.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se usó el kit comercial “Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food.”

Cuadro 8. Materiales, equipos y reactivos empleados en la extracción de ADN

Reactivos	Materiales y Equipos
Lysis Buffer A, for Food	Agitador Vortex, Genie K-55-G
Lysis Buffer B, for Food	Juego de micropipetas, Rainin
Precipitation Solution, for Food.	Termoblock, thermomixer compact eppendorf.
Magenisil® Paramagnetic Particles. Isopropanol	Centrifuga
Etanol (70%)	Tubos de polipropileno de 15 mL
	Tubos eppendorf.
	Gradilla magnética de separación.

Metodología

1. Se trituró cierta cantidad de la muestra con ayuda del pistilo y el mortero
2. Se pesó 200 mg de muestra en la balanza analítica electrónica *Sartorius* y se colocó en un tubo Eppendorf estéril de 2000 μ L.
3. Se agregaron 500 μ L de Lysis Buffer A y 5 μ L de RNasa A y se agito en el Vortex
4. Se agregaron 250 μ L de Lysis Buffer B y se agitó en el Vortex por 10 a 15 segundos para mezclar correctamente y se incubó la muestra por 10 minutos a temperatura ambiente (22-25 $^{\circ}$ C).
7. Se adicionó 750 μ L de la solución de precipitación y se agito en el Vortex
8. Se colocó en la Microcentrifuga *MiniSpin Plus* durante 10 minutos a una velocidad de 10,000 rpm.
9. Se transfirió la fase líquida a un nuevo tubo Eppendorf.
10. Se agitó la solución de partículas “Magenisil® Paramagnetic” vigorosamente por 30 segundos.

11. Se adicionó 50 μL de la solución de partículas “Magenisil® Paramagnetic” a la fase recuperada y se agitó en el Vortex.
12. Se agregó 0.8 en volumen de isopropanol. Se invirtió el tubo de 10 a 15 veces para una mezclar y se incubo por 5 minutos a temperatura ambiente.
13. Se colocó el tubo en la gradilla de separación magnética *MagneSphere®* por 1 minuto. Dejando el tubo en la gradilla, se decantó la fase líquida.
14. Se retiró el tubo de la gradilla de separación magnética *MagneSphere®* y se agregó 250 μL de “Lysis Buffer B”, se invirtió el tubo de 2 a 3 veces para mezclarlo. Se colocó nuevamente en la gradilla de separación magnética durante 1 minuto y se decantó la fase líquida.
15. Se agregó 1000 μL de solución de lavado (etanol al 70 %) y se dejó el tubo en la gradilla de separación magnética durante 1 minuto, se retiró la fase líquida. Este paso se repite 2 veces más.
16. Se dejó secar en el “*Termoblok Termomixer compact*” durante 10 minutos a 65 °C.
17. Se adicionó 1000 μL de agua libre de nucleasas para suspender el ADN y se incubo por 5 minutos a 65 °C. Una vez terminado de incubar, el tubo se trasladó a la gradilla de separación magnética y se removió la fase líquida a un nuevo tubo.

2.2.3 Cuantificación de la concentración y pureza de ADN

Una vez obtenido el material genético, es importante determinar el rendimiento mediante espectrofotometría. La ley de Beer-Lambert indica que la concentración de una molécula en una solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Cuando la longitud de la celda en que se disuelve el ADN, es de 1 cm, la absorbancia es igual a la densidad óptica (DO). En el caso de ADN genómico o doble cadena, una densidad óptica equivale a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se debe considerar el factor de dilución para obtener la concentración en nanogramos/microlitro ($\text{ng}/\mu\text{L}$). Considerando que para una reacción de PCR se requiere de 10 a 200 ng debemos obtener al menos, 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de ADN en cada muestra, si se recuperaron 50 μL , el rendimiento neto de la extracción sería de 0.25 μg .

Concentraciones menores dificultan la estandarización de la PCR u otras técnicas. Para estimar la pureza del ADN se considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm.

Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la reacción es menor, indican la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol (Cornejo *et al*, 2014).

Reactivos

Cuadro 9. Reactivos, materiales y equipos utilizados durante la cuantificación de ADN

Reactivos	Materiales y Equipos
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Muestras de ADN del material biológico extraído ➤ Agua Libre de Nucleasas 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Espectrofotómetro, Abccesolab NanoDrop ND-1000 A113 ➤ Micropipeta ➤ Tubos eppendorf

Metodología

- 1.- Para calibrar el espectrofotómetro Accesolab Nanodrop ND-.1000 A-113, se colocaron 2 μ L de agua libre de nucleasas en el brazo del equipo.
- 2.- Se utilizó el programa “Nanodrop”, seleccionando la opción de ácidos nucleicos, colocando nuevamente 2 μ L de agua libre de nucleasas y se tomó el registro como blanco.
- 3.- Se limpió el equipo y se colocaron 2 μ L de la muestra de ADN a analizar, se dejó correr el programa y se esperó la lectura a 260 nm.
- 4.- Se registró la relación 260/280 y la concentración en ng/ μ L que otorgo el equipo para determinar el grado de pureza del ADN.

2.2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa

La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Una reacción de PCR consta de 20 a 30 ciclos idénticos y cada uno consta a su vez de tres fases: desnaturalización, alineamiento y elongación (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Cuadro 10. Reactivos, materiales y equipos utilizados en la PCR

Reactivos	Materiales y equipos
✓ Kit Promega para PCR que contiene: Agua libre de Nucleasas PCR Master Mix (50 unidades de Taq DNA polimerasa, 400 µM de cada dNTP y 3n de MgCl ₂) ✓ Parejas de Primers	✓ Termociclador Apollo ATC401 CLP ✓ Micropipetas ✓ Tubos eppendorf

Para la autenticación de los primers utilizados en la experimentación, se accedió a la página del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Toda la metodología se observa en el anexo 1.

Primers de Papaína

Cuadro 11. Primers utilizados en la PCR para la detección de papaína

Primer	Secuencia (5'-3')	Amplificado
Frontal	GGG CAT TCT CAG CTG TTG TA	211 pb
Reverso	CGA CAA TAA CGT TGC ACT CC	

Fuente: Yukihiro *et al.*, 2001

Primers de CaMV y T-NOS

Cuadro 12. Primers utilizados en la PCR para la detección de CaMV y T-NOS

Primer	Secuencia (5' a 3')	Amplificado
CaMV Frontal	GCTCCTACAAATGCCATCA	195 pb
CaMV Reverso	GGATAGTGGGATTGTGCGTC	
T-NOS Frontal	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	180 pb
T-NOS Reverso	TTATCCTAGTTTGC GCGCTA	

Fuente: Karamollaoglu et al., (2009).

Para la preparación de la reacción se necesitó que los “primers” tuvieran una concentración de 25 μM (se diluyó 5 μL de “primer” en 45 μL de agua libre de nucleasas) y el ADN una concentración en un rango de 40-80 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

La preparación de las muestras para la reacción se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo provisto en el kit de la PCR (Promega).

Cuadro 13. Reactivos utilizados para la realización de PCR

Reactivo	Cantidad (μL)
PCR Master Mix	12.5
Primer Frontal	0.5
Primer Reverso	0.5
ADN	1
Agua libre de nucleasas	La necesaria para completar un vol. final de 25 μL
Total	25

Metodología

1. Se colocaron cada uno de los componentes mostrado en el cuadro 13 en un tubo Eppendorf para PCR.
2. Para cada reacción de PCR se incluyó una muestra en blanco y un control positivo

3. Se programó el Termociclador *Apollo ATC401 CLP* con las condiciones que corresponden a cada primer (Figuras 24 y 25).

2.2.5 Programas de PCR

Papaína

Para la identificación de papaína se programó el termociclador de acuerdo a la revisión bibliográfica, las condiciones se muestran en la figura 26.

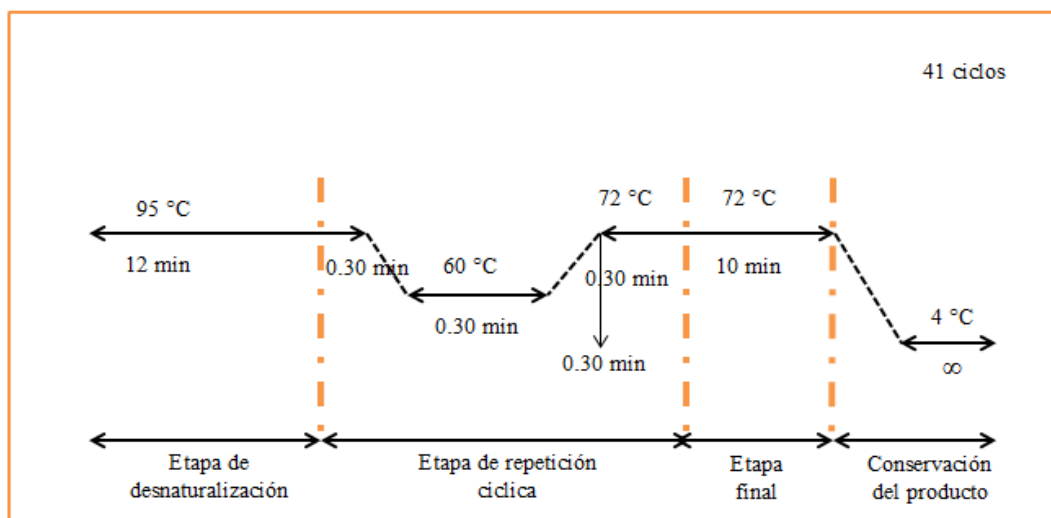


Figura 25. Etapas y condiciones de programa de PCR para la identificación de papaína.

CaMV y T-NOS

La programación del termociclador se efectuó de acuerdo a lo establecido por López, 2011.

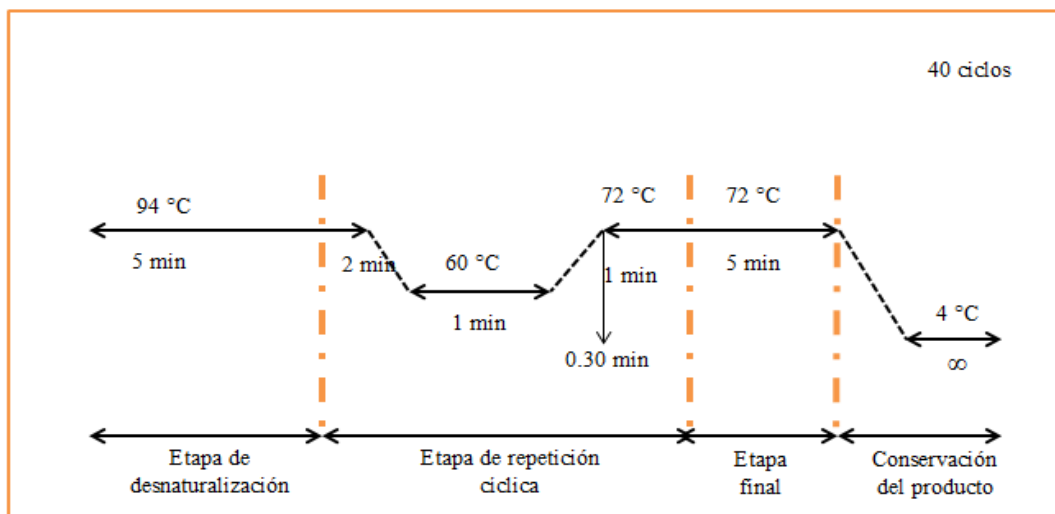


Figura 26. Etapas y condiciones de programa de PCR para la identificación de CaMV y T-NOS.

2.2.6 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa es una de las técnicas analíticas utilizadas en la caracterización de ácidos nucleicos en base a la forma y tamaño de las moléculas. La carga negativa, producto de los grupos fosfatos en el ADN y el ARN, resulta en una migración de las moléculas hacia el ánodo cuando se aplica un campo eléctrico; sin embargo la matriz, formada por la agarosa en la sales del tampón, ofrece una resistencia al movimiento. Generalmente los geles de agarosa en corrida horizontal son utilizados para separar fragmentos entre 20 a 50000 pb, y se emplea concentraciones comprendidas entre un 0.7 % y un 3% (Guevara *et al.*, 2009).

Para la identificación de papaína se utilizó una concentración al 3% y para la PCR de transgénicos fue una concentración a 2.5%.

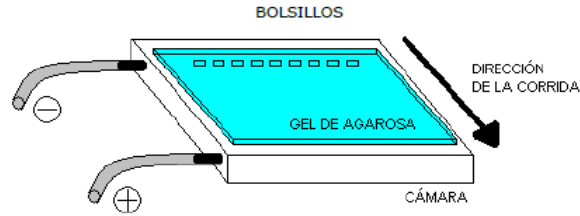


Figura 27. Esquema representativo de una corrida de electroforesis

Materiales y Equipos

Cuadro 14. Reactivos, Materiales y Equipos utilizados para la electroforesis y visualización del gel.

Reactivos	Material y Equipo
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Agarosa ✓ Tris acetato y EDTA (TAE) 1X como solución buffer, pH=8 ✓ Bromuro de etidio (BrET) ✓ Marcador de peso molecular ✓ Tinte cargador blue/orange 6X ✓ Muestras de las reacciones de PCR 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Cámara y cassette de electroforesis horizontal ✓ Fotodocumentador Claver Scientific LTD ✓ Horno de microondas ✓ Juego de micropipetas ✓ Cámara fotográfica Kodak Digital Science ✓ Parafilm

Metodología

Preparación del gel

1. Para el gel de agarosa al 3% se pesó 1.5 gramos de agarosa, mientras que para un 2.5% se pesó 1.25 gramos de agarosa en la balanza analítica. En un matraz Erlenmeyer de 200 mL y se agregaron 50 mL de Tris acetato y EDTA (TAE 1X) como solución buffer (pH=8).

2. Se calentó en el microondas aproximadamente 1 minuto hasta que la agarosa se disolvió completamente.
3. La solución se dejó enfriar y se le agregó una gota de bromuro de etidio (BrEt) y se agitó para disolverlo.
4. Se vertió en el soporte de la cámara de electroforesis colocando el peine para la formación de pocillos.
5. Se dejó gelificar la agarosa para retirar el peine y se agregó amortiguador TAE 1X a la cámara de electroforesis hasta cubrir el gel.

Carga y corrida del gel

1. Se colocó en el parafilm 3 μ L de bromuro de etidio, 3 μ L de blue/orange 6X y 5 μ L del producto de PCR.
2. Se colocó sobre el parafilm 3 μ L de BrEt, 3 μ L de blue/orange 6X, y 1.8 de marcador de peso molecular de 100 pb
3. Posteriormente se colocaron las muestras en cada pocito del gel
4. Una vez cargadas todas las muestras en el gel, se conectó la fuente de poder y suministro un voltaje de 70V.

Visualización de los geles de agarosa

El gel se colocó en la base del transluminador de luz UV y se encendió la cámara fotográfica y la lámpara de luz UV, se hizo la captura de la imagen del gel, para posteriormente enviarla a la computadora.

Capítulo 3

Resultados y Discusión



3.1 Objetivo Particular 1

Para la selección de primers de papaya (*Carica papaya L.*), se obtuvo de Goda et al., 2001, debido a que mostraba resultados positivos con las secuencias empleadas, además de que fue tomado como referencia en varios artículos de investigación publicados en revistas científicas.

Para la identificación de las secuencias de CaMV y T-NOS se obtuvieron de Karamollaoglu *et al.*, 2009, estos fueron elegidos de esta bibliografía ya que los primers se encontraban en el laboratorio y ya habían sido probados en el trabajo de tesis de López, 2011.

Para papaya (*Carica papaya L.*) los primers se encuentran en el gen de la “papaína, mRNA”, para el promotor 35S del virus mosaico de la coliflor los primers se ubican en el gen “CaMVgp7” y para el terminador T-NOS de *Agrobacterium tumefaciens* se encuentra en el gen que codifica la nopalina sintetasa, se buscó la existencia de dichos primers en la base de datos bioinformático Gene-bank del NCBI (Anexo 1), logrando corroborar la existencia de las secuencias en las bases de datos.

3.2 Objetivo Particular 2

Se realizó la recolección de muestras de frutos de papaya en diferentes mercados y supermercados del valle de México, la procedencia de los frutos eran de Veracruz, Oaxaca, Colima, Chiapas y una muestra de exportación.

Para la extracción de ADN se había planteado el método de Sambrook, sin embargo los resultados obtenidos no fueron los adecuados, ya que las concentraciones de ADN fueron muy bajas, por ello se optó por usar el “kit comercial” para las 18 muestras obtenidas de papaya.

La extracción de ADN, se realizó de acuerdo a lo estipulado por el “Kit” comercial Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food, después de la extracción se cuantificó el ADN y los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 15.

El cuadro 15 muestra las concentraciones de ADN que se obtuvieron de la pulpa de la papaya, las cuales son menores de 50 ng/μL, que es, la concentración que aproximadamente corresponde para que se lleve de forma adecuada la PCR. La relación 260/280 en la mayoría de las muestras se encuentra arriba del rango de 1.8-2.0, sin embargo, los valores son aceptables por lo que no representa problema alguno, si los valores son menores de 1.8, en el ADN extraído presentaría contaminación y esas muestras no se tomarían en cuenta, debido a que indican la presencia de contaminantes y no se puede llevar correctamente la PCR.

Cuadro 15 Cuantificación de ADN en muestras de papaya

Numero de muestra	Relación 260/280	Concentración ng/μl
M1	2.11	35.7
M2	1.77	19.5
M3	2.04	25.4
M4	2.41	45.9
M5	1.95	22.6
M6	2.27	16.1
M7	2.19	17.9
M8	2.92	17.4
M9	2.58	14.8
M10	2.43	24.6
M11	2.67	18.9
M12	2.25	21.2
M13	2.09	14.8
M14	2.55	17.4
M15	1.85	9.1
M16	1.98	40.4
M17	2.38	31.8
M18	1.92	38.5

La pureza de las 13 muestras (M1, M3, M4, M6, M7, M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14 y M17) de ADN extraídas se encuentran arriba del rango de 1.8-2.0, las razones por el que los valores salieron altos, se puede deber a que no se haya hecho un correcto pipeteo durante la extracción de ADN, y esto pudo influir al momento de cuantificar en el nanodrop, y por consecuencia se muestran los datos en el cuadro 15.

Si los valores de la cuantificación de ADN hubieran sido menores a 1.8, se tendría problemas, debido a que no se podía llevar una PCR correcta. Las causas por las cuales se hubieran mostrado valores menores, sería por la presencia de proteínas o de otros contaminantes como carbohidratos y fenol.

3.3 Objetivo Particular 3

En este objetivo se realizó la extracción de los controles positivos de maíz genéticamente modificado que contenía el gen de CaMV, mientras que para T-NOS se utilizó canola genéticamente modificada; esto con el fin de asegurar la presencia de transgénicos.

La extracción de ADN de las muestras se realizó mediante “Kit” comercial Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food. La pureza y concentración de las muestras se observan en el cuadro 16.

Cuadro 16. Cuantificación de ADN de maíz y canola transgénicas.

Muestra	260/280	ng/μL
Maíz Transgénico	2.04	63.6
Canola Transgénico	1.64	80.1

3.4 Objetivo Particular 4

Autenticación de Papaya (*Carica papaya L.*)

En este objetivo se realizó la técnica de la PCR a las 18 muestras de ADN de papaya, con el fin de que los primers de papaína correspondieran a la especie de interés, la cual al obtener un amplificado de 211 pb se demostraba que las muestras pertenecen a la papaya.

Los resultados se observan en las figuras 28, 29, 30 y 31.

En la **Figura 28** se evaluaron cuatro muestras de papaya (M1, M2, M3, M4), que fueron obtenidas de diferentes mercados y tianguis del Estado de México. Para el control positivo se utilizó una muestra que ya se encontraba en el laboratorio, esta muestra se utilizó con anterioridad para verificar que los primers adquiridos en la identificación de papaína, no presentaban problemas.

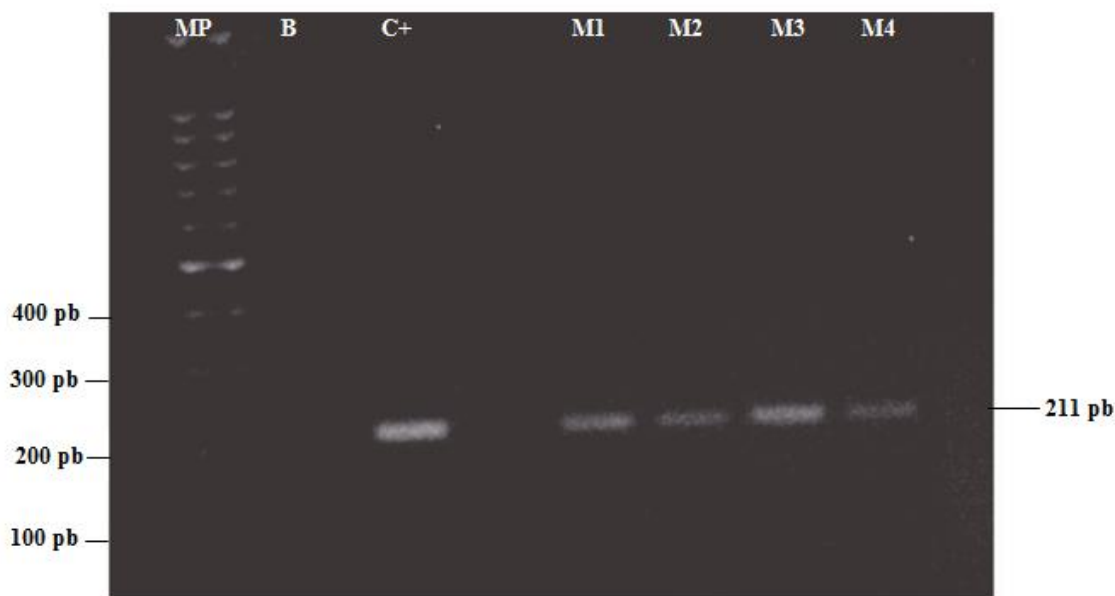


Figura 28. Identificación específica de papaya en 4 muestras de papaya a partir de los primers de papaína en gel de agarosa al 2.5%. Marcador de peso molecular de 100 pb (MP); Blanco (B); Control positivo (C+); Papaya de Mercado de Texcoco (M1); Papaya de Tianguis en Texcoco (M2); Papaya de Mercado de Chiautla (M3); Papaya de Central de Abastos de Ecatepec (M4).

Las 4 muestras fueron sometidas al programa de PCR para la identificación de papaína mostrada en la figura 25. El control positivo al igual que las 4 muestras, mostraron un amplificado de 211 pb, este resultado fue positivo, debido a que, de la fuente bibliográfica que se tomaron los primers de papaína (Yukihiro *et al*, 2001), mencionan un amplificado igual al que se obtuvo.

Las bandas de amplificación de las 4 muestras se observan claramente, con esto se constata de la veracidad de los primers utilizados en la experimentación, el gel no muestra contaminación por que el carril del blanco (B) no tiene ninguna banda visible.

Con la comprobación de los primers de papaína realizado, se procedió analizar las 14 muestras faltantes, las cuales se muestran en las figuras 29, 30 y 31.

En la figura 29 se observa las siguientes cuatro muestras (M5, M6, M7, M8), las cuales todas amplificaron a 211 pb, mencionar que se usó como control positivo la muestra 1 (M1), debido a que la muestra amplifico de forma correcta en la figura 28. Los 5 carriles muestran un pequeño barrido, se puede observar que en el carril del blanco (B) no hay presencia de

amplificado, por lo que se descarta que sea por contaminación, esto fue a que se utilizó un voltaje alto, en la corrida del gel, incluso en el carril del marcador de peso molecular (MP), también se observa este detalle, aunque en menor proporción.

Hay que recordar que el ADN tiene carga negativa, y que al momento de ser sometida a un campo eléctrico, hay una migración de las moléculas hacia el ánodo, por lo que un voltaje alto causa este tipo de barridos en el gel. Se manejaba un voltaje de 70 V, y por causa de este problema, las siguientes electroforesis se corrieron a 60 V.

En la figura 30, se analizaron 7 muestras (M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15), se observa que el carril que tiene ADN de la muestra 10 (M10), no amplificó con los primers de papáina utilizados, esto pudo ocurrir porque, este producto, ha pasado por tratamientos térmicos de altas temperaturas durante su elaboración, y con ello, haya una degradación de ADN del producto (arriba de los 80 °C), por lo que esta muestra se descartó para los búsqueda del promotor CaMV y el terminador T-NOS.

Para los carriles que tienen las muestras M12 y M13, se nota un amplificado de 211 pb, pero los carriles son muy tenues.

Una de las causas por las que no se observan bien las amplificaciones, se debe a: un pipeteo incorrecto durante la adición de las muestras a la cámara de electroforesis se haya quedado un poco de estas en las puntas utilizadas o bien, que las muestras se hayan salido del pocito durante su introducción.

En la figura 31 se analizaron 3 muestras de papaya variedad hawaiana, no se presentó problema alguno, esto se puede observar en el amplificado de las muestras, que fueron las deseadas, con esto, el protocolo que se siguió para la identificación de papáina, queda aprobado

La razón por la cual se trabajó con papaya hawaiana, es porque en diferentes artículos de investigación consultados, mencionan que esta variedad es genéticamente modificada. Fue muy difícil el conseguir estas tres muestras, ya que, en nuestro país, no es muy comercial, la variedad maradol es la más abundante en nuestro país.

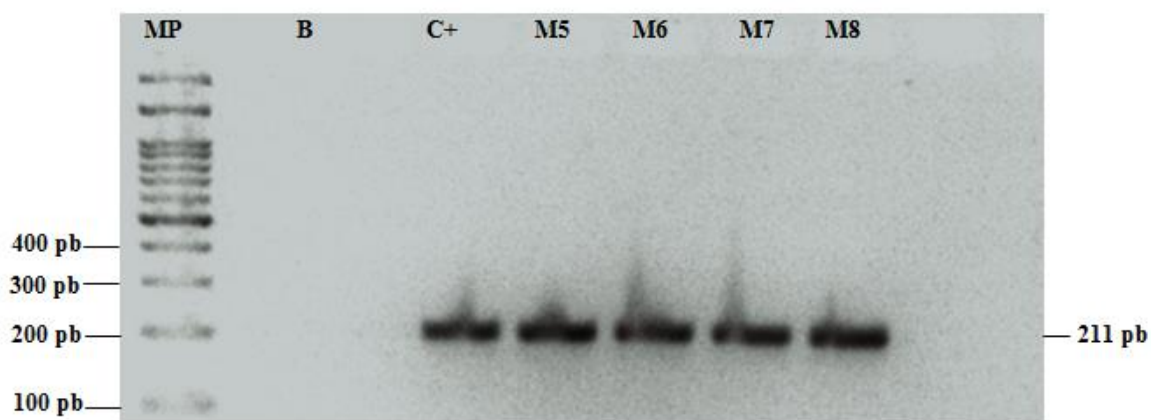


Figura 29. Identificación específica de papaya en cuatro muestras de papaya a partir de primers de papaína en gel de agarosa al 2.5%. Marcador de peso molecular 100 pb (MP); Blanco (B); Control positivo (C+); Papaya de Mercado de Texcoco (M5); Papaya de Mercado de Jamaica (M6); Papaya de Mercado de San Juan (M7); Papaya de Central de Abastos de Iztapalapa (M8).

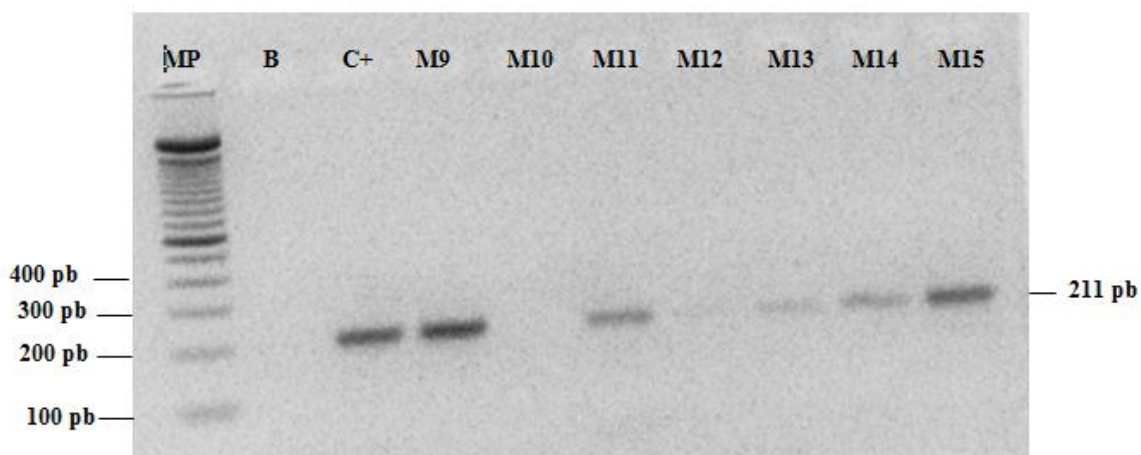


Figura 30. Identificación específica de papaya en siete muestras de papaya a partir de primers de papaína en gel de agarosa al 2.5%. Marcador de peso molecular 100 pb (MP); Blanco (B); Papaya de Mercado de Chiconcuac (M9); Gerber de papaya-manzana (M10); Papaya Deshidratada en Desayunos Escolares (M11); Papaya Deshidratada en Cereal Fitness (M12); Papaya de Mercado del Carmen Cuautitlán Izcalli (M13); Papaya Deshidratada en Granola (M14); Papaya Deshidratada de dulcería de Liverpool (M15).

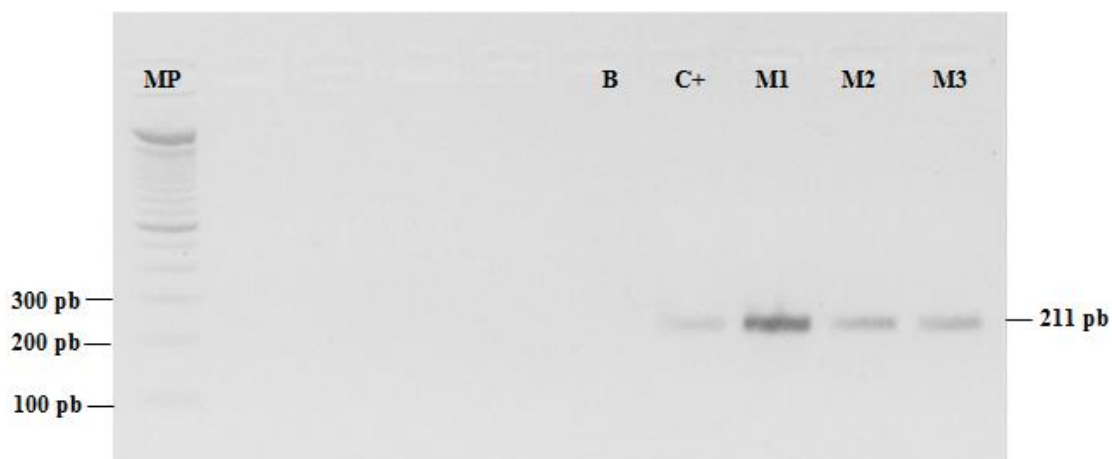


Figura 31. Identificación específica de papaya en tres muestras de papaya de variedad hawaiana a partir de primers de papaína en un gel de agarosa al 2.5%. Marcador de peso molecular 100 pb (MP); Blanco (B); Control positivo (C+); Papaya Hawaiiense de Chicago II, Estados Unidos (M16); Papaya del Mercado del Carmen en Cuautitlán Izcalli (M17); Papaya del Mercado del Carmen en Cuautitlán Izcalli (M18).

Identificación del promotor CaMV

Terminada la autenticación de las muestras de papaya, se llevó a cabo la identificación del promotor CaMV en las muestras de papaya obtenidas, con la finalidad de saber si se trata de una papaya genéticamente modificada. Para ello se siguió el programa de PCR de la figura 26. Para asegurar la presencia de transgénicos, se utilizó como control positivo maíz transgénico que contiene el promotor CAMV. Los resultados se observan en las figuras 32, 33, 34 y 35.

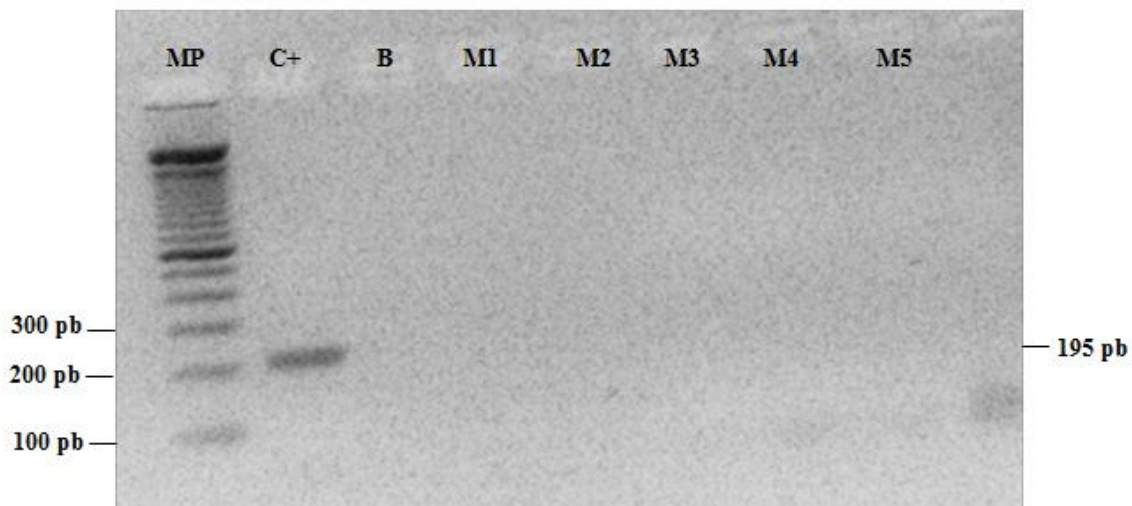


Figura 32. Identificación del promotor CaMV en cinco muestras de papaya a partir de los primers del mismo promotor en un gel de agarosa al 2.5%. Marcador de peso molecular de 100 pb (MP); Blanco (B); Control positivo (C+); Papaya de Mercado de Texcoco (M1); Papaya de Tianguis en Texcoco (M2); Papaya de Mercado de Chiautla (M3); Papaya de Central de Abastos de Ecatepec (M4); Papaya de Mercado de Texcoco (M5).

En las figuras 32 y 33 se observa un amplificado de 195 pb del control positivo, que de acuerdo a Karamollaoglu et al, (2009), (donde se tomaron los primers), indica que la reacción se llevó acabo adecuadamente, además de esto, otro factor es que: no hay amplificado en el carril del blanco (B). Las 9 muestras evaluadas en ambos geles, no se observa la presencia del promotor CaMV.

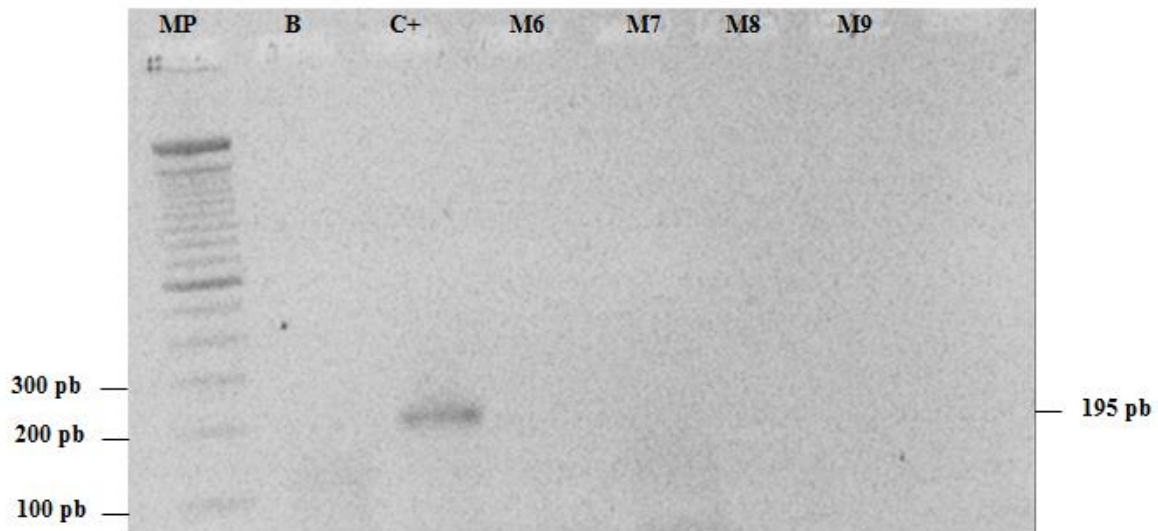


Figura 33. Identificación del promotor CaMV en cuatro muestras de papaya a partir de los primers del mismo promotor en un gel de agarosa al 2.5%. Marcador de peso molecular de 100 pb (MP); Blanco (B); Control positivo (C+); Papaya de Mercado de Jamaica (M6); Papaya de Mercado de San Juan (M7); Papaya de Central de Abastos de Iztapalapa (M8); Papaya de Mercado de Chiconcuac (M9).

En la figura 34, la prueba fue realizada varias ocasiones, ya que se mostraban resultados desconfiables, la razón se debe a que se observaron barridos en casi todas las muestras, el motivo de este problema, fue la contaminación los primers de CaMV que se utilizaron en la experimentación.

Con una nueva pareja de primers, se continuó con la experimentación, la prueba se repitió 3 veces y los resultados fueron los mismos a los que se muestran en la figura 34; un amplificado del control positivo de 195 pb, un nulo amplificado en las 5 muestras analizadas, y la ausencia del promotor CaMV.

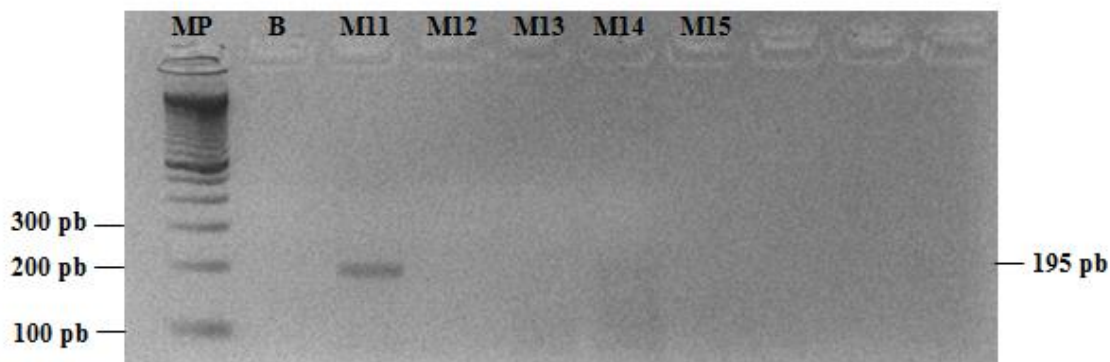


Figura 34. Identificación del promotor CaMV en cinco muestras de papaya a partir de los primers del mismo promotor en un gel de agarosa al 2.5%. Marcador de peso molecular de 100 pb (MP); Blanco (B); Control positivo (C+); Papaya Deshidratada en Desayunos Escolares (M11); Papaya Deshidratada en Cereal Fitness (M12); Papaya de Mercado del Carmen Cuautitlán Izcalli (M13); Papaya Deshidratada en Granola (M14); Papaya Deshidratada de dulcería de Liverpool (M15).

Por otro lado la figura 35 muestra un amplificado del control positivo, las 3 muestras analizadas de papaya variedad hawaiana no amplificaron para el promotor CaMV, por lo que el uso de este promotor en estas muestras es nulo.

Sin embargo se esperaba que estas muestras amplificaran para este promotor. Yukihiro Goda, *et al*, 2001 y Erika M. Wall *et al*, 2004., usan en sus respectivos trabajos de investigación el promotor CaMV para la detección de papayas genéticamente modificadas, en ambos estudios solo realizan la investigación en la variedad hawaiana, y los resultados arrojados son la amplificación del promotor CaMV, en las muestras analizadas en estos estudios. Cabe mencionar que la investigación de Yukihiro Goda, fue realizada en mercados de Japón, mientras que Erika M. Wall lo realizó en la isla de Hawaii.

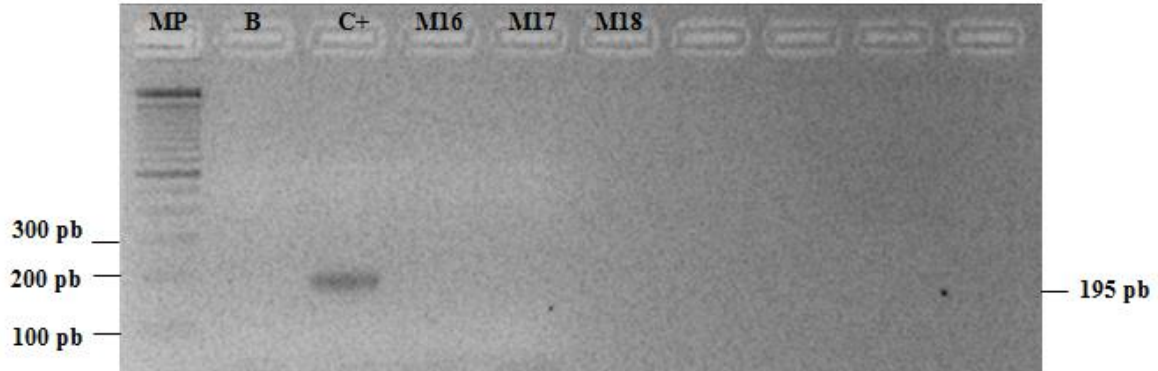


Figura 35. Identificación del promotor CaMV en 3 muestras de papaya de variedad hawaiana a partir de los primers del mismo promotor en un gel de agarosa al 2.5%. Marcador de peso molecular de 100 pb (MP); Blanco (B); Control positivo (C+); Papaya Hawaiana de Chicago Il. Estados Unidos (M16); Papaya del Mercado del Carmen en Cuautitlán Izcalli (M17); Papaya del Mercado del Carmen en Cuautitlán Izcalli (M18).

Aunque no se haya encontrado este promotor en las dieciocho muestras analizadas, no se asegura que no se trate de papayas transgénicas. La razón por la que no se descarta esta posibilidad, se debe a que pueden tener otros promotores como: el gen RP, 55-1 y GUS que se obtienen del gen del Virus de la Mancha Anular, y autores como Wall, *et al.*, 2004, Wentao, *et al.*, 2008 y Kim, *et al.*, 2010, lo demuestran en su trabajo de investigación..

Identificación del Terminador T-NOS

Una vez evaluadas todas las muestras para la detección del promotor CaMV, se hizo lo mismo para la amplificación del terminador T-NOS, se tomó como control positivo canola genéticamente modificada. Los resultados se observan en las figuras 36, 37 y 38.

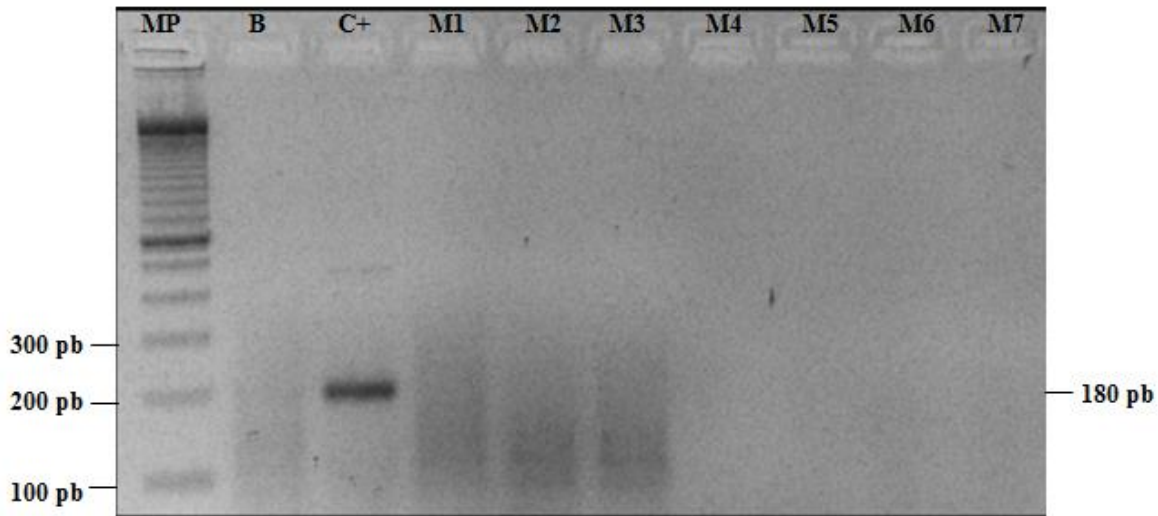


Figura 36. Identificación del terminador T-NOS en siete muestras de papaya (de la 1 a la 7) a partir de los primers del mismo terminador en un gel de agarosa al 2.5%. Marcador de peso molecular de 100 pb (MP); Blanco (B); Control positivo (C+); Papaya de Mercado de Texcoco (M1); Papaya de Tianguis en Texcoco (M2); Papaya de Mercado de Chiautla (M3); Papaya de Central de Abastos de Ecatepec (M4); Papaya de Mercado de Texcoco (M5); Papaya de Mercado de Jamaica (M6); Papaya de Mercado de San Juan (M7).

En la figura 36 se observa un amplificado del control positivo, el amplificado es de 180 pb, que es lo que menciona Karamollaoglu et al, (2009). Las siete muestras evaluadas en electroforesis no hay presencia del terminador T-NOS, por lo que pudieran no ser genéticamente modificada.

La figura 37 muestra un amplificado del terminador T-NOS de 180 pb del control positivo. Las muestras analizadas en la electroforesis, ninguna amplifico para este terminador, esta prueba, se tuvo que realizar varias veces, por que al momento de ver los geles después de la electroforesis, los pocitos que contenían las muestras, presentaban un barrido y un amplificado menor al de 180 pb.

El problema era que los primers del terminador T-NOS, se encontraban contaminados, por lo que se trabajó con una nueva pareja de primers para continuar con la experimentación.

La prueba se repitió 3 ocasiones y el resultado fue el mismo que se observa en la figura 37.

La figura 38 muestra un amplificado del control positivo, las tres muestras analizadas de papaya hawaiana, no hay presencia del terminador T-NOS, por ello, se descarta que pudieran ser genéticamente modificadas.

Esta parte de la experimentación, se tuvo que repetir varias veces, porque se observaron varios detalles que hizo dudar de los resultados obtenidos.

Se apreciaba un amplificado menor al de 180 pb, el control positivo no amplificaba y el carril de la muestra que contenía el blanco, se veía un amplificado.

La falla de estos problemas, era que los primers de T-NOS, se encontraban contaminados.

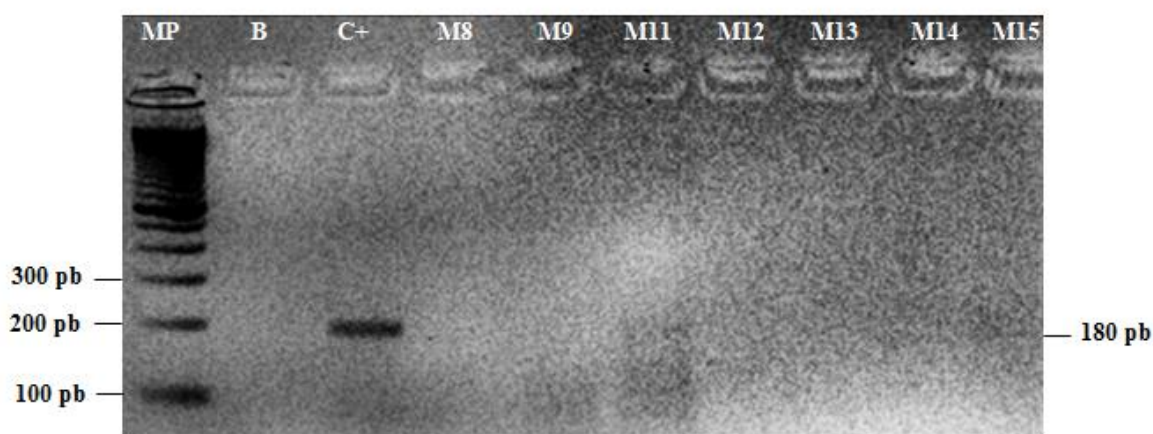


Figura 37. Identificación del terminador T-NOS en siete muestras (de la 8 a la 14) de papaya a partir de los primers del mismo terminador en un gel de agarosa al 2.5%. Marcador de peso molecular de 100 pb (MP); Blanco (B); Control positivo (C+); Papaya de Central de Abastos de Iztapalapa (M8); Papaya de Mercado de Chiconcuac (M9); Papaya Deshidratada en Desayunos Escolares (M11). Papaya Deshidratada en Cereal Fitness (M12); Papaya de Mercado del Carmen Cuautitlán Izcalli (M13); Papaya Deshidratada en Granola (M14); Papaya Deshidratada de dulcería de Liverpool (M15).

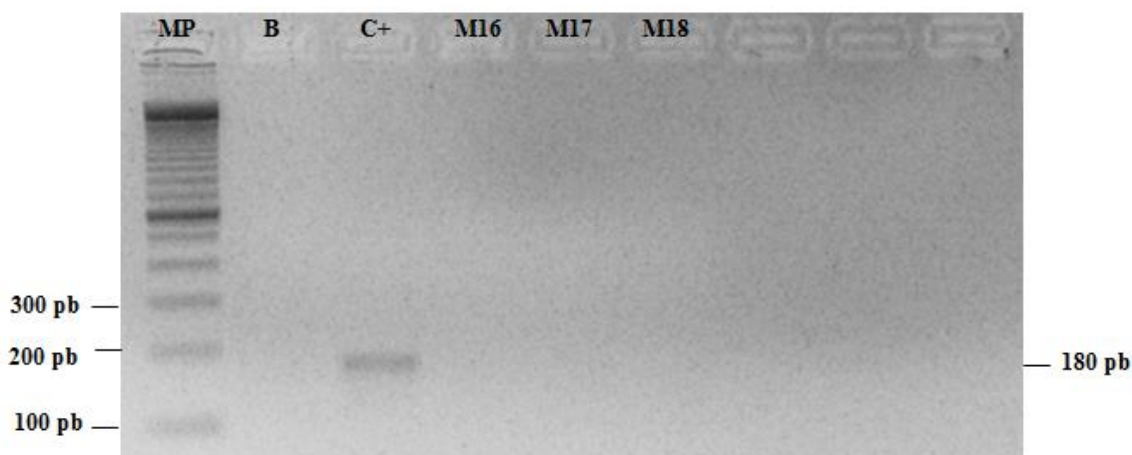


Figura 38. Identificación del terminador T-NOS en 3 muestras de papaya de variedad hawaiana a partir de los primers del mismo terminador en un gel de agarosa al 2.5%. Marcador de peso molecular de 100 pb (MP); Blanco (B); Control positivo (C+); Papaya Hawaiana de Chicago II. Estados Unidos (M16); Papaya del Mercado del Carmen en Cuautitlán Izcalli (M17); Papaya del Mercado del Carmen en Cuautitlán Izcalli (M18).

Cabe recordar que Yukihiro Goda, *et al*, 2001 en su trabajo de investigación, trabajo con la variedad hawaiana y uso el terminador T-NOS para la identificación de papaya genéticamente modificada, los resultados obtenidos fue el hallazgo de este terminador en las muestras analizadas en su trabajo de investigación

De igual forma se esperaba que las 3 muestras de variedad hawaiana analizadas, amplificaran con el terminador T-NOS, pero no fue así. Una de las posibles causas es que las muestras analizadas usen otros terminadores como lo son el gen de la proteína de la cápsida CP (Coat Protein) que es obtenido del genoma del Virus de la Mancha Anular de la Papaya.

Autores como Wentao Xu, *et al.*, 2008., y Wall, *et al.*, 2004, utilizan este terminador para detectar papaya genéticamente modificada en sus respectivos trabajos de investigación.

CONCLUSIONES

El programa bioinformático fue de mucha ayuda para corroborar que los primers seleccionados de la literatura, realmente estuvieran en el gen de interés y con ello poder llevar a cabo la experimentación.

En la extracción de ADN se utilizó el kit comercial “Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food, el cual fue rápido, fácil y de resultados favorables.

Con el uso de la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) se logró identificar el gen de la papaína en papaya fresca, debido a que las bandas amplificadas mostradas en el trabajo fueron los esperados.

La detección fue nula para las 18 muestras analizadas del promotor CaMV y el terminador T-NOS. Sin embargo existen trabajos que reportan la presencia de eventos transgénicos en papaya, pero la mayoría de estos trabajos son realizados en China, Japón y en la isla de Hawai. Los resultados nos indicaron que, la papaya producida y comercializada en México no usa el promotor CaMV y el terminador T-NOS, que son los genes más utilizados para introducirlos en granos y vegetales genéticamente modificados, sin embargo esta combinación no siempre se usan, lo que quedó demostrado en este trabajo y pueden utilizar otras secuencias para la producción de papayas transgénicas.

La importancia por la cual es necesario identificar papaya genéticamente modificada, es debido a que, México se le considera como posible centro de origen de este fruto, por lo que la ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados establece que en los centros de origen y de diversidad genética no se permitirá la liberación de transgénicos que puedan interferir con el desarrollo cultivo protegido.

El virus de la mancha anular de la papaya, es uno de los problemas más importantes a los que se enfrentan los productores de papaya en el país, debido a que ocasiona pérdidas totales en siembras comerciales y se le considera como severa y endémica en algunos estados, desafortunadamente, el virus afecta a la industria y cada vez es más difícil el establecimiento de nuevos campos, recordar que México es uno de los principales exportadores de esta fruta a nivel mundial, por lo que el uso de la biotecnología para combatir este problema no se

descarta, y los grandes productores recurren a semilla genéticamente modificada para no tener grandes pérdidas.

En México, la papaya genéticamente modificada ha sido desarrollada a nivel experimental, por lo que su liberación aun es una controversia, debido al tema de bioseguridad implementada por el gobierno, que es lo que bloquea su salida a nivel comercial. Además de que los pequeños y medianos productores de papaya en México, se muestran interesados por el uso de semilla genéticamente, sin embargo son pocos los recursos económicos que tienen para hacerse de esta tecnología, mientras que los grandes productores no muestran interés alguno.

GLOSARIO

Amplificación: Aumento en el número de copias de un fragmento de ADN particular.

Ácido Desoxirribonucleico (ADN): Molécula almacenadora de información hereditaria que se encuentra en el núcleo de la célula. Las bases del ADN son 4: Adenina, Tiamina, Citosina y Guanina representados por 4 letras: A, T, C y G.

Ácido Ribonucleico (RNA).- Molécula informacional que se encuentra en el núcleo y en el citoplasma, su función principal es ser mensajero de las órdenes del ADN a todas las partes de la célula.

Bioseguridad: Son acciones y medidas de evaluación, monitoreo, control y prevención que se deben asumir en la realización de actividades con organismos genéticamente modificados, con el objeto de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que dichas actividades pudieran ocasionar a la salud humana o al medio ambiente y la diversidad biológica incluyendo los aspecto de inocuidad de dichos organismos que se destinen para uso o consumo humano.

Biotecnología: Conjunto de técnicas que utilizan organismos vivos o sustancias provenientes de estos para elaborar o modificar un producto, mejorar plantas o animales, o para desarrollar microorganismos para usos específicos.

Corola: Parte más interna de la envoltura floral y es por tanto la más próxima a los órganos reproductores.

Electroforesis: Se le denomina a la técnica mediante la cual se separan las biomoléculas en disolución cuando se ven sometidas a un campo eléctrico.

Enzima: Biomoléculas especializadas en la catálisis de las reacciones químicas que tienen lugar en la célula. Eficaces como catalizadores ya que son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones químicas mucho más que cualquier catalizador artificial conocido.

Gen: Fragmento más pequeño de una molécula de ADN que posee información completa para un carácter determinado

Limbo: Se conoce a la lámina que comúnmente forma parte de la anatomía de una hoja

Mancha Anular de la Papaya (PRSV): Es aquella que infecta árboles de papaya y miembros de la familia de las cucurbitáceas de las plantas. Retrasa el crecimiento y causa los frutos para desarrollar anillos oscuros, esta enfermedad se mueve por pequeñas moscas llamadas pulgones.

Microlitro (μL): Unidad de volumen equivalente a la millonésima parte de un litro, representada por el símbolo μL. Equivale a 1 milímetro cúbico.

Organismos Genéticamente Modificados (OGM): Son variedades de especies conocidas a las que se les ha conferido alguna capacidad funcional (detectable, heredable e intencionalmente útil), por tecnologías de ingeniería genética, a partir de la incorporación de factores hereditarios (genes) de especies distantes o cercanas.

Par de Bases (pb): Consiste en dos nucleótidos opuestos y complementarios en las cadenas de ADN y ARN que están conectadas por puentes de hidrógeno.

Panícula: Espiga de flores, ramas o frutos que nacen de un mismo eje.

Papaína: Es una enzima que se extrae de la papaya, se trata de una enzima proteolítica, es decir, con capacidad de descomponer las proteínas de los alimentos y neutralizar los ácidos gástricos.

Pecíolo: Órgano de la hoja que la une a la ramita que la sostiene

Planta Monocotiledóneas: Se trata de las dos clases de plantas con flor. Son casi siempre herbáceas y ella pertenece plantas muy conocidas (trigo, maíz, caña de azúcar).

Planta Polígama: Se le llama así debido a que se encuentran plantas masculinas, femeninas y hermafroditas en la misma población.

Primer: Moléculas sintéticas de cadena sencilla y secuencia corta, funcionan como cebadoras para la replicación del ADN molde en la PCR.

Reacción en Cadena de la Polimerasa: Es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de este es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean.

Transgén: Se define como un gen que se ha seleccionado de una especie y se ha introducido dentro del acervo genético de un individuo de la misma o de otra especie. El individuo resultante es lo que se denomina transgénico.

REFERENCIAS

- 1. Acevedo** Gasman Francisca, Huerta Ocampo Elleli, Lorenzo Alonso Santiago, Ortiz García Sol. (2009), *La Bioseguridad en México y los Organismos Genéticamente Modificados: Cómo enfrentar un Nuevo Desafío*, CONABIO, Vol. 2, pp. 319-353.
- 2. Acosta** Enciso Nancy, León Martínez Guillermo A. (2003), *Enfermedades y Plagas de la Papaya*, 1ª edición, Villavicencio Meta, Colombia, Corpoica la Libertad.
- 3. Alfonso** García Mario. (2010), *Guía Técnica del Cultivo de la Papaya*, 1ª edición, El Salvador, Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova”.
- 4.- Almodóvar** Wanda I. (2000), *Enfermedades más Comunes de la Papaya*, Clínica al Día, Colegio de Ciencias Agrícolas, Vol. 5, pp. 44-48.
- 5. Arango** Wiesner Victoria Ana, Román Hoyos Carlos Alberto, Rosa Salamanca Carmen, Almansa Manrique Edgar Fernando, Bernal Riobo Jaime Humberto, León Martínez Guillermo A., Rey Valenzuela Vicente Emilio, Ariza Nieto Magnolia, Gómez Bilbao Pedro, (2000), *El cultivo de la papaya en los llanos orientales de Colombia*, 4ta edición, Villavicencio, Colombia, Lito Process.
- 6. Augstburger** Franz, Berger Jörn, Censkowsky Udo, Heid Petra Heid, Joachim Milz, Christine Streit, (2000), *Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico*, 1ª edición, Gräfelfing Alemania, Asociación Naturland.
- 7. Bolívar** Zapata Francisco. (2003), *Recomendaciones para el Desarrollo y Consolidación de la Biotecnología en México*, 1ª edición, Distrito Federal, México, Academia Mexicana de Ciencias, A.C.
- 8. Bolívar** Zapata Francisco (2011), *Por un Uso Responsable de los Organismos Genéticamente Modificados*, Distrito Federal, México, Academia Mexicana de Ciencias, AC.
- 9. Calderón** Rivera Gonzalo, Cepeda Vergara Rodolfo. (2002), *Control de Enfermedades y Plagas en el Melón y la Papaya*, 1ª edición, Santa Fe de Bogotá, Colombia, Produmedios.
- 10. Cartón** Álvarez María Isabel. (2002), *La biotecnología al servicio del cultivo de la papaya*. Vida Rural, Vol.160, pp.35-37.

11. **Castro** Landín Lesbel, Morales Luis Alberto, Aranguren González Miguel. (2000), *Fundamentos teórico-prácticos sobre el cultivo y cosecha de la papaya (Carica papaya L.)*, Ministerio de Educación Superior Universidad de Matanzas, Cuba.
12. **Cornejo** Romero Amelia, Serrato Díaz, Rendón Aguilar Beatriz, Rocha Munive Martha Graciela. (2014), *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*, 1ª edición, Distrito Federal, México, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
13. **Cortázar** Martínez Adriana, Silva Rincón Elsa Patricia. (2004), *Métodos Físico-Químicos en Biotecnología*, Tesis de Ingeniería, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
14. **Fang** Zhang, Liu Wang, Kai Fan, Jian Wu, Yibin Ying. (2014), *The Detection of T-Nos, a Genetic Element present in GMOs, by cross-priming Isothermal Amplification With real-time Fluorescence*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 406, pp. 3069-3078.
15. **Feitó** Madrigal Duniesky y Portal Boza Malena. (2013). *La competitividad en las exportaciones de papaya de México: un análisis cuantitativo*. Revista de análisis de economía, comercio y negocios internacionales, Vol.7, pp.27-54.
16. **García** Zare Liz, Valadez Pedro y Guzmán Salvador. (2009). *Generación de plantas transgénicas de papaya Maradol con resistencia potencial al virus de la mancha anular de papaya*, Laboratorio de Biotecnología., Rebiol, Vol. 29, pp. 203-206.
17. **Guang-** Ming Liu, Hui-Nong Cai, Min-Jie Cao, Wen-Jin Su. (2005). *Fluorophore double stranded probe-multiplex quantitative PCR method for detecting transgenic component of promoter derived from Cailiflower Mosaic Virus and nos terminator derived from Agrobacterium tumefaciens simultaneously*. Food Control, Vol. 18, pp. 615-622.
18. **Guevara** Palmira, Campelo Morillo Riward, Richard Clark, Guariglia Verónica, Moronta Félix, Kamran Rizzolo. (2009), *Fundamentos de Genética Molecular Manual de Laboratorio*, Universidad Central de Venezuela.
19. **Gutiérrez** Sánchez Lorena, Juárez Paz Lucero. (2011), *Efecto del tratamiento de Irradiación Gamma e Hidrotérmico en el Control de Antracnosis en Papaya (Carica papaya L.) Variedad “Maradol” para Exportación*, Tesis de Ingeniería, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

- 20. Holden** Marcia J., Levine Marci, Scholdberg Tandance, Haynes Ross J., Jenkins Ronald G. (2009), *The use of 35S and Tnos Expression Elements in the Measurement of Genitically Engineered Plant Materials*, Analytical and Bionalytical Chemistry, Vol. 396, pp. 2175-2187.
- 21. Holst-Jensen** Arne, Yves Bertheau, Marc de Loose, Lutz Grohman, Sandrine Hamels, Lotte Hougs, Dany Morisset, Sven Pecoraro, Maria Pla, Marc Van den Bulcke, Doerte Wulff. (2012), *Detecting un-authorized genetically modified Organism (GMOs) and Derived Materials*, Biotechnology Advances, Vol. 30, pp. 1318-1335.
- 22. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).** (2010), *Producción y Manejo Postcosecha de Papaya Maradol en la Planicie Huasteca*, 1ª edición, Tamaulipas, México, INIFAP.
- 23. Jayavalli** R., Balamohan T.N., Manivannan N., Rabindran R., Paramaguru P., Robin R. (2015), *Transmission of Resistance to Papaya Ringspot Virus (PRSV) in intergeneric populations of Carica papaya and Vasconcella Cauliflora*, Scientia Horticulturae, Vol. 187, pp. 10-14.
- 24. Jiménez** Díaz José A. (2002), *El Cultivo de la Papaya Hawaiana*, 1ª edición, Costa Rica, EARTH.
- 25. Karamollaoglu** Irem, Hüseyin Avni Öktem, Methmet Mutlu. (2009), *QCM-based DNA Biosensor for Detection of Genetically Modified Organisms (GMOs)*, Biochemical Engineering Journal, Vol. 44, pp. 142-150.
- 26. Larach** María Angélica. (2001), *El Comercio de los productos Transgénicos: El Estado del Debate Internacional*, 1ª edición, Santiago de Chile, Publicación de las Naciones Unidas.
- 27. López** Marta, Mallorquín Paloma, Vega Miguel. (2003), *Tecnologías Moleculares de Trazabilidad Alimentaria*, 1ª edición, Madrid España, Genoma España.
- 28. López** M. S. (2011), *Autenticación de Maíz Tradicional y Genéticamente Modificado en Productos Comerciales en México*. Tesis de Ingeniería. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
- 29. Marmiroli** Nelson, Maestri Elena, Gulli Maiolina, Malcevschi Alessio, Peano Clelia, Bordoni Roberta, De Bellis Gianluca. (2008), *Methods for Detection of GMOS in Food and feed*, Analytical and Bionalytical Chemistry, Vol. 392, pp. 369-384.
- 30. Martínez** Castillo Róger. (2008), *Cultivos y Alimentos Transgénicos una Aproximación Ecológica*, Biocenosis, Vol. 21, pp. 28-36.

- 31. Massieu** Trigo Yolanda, Chauvet Michelle, Castañeda Zavala Yolanda, Barajas Ochoa Rosa Elvia, González Aguirre Rosa Luz. (2000), *Consecuencias de la Biotecnología en México: en el caso de los Cultivos Transgénicos*, Sociológica, Vol. 15, 133-159.
- 32. Ming** Ray, Paul H. Moore. (2014), *Genetics and Genomics of Papaya*, New York, Estados Unidos, Springer.
- 33. Pérez** de Castro Ana María. (2008), *Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*, Valencia España, Universidad Politécnica de Valencia.
- 34. Producto papaya (ProPapaya)**. (2009), *Estudio de Oportunidades de Mercado e Inteligencia Comercial Internacional de la Papaya Mexicana e identificación de Necesidades de Infraestructura Logística*, México, ProPapaya.
- 35. Rabiei** M., Sardari S. (2014), *Genetically Modified Food/ Organism*, *Encyclopedia of Toxicology*, Vol. 2, pp. 432-438.
- 36.- Reyna** Córdoba Nalleli (2000), *PCR en Odontología*, Tesis de Cirujano Dentista, Facultad de Odontología UNAM.
- 37. Rodríguez** Ferri Elías F., Zumalacárregui José Ma., Otero Carballeira Andrés, Calleja Suárez Alfredo y de la Fuente Crespo Luis F. (2003), *Lo que usted Debe Saber Sobre los Alimentos Transgénicos (y organismos manipulados genéticamente)*, 1ª edición, Valencia, España, Caja España.
- 38. Rodríguez** Paulina R., González R. Orfil. (2007), *Plantas Transgénicas: Una revisión de los principales Cultivos Básicos en México*, e-Gnosis, Vol. 5, 1-24 pp.
- 39. Rodríguez** Sánchez Iram Pablo, Barrera Saldaña Hugo A. (2004), *La Reacción en Cadena de la Polimerasa a Dos Décadas de su Invención*, Ciencia UANL, Vol. 7, pp. 323-335.
- 40. Santamarta** José. (2004), *Los Transgénicos en el Mundo*, World Watch, Vol. 12, 24-28 pp.
- 41. Scotto** Espinoza Carlos. (2010), *Breve análisis de la importancia del cultivo de papaya en el Perú y la pertinencia del uso de variedades transgénicas resistentes al virus de la mancha anillada*, Lima, Perú, Ministerio del Ambiente de Perú.
- 42. Secretaria de Desarrollo Rural, Colima (SEDERCOL)**. (2010), *Papaya Perfil Comercial*, Gobierno del Estado de Colima.

- 43. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).** (2012). Información Técnica de Semilla de Papaya Mexicana para Exportación a la República Bolivariana de Venezuela, SAGARPA, pp.4-17.
- 44. Sociedad** Española de Biotecnología. (2000), *Biotecnología en Pocas Palabras, Plantas Transgénicas (Preguntas y Respuestas)*, España, SEBIOT.
- 45. Sunilkumar** Ganesan, LeAnne Mohr, Emily Lopata-Finch, Chandrakanth Emani y Keerti S. Rathore. (2002), *Developmental and Tissue-Specific Expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP*, Plant Molecular Biology, Vol. 50, pp. 463-474.
- 46. Tamay** de Dios L., Ibarra C., Velasquillo C. (2013), *Fundamentos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y de la PCR en Tiempo Real*, Investigación en Discapacidad, Vol. 2, pp. 70-78.
- 47. Wentao** Shen, Decai Tuo, Pu Yan, Yong Yang, Xiaoying Li, Peng Zhou. (2014), *Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Papaya Ringspot Virus*, Journal of Virological Methods, Vol. 204, pp. 93-100.
- 48. Yukihiro** Goda, Takuya Asano, Masaaki Shibuya, Akihiro Hino, Masatake Toyoda. (2001), *Detection of Recombinant DNA from Genetically Modified Papaya*, Food Hygiene and Safety Science, Vol. 42, pp. 231-236.

Referencias Electrónicas

- 49- AgroBioMéxico.** (2012). *Marco Regulatorio de los Organismos Genéticamente Modificados (OGM) Destinados a la Agricultura*. Consultado 22 de Noviembre del 2014. Disponible en: http://www.agrobiomexico.org.mx/publicaciones/Marco_Regulatorio.pdf.
- 50. AgroBioMéxico.** (2013). *Panorama Mundial de Cultivos Biotecnológicos*. Consultado 22 de Noviembre del 2014. Disponible en: http://www.agrobiomexico.org.mx/publicaciones/Mapa_ISAAA_2013.jpg.
- 51. AgroBioMéxico.** (2015). *Cultivos con Variedades GM en el Mundo*. Consultado el 11 de Enero del 2015.

Disponible en:

www.agrobiomexico.org.mx/index.php?option=com_k2&view=item&layout=item&id=96&Itemid=5.

52. AGROLOGICA (2007). *Base de Datos con Imágenes y Fichas Actualizadas de las Plagas Agrícolas de España*. Consultado el 25 de Enero del 2015. Disponible en: <http://www.agrologica.es/informacion-plaga/pulgion-verde-melocotonero-myzus-persicae/>.

53.- Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión (2005). Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Consultado el 4 de Febrero del 2015. Disponible en: <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/normatividad/vigente/LBOGM.pdf>

54. Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM). (2015). Acerca del Protocolo de Cartagena en México. Consultado el 4 de Febrero del 2015. Disponible en: <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/protocolo-de-cartagena/acerca-del-protocolo>

55. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, División Estadística, FAOSTAT (2014). Food and Agricultural Production/ Countries by commodity. Consultado el 8 de Diciembre del 2014.

Disponible en: http://faostat3.fao.org/browse/rankings/countries_by_commodity/E.

56. Secretaria del Convenio sobre la Diversidad Biológica (SCDB). (2000). Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica. Consultado el 4 de Febrero del 2015.

Disponible en:

<http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/comunicacion/publicaciones/cartagena-protocol-es.pdf>.

57. Secretaria del Convenio Sobre la Diversidad Biológica (SCDB). (2011). Protocolo de Nagoya-Kuala Lumpur sobre Responsabilidad y Compensación Suplementario al Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología. Consultado el 4 de Febrero del 2015.

Disponible en:

http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/comunicacion/publicaciones/protocolsupplement_sp.pdf.

- 58. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).** (2014). *Estatus de solicitudes de permisos de liberación al ambiente de OGM 2008-2014*. Consultado 30 de enero del 2015. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=25576>.
- 59. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)** (2015). *Historia de la Bioseguridad de la OGM*. Consultado el 10 de Febrero del 2015. Disponible en: www.senasica.gob.mx/?id=2403.
- 60. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).** (2014). *Cierre de la producción Agrícola por Cultivo*. Consultado el 10 de Diciembre del 2014. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>.
- 61. University of Florida (UF)** (2004). *Featured Creatures*. Consultado el 13 de Enero del 2015. Disponible en: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/fruit/tropical/papaya_fruit_fly.htm
- 62. Vinetur** (2010). *La araña roja tiene los días contados*. Consultado el 26 de Enero del 2015. Disponible en: <https://www.vinetur.com/201203066372/la-arana-roja-tiene-los-dias-contados.html>.

ANEXOS

Anexo 1

1.- Búsqueda bibliográfica, ubicando la secuencia de primers Goda et. al, 2002.

Detection of Recombinant DNA from Genetically Modified Papaya

Yukihiro GODA*^{1,†}, Takuya ASANO*¹, Masaaki SHIBUYA*², Akihiro HINO*³ and Masatake TOYODA*¹

(*¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;
*²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo: 7-3-1, Hongo,
Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033; *³National Food Research Institute, Ministry of
Agriculture, Forestry and Fisheries: 2-1-12, Kannondai, Tsukuba,
Ibaraki 305-8642, Japan; † Corresponding author)

Primer name	Sequence (5'-3')
Papain 1-5'	GGG CAT TCT CAG CTG TTG TA
Papain 1-3'	CGA CAA TAA CGT TGC ACT CC

2.- Búsqueda de primers reportados para papáina Acceder a www.mitomap.org/MITOMAP

The screenshot shows the MITOMAP website interface. At the top, the browser address bar displays www.mitomap.org/MITOMAP, which is highlighted with a box and labeled "Dirección Web". Below the address bar is the MITOWEB header with a search bar. The main content area features the MITOMAP logo and the text "A human mitochondrial genome database". A sidebar on the left contains navigation links: "Log In", "Register", "Reset Password", "MITOMAP", "MITOMASTER", "MITOWIKI", and "Tools" (Help, Search, Feedback, Index). The main content area includes a "MITOMAP Quick Reference" section with links for "To search for point mutations" and "The rCRS is GenBank number NC_012920". Below this is a table with two columns: "General References" and "Illustrations:". The "General References" column lists various links, with "Complete Mitochondrial Genome Sequences" highlighted by a box and labeled "Clic". The "Illustrations:" column lists "View Figures", "Mitochondrial DNA Map", "Eleven pathological mutations in tRNA", "Mitochondrial energetics", "Diabetes metabolism & the mitochondria", "World migrations", and "mtDNA Trees".

3.- Acceder a la base de datos de NCBI dando clic en el link

The revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) is GenBank number **NC_012920**. Please use this new number when citing the rCRS in publications. The rCRS is a reference sequence, not a "consensus" sequence. It is a single reference individual from haplogroup H2a2 and has been used as a standard for reporting variants for over 30 years. See Bandelli's new 2013 rCRS review, link below.

View MITOMAP's fully annotated rCRS sequence [here](#).

The Cambridge Reference Sequence, revised & original:

Version	GenBank #	Fasta format	Article links
Revised Cambridge Reference Sequence ("rCRS") The rCRS is available as sequence number NC_012920 (formerly AC_000021.2) in GenBank's RefSeq database. This specific rCRS is the most commonly used and standard comparison sequence for human mtDNA research. It is 16569 bp in length, which includes one spacer at position 3107 to preserve the historical CRS position numbering. For publications, please cite NC_012920 as the rCRS. A duplicate of the rCRS exists as J01415.2 gi:113200490. This is a fully corrected update of the original Cambridge sequence and is identical to NC_012920.	NC_012920 gi:251831106	rCRS.fasta	Bandelli's 2013 rCRS review (PDF) Andrews et al 1999 (PubMed) • Read the paper (PDF) • Summary table of corrections.
Original Cambridge Reference Sequence ("CRS")	J01415 gi:337188	CRS1981.fasta	• Anderson et al 1981 (PubMed) • Read the paper (PDF)

4.- Búsqueda del genoma completo de Carica papaya papaina

Nucleotide search results for "carica papaya papain".

Species: Plants (25), Bacteria (1), Customize...

Molecule types: genomic DNARNA (15), mRNA (11), Customize...

Source databases: INSDC (GenBank) (24), RefSeq (2), Customize...

Sequence length: Custom range...

Release date: Custom range...

Revision date: Custom range...

Clear all | Show additional filters

Summary: 20 per page | Sort by Default order | Send to: | Filters: Manage Filters

Items: 1 to 20 of 26

- Carica papaya papain mRNA, complete cds**
1,292 bp linear mRNA
Accession: M15203.1 | GI: 167390
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- Carica papaya clone C6 chymopapain gene, partial cds
1,269 bp linear DNA
Accession: H0605970.1 | GI: 333101824
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- Carica papaya mRNA for chymopapain isoform V, partial
831 bp linear mRNA
Accession: AJ131998.1 | GI: 4469158
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- Carica papaya mRNA for chymopapain isoform IV, partial
757 bp linear mRNA
Accession: AJ131997.1 | GI: 4469156
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

Results by taxon: Top Organisms [Tree]
Carica papaya (18)
Arabidopsis thaliana (7)
Pseudomonas caricapapayae (?)

Find related data: Database: Select | Find items

Search details: ("Carica papaya"[Organism] OR carica papaya[All Fields]) AND papain[All Fields] | Search | See more...

5.- Buscar las secuencias de los primers (frontal y reverso), reportados para asegurar la existencia de la secuencia.

www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M15203.1

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Search Help

GenBank - Send - Change region shown

Customize view

Carica papaya papain mRNA, complete cds

GenBank: M15203.1
FASTA Graphics

Go to: [icon]

LOCUS CPAPAP 1292 bp mRNA linear PLN 19-JUN-1996
DEFINITION Carica papaya papain mRNA, complete cds.
ACCESSION M15203
VERSION M15203.1 GI:167390
KEYWORDS cysteine proteinase; endopeptidase; papain.
SOURCE Carica papaya (papaya)
ORGANISM Carica papaya
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae;
Pentapetalae; rosids; malvids; Brassicales; Caricaceae; Carica.
REFERENCE
1 (bases 1 to 1292)
AUTHORS Cohen, L.M., Coghlan, V.H. and O'Shei, L.C.
TITLE Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA
JOURNAL Gene 48 (2-3), 219-227 (1986)
PUBMED 2831845
COMMENT Original source text: C.papaya (Coimbatore 2) cDNA to mRNA, clone A7.
Draft entry and computer-readable sequence of [1] kindly provided by L.M.Cohen (07-APR-1987).
There is a double stop codon, with the second located at position 1083 to 1085. A possible regulatory sequence of '(at)agaaa' is located at position 1111 to 1132. A possible polyadenylation

Analyze this sequence
Run BLAST
Pick Primers
Highlight Sequence Features
Find in this Sequence

Possible homologs
Conserved in human, chimpanzee, Rhesus monkey, dog, cow, mouse, rat, chicken, zebrafish, rice, and frog

Related information
Full text in PMC
Protein
PubMed
Taxonomy
UniGene

6.- Búsqueda del primer frontal en dirección 5' a 3' GGGCATTCTCAGCTGTTGTA

ORIGIN 1 bp downstream of BamHI site.

```

1 atccattccc acttaagaag taasaagata tagctagtgt cacaatggct atgatacct
61 caatttcaaa gttgcttttt gttgcaatat gctctttttg ttatatgggt ttgcaattg
121 gtgatttttc tatttgggt tatttccaao atgaactgac atccaactgaa agactattc
181 agctatttga atctgggat tgaagcaco ataaattata taagaattat gatgaaaaa
241 tctacagatt tgaattttt aaagataatc ttaaatata tgaagagaca aatagaaaa
301 ataacagta ttggcttga taaatgtgt ttgctgatat gaccaatgat gaattcaaa
361 aaagatatac tggttctatt gctggaatt atacaacac cgaactatca tacgaaga
421 tgcttaata gttgatgta aatatccgg agtatgtca ttgagacaa aaagaagctg
481 tcaactcgtt aaaaatcag gttcttgg gtatgtgtt gggatttca gctgtttta
541 ctatgaggg aataatgag attagaactg ggaactaaa tgaactatca ggcgaagac
601 tgcctgactg cgaagagct agctcgggt gaaatgagg ttaccttgg agtgcactt
661 aattagtcg tcaataggt attcaacta gaataacta cccatagag ggaatgca
721 gttattgtcg ctcaagggg aaaggtcctt atgacgcaa aaccgatgg gttgacaag
781 tgaaccata taatgaagg gctctttat attcaattg aaaccaact gtgagcgtg
841 tccctgaagc tgcctgaaa gatttccaat tatatagag ggaatattt gtagagccat
901 gggaaacaa agtagatcat gcagtcgag cagttggata tgaacaaat tacataacta
961 taagaattc atgggtaca ggaatgggt aaatggata tataaagac aaagaagca
1021 ctggaactc ctatggagt tgtggaact atacaagctc attctatcct gttaaaact
1081 gatgagatca cggtttcat aaaaacctt atatatata atatatatag aactgtata
1141 ctcatcgtgt gttgaataa taatgagag gattaataa ttgtgtaac ctatatca
1201 cagttgtgt tgaacaact ttgatcgt ttgtatata ttgtgataa tgtttgttt
1261 gattgataa actttatc atactttat gc
//

```

Introducción de la secuencia

You are here: NCBI > DNA & RNA > Nucleotide Database Write to the Help Desk

GETTING STARTED	RESOURCES	POPULAR	FEATURED	NCBI INFORMATION
NCBI Education	Chemicals & Bioassays	PubMed	Genetic Testing Registry	About NCBI
NCBI Help Manual	Data & Software	Bookshelf	PubMed Health	Research at NCBI
NCBI Handbook	DNA & RNA	PubMed Central	GenBank	NCBI News
Training & Tutorials	Domains & Structures	PubMed Health	Reference Sequences	NCBI FTP Site

gggcattctcagctgttga Find 1 of 1 M15203 : 520-539 Help

7.- Búsqueda del primer reverso en dirección 5'a 3' GGAGTGCAACGTTATTGTCG

```

ORIGIN      1 bp downstream of BamHI site.
1 atccattccc acttaagaag taaaaagata tagctagtgt cacaatggct atgatacctt
61 caatttcaaa gttgcttttt gttgcaatat gtccttttgt ttatatgggt ttgtcatttg
121 gtgatttttc tattgtgggt tattctcaaa atgacttgac atccactgaa agacttattc
181 agctatttga atcgtggatg ttgaagcaca ataagattta taagaatatt gatgaaaaaa
241 tctacagatt tgaatttttt aaagataatc ttaaatatat tgatgagaca aataagaaaa
301 ataacagtta ttggcttggg ttaaatgtgt ttgctgatat gagcaatgat gaattcaaa
361 aaaagtatac tggttctatt gctggaaatt atacaacaac cgaactatca tacgaagaag
421 tgcttaatga tggatgatga aatatccggg agtatgtcga ttggagacaa aaaggagctg
481 tcaactcctg aaaaaatcag ggttcttgtg gtagttgttg ggcatttcca gctgttgtaa
541 ctatagaggg aataaattaag attagaactg ggaacttaaa tgaatactca gagcaagaac
601 tgcttgactg cgacagacgt agctacgggt gcaatggagg ttacccttgg agtgcacttc
661 aattagtggc tcaatatggt attcactaca gaaatactta cccatagag ggagtgcaac
721 gttattgtcg ctcaagggag aaaggtcctt atgcagccaa aaccgatggg gttcgacaag
781 tgcaaccata taatgaaggg gctctcttat attcaattgc aaaccaacct gtgagcgttg
841 tccttgaagc tgctgaaaaa gatttccaat tatatagagg gggaaatatt gtggggccat
901 gcggaaaaca agtagatcat gcagtcgcag cagttgggta tggaccaaat tacatactca
961 taaagaattc atggggtaca ggatggggtg aaaaatggata tataagaatc aaaagaggca
1021 ctgaaaactc ctatggagta tgtggacttt atacaagctc attctatcct gttaaaaact
1081 gatgagatca cggctttcat aaaatccctt atatatatat atatatatag aacttgata
1141 ctcatcgtgt gttgaaataa taaatgagag gattaataat ttgtgtaac ctatatatca
1201 cagtttgttg tgacaaactt ttgcatcgct tgttatatta tttgtaataa tgtttgtttt
1261 gattgaataa acttttcat atactttat gc

```

//

1 of 1 M15203 : 711-730

Introducción de la secuencia

8.- Identificación del tamaño de la secuencia de amplificación

```

ORIGIN      1 bp downstream of BamHI site.
1 atccattccc acttaagaag taaaaagata tagctagtgt cacaatggct atgatacctt
61 caatttcaaa gttgcttttt gttgcaatat gtccttttgt ttatatgggt ttgtcatttg
121 gtgatttttc tattgtgggt tattctcaaa atgacttgac atccactgaa agacttattc
181 agctatttga atcgtggatg ttgaagcaca ataagattta taagaatatt gatgaaaaaa
241 tctacagatt tgaatttttt aaagataatc ttaaatatat tgatgagaca aataagaaaa
301 ataacagtta ttggcttggg ttaaatgtgt ttgctgatat gagcaatgat gaattcaaa
361 aaaagtatac tggttctatt gctggaaatt atacaacaac cgaactatca tacgaagaag
421 tgcttaatga tggatgatga aatatccggg agtatgtcga ttggagacaa aaaggagctg
481 tcaactcctg aaaaaatcag ggttcttgtg gtagttgttg ggcatttcca gctgttgtaa
541 ctatagaggg aataaattaag attagaactg ggaacttaaa tgaatactca gagcaagaac
601 tgcttgactg cgacagacgt agctacgggt gcaatggagg ttacccttgg agtgcacttc
661 aattagtggc tcaatatggt attcactaca gaaatactta cccatagag ggagtgcaac
721 gttattgtcg ctcaagggag aaaggtcctt atgcagccaa aaccgatggg gttcgacaag
781 tgcaaccata taatgaaggg gctctcttat attcaattgc aaaccaacct gtgagcgttg
841 tccttgaagc tgctgaaaaa gatttccaat tatatagagg gggaaatatt gtggggccat
901 gcggaaaaca agtagatcat gcagtcgcag cagttgggta tggaccaaat tacatactca
961 taaagaattc atggggtaca ggatggggtg aaaaatggata tataagaatc aaaagaggca
1021 ctgaaaactc ctatggagta tgtggacttt atacaagctc attctatcct gttaaaaact
1081 gatgagatca cggctttcat aaaatccctt atatatatat atatatatag aacttgata
1141 ctcatcgtgt gttgaaataa taaatgagag gattaataat ttgtgtaac ctatatatca
1201 cagtttgttg tgacaaactt ttgcatcgct tgttatatta tttgtaataa tgtttgtttt
1261 gattgaataa acttttcat atactttat gc

```

Secuencia a amplificar 211pb

Para corroborar la existencia de los primers reportados para CaMV y T-NOS, se realiza el mismo procedimiento que se describió anteriormente.

Karamollaoglu, 2009.

QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs)

İrem Karamollaoglu^a, Hüseyin Avni Öktem^a, Mehmet Mutlu^{b,*}

^aMiddle East Technical University, Department of Biological Sciences, Plant Biotechnology Lab., İnanı Bulvarı, 06531 Ankara, Turkey

^bHacettepe University, Engineering Faculty, Plasma Aided Bioengineering and Biotechnology (PABB) Research Group, Eskişehir yolu Beytepe, 06532 Ankara, Turkey

CaMV 35S sense: 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3'

CaMV 35S antisense: 5'-GGATAGTGGGATTGTGCGTC-3'

T-NOS sense: 5' GAATCCTGTTGCCGGTCTTG 3'

T-NOS antisense: 5' TTATCCTAGTTTGCGCGCTA 3'