



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**Detección de polen genéticamente modificado en miel
de abeja (*Apis mellifera*) empleando la Reacción en
Cadena de la Polimerasa (PCR)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

VÁZQUEZ DÍAZ WENDY

ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA

COASESORA: M. EN C. KARLA MARIANA GARCÍA BANDA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa 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 polen genéticamente modificado en miel de abeja (*Apis mellifera*) empleando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Que presenta la pasante: Wendy Vázquez Díaz

Con número de cuenta: 410006733 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 08 de Febrero de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
SECRETARIO	I.A. María Guadalupe López Franco	
1er. SUPLENTE	Dra. María Andrea Trejo Márquez	
2do. SUPLENTE	M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza	

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

LMCF/cga*



“Creer no constituye más que el segundo poder; querer es el primero. Las montañas proverbiales que la fe mueve no son nada al lado de lo que hace la voluntad”.

Victor Hugo



DEDICATORIAS

A Dios, por permitirme estar viva, iluminarme y darme las herramientas necesarias para cumplir mis objetivos y disfrutar de mis logros, por la bendición más grande que son mis padres y por poner en mi camino a aquellas personas que me han apoyado y de las cuales he aprendido algo nuevo.

A mi madre, por ser un ejemplo de lo que es ser una mujer honesta, responsable y trabajadora, que enfrenta la vida por más difícil que sea la situación sin rendirse jamás. Hilaria Díaz RojasGracias por tu fortaleza.

A mi padre, por ser un ejemplo de inteligencia, orden y disciplina, gracias a tus consejos he logrado cumplir una de tantas metas que tengo en la vida. Adolfo Vázquez Juárez.....Gracias por tu apoyo y siempre estar presente.

Ambos han sido el principal motor de superación y el mayor motivo para seguir adelante, buscando cada día ser mejor.

A mis tías, Mary, Flor, Luz, Trini, por su cariño, cuidados, consejos, apoyo y palabras de aliento desde que era pequeña, son las mejores y las adoro.

A mis abuelos, porque gracias a ustedes tengo a mis padres y gracias a ellos estoy aquí, porque siempre están pendiente de mí y se preocupan por mi bienestar.



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por abrirme las puertas de sus aulas y laboratorios y proporcionarme los recursos necesarios para cumplir una de tantas metas. Un orgullo pertenecer a la máxima casa de estudios.

Al Dr. José Francisco Montiel Sosa, por el apoyo brindado para llevar a cabo este proyecto.

A la M. en C. Josefina Moreno Lara, por su tiempo, orientación, consejos y apoyo incondicional,

A la M. en C. Karla Mariana García Banda, por su esfuerzo y dedicación durante la etapa experimental.

A mis sinodales, por su buena disposición y tiempo dedicado para la revisión del trabajo, por sus observaciones, consejos y recomendaciones para la culminación del mismo.

A mis profesores, por sus enseñanzas y por ser parte fundamental de mi formación académica durante la carrera.

A todas aquellas personas que hasta el momento he tenido el placer de conocer dentro y fuera de la carrera y que me han dado la oportunidad de convivir y aprender de ellas, además de apoyarme, escucharme y alentarme en los momentos más difíciles, en especial a Jesús S. L.

Gracias al Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación (PIAPI 1617). Técnicas genómicas multidisciplinares aplicadas a las ciencias de la salud y producción de alimentos, por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.



ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	3
1.1. Generalidades de la miel	3
1.1.1. Definición y características	3
1.1.2. Especificaciones físicas y químicas	4
1.1.3. Importancia de la miel en la alimentación mexicana	5
1.1.4. Producción en México	6
1.2. Biotecnología e Ingeniería Genética en plantas	9
1.2.1. Definición de Organismos Genéticamente Modificados	10
1.2.2. Tecnología de ADN recombinante	11
1.2.3. Miel Genéticamente Modificada en México	12
1.2.4. Regulación en México sobre el uso de transgénicos	13
1.3. Métodos para la autenticación de alimentos	16
1.3.1. Métodos de análisis basados en la detección de proteínas	16
1.3.2. Métodos de análisis basados en la detección de ADN	18
1.3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	19
1.3.3.1. Fundamento de la PCR	19
1.3.3.2. Etapas de la PCR	20
1.3.3.3. Componentes de la PCR	22
1.3.3.4. Ventajas y desventajas de la técnica	23
1.3.3.5. Análisis de los productos de la PCR	24



CAPÍTULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	27
2.1. Objetivos	27
2.2. Justificación del proyecto.....	28
2.3. Hipótesis.....	28
2.4. Cuadro metodológico	29
2.5. Material	30
2.5.1. Material biológico	30
2.5.2. Reactivos.....	30
2.5.3. Equipo	31
2.6. Métodos	32
2.6.1. Extracción de polen.....	32
2.6.2. Extracción de ADN a partir de polen.....	32
2.6.3. Cuantificación de ADN por absorbancia a 260/280 nm	34
2.6.4. Localización de las secuencias de CaMV y T-NOS	35
2.6.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	36
2.6.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) directa	38
2.6.7. Electroforesis	40
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.1. Objetivo particular 1.....	42
3.2. Objetivo particular 2.....	42
3.3. Objetivo particular 3.....	46
3.4. Objetivo particular 4.....	46
3.5. Objetivo particular 5.....	48
CONCLUSIONES	53
GLOSARIO	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	64



ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1. <i>Apis mellifera</i>	3
Figura 1.2. Miel	4
Figura 1.3. Regiones apícolas de México.	8
Figura 1.4. Representación esquemática de genes “casete”.	10
Figura 1.5. Porcentaje de cultivos GM permitidos para su liberación del 2005 al 2015.....	15
Figura 1.6. Permisos de liberación al ambiente de OGM por tipo de solicitud del 2005 al 2015.....	15
Figura 1.7. Etapas de la PCR	21
Figura 2.1. Agitador Vortex <i>Genie K-550-G</i>	33
Figura 2.2. Termoblok <i>Thermomixer compact eppendorf</i>	33
Figura 2.3. Microcentrífuga <i>Minispin plus eppendorf</i>	33
Figura 2.4. Nanoespectrofotómetro <i>Accesolab ND-1000</i>	35
Figura 2.5. Termociclador <i>Apollo instrumentation ATC 401</i>	37
Figura 2.6. Programa de PCR para la detección de polen genéticamente modificado	37
Figura 2.7. Programa de PCR para la detección de material vegetal en miel de abeja	39
Figura 2.8. Esquema representativo de la carga de muestras en un gel de agarosa	41
Figura 2.9. Trasluminador de luz UV <i>Cleaver Scientific LTD</i>	41
Figura 3.1. Esquema representativo del pellet de polen obtenido a partir de las muestras de miel	42



Figura 3.2. Gel de agarosa (1%) para confirmar la presencia de ADN en muestras de miel y sus repeticiones, extraídas mediante protocolo de Sambrook 44

Figura 3.3. Gel de agarosa (1%) para confirmar la presencia de ADN en muestras de miel y sus repeticiones, extraídas mediante protocolo de Sambrook 44

Figura 3.4. Gel de agarosa (1.5%) para confirmar la presencia de material vegetal en las muestras de miel en estudio 45

Figura 3.5. Gel de agarosa (1.5%) para confirmar la presencia de material vegetal en las muestras de miel en estudio 46

Figura 3.6. Gel de agarosa (3%) para corroborar la amplificación de los cebadores para CaMV 35S 47

Figura 3.7. Gel de agarosa (3%) para corroborar la amplificación de los cebadores para T-NOS..... 48

Figura 3.8. Gel de agarosa (3%) para la detección del transgen CaMV 35S en las muestras de miel en estudio 49

Figura 3.9. Gel de agarosa (3%) para la detección del transgen CaMV 35S en las muestras de miel en estudio 49

Figura 4.0. Gel de agarosa (3%) para la detección del transgen T-NOS en las muestras de miel en estudio 50

Figura 4.1. Gel de agarosa (3%) para la detección del transgen T-NOS en las muestras de miel en estudio 51



ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1.1. Especificaciones fisicoquímicas de la miel	5
Cuadro 1.2. Producción de miel en México 2015	7
Cuadro 1.3. Permisos de liberación de cultivos GM del año 2005 al 2015	14
Cuadro 2.1. Muestras de miel de abeja analizadas	30
Cuadro 2.2. Cebadores utilizados para la detección de transgénicos	36
Cuadro 2.3. Componentes de la PCR.	36
Cuadro 2.4. Componentes de la PCR directa para la detección de material vegetal.....	38
Cuadro 2.5. Cebadores universales para plantas.	39
Cuadro 2.6. Componentes de la PCR directa para la detección de transgénicos.	40
Cuadro 3.1. Pureza y concentración de las muestras de ADN extraídas.....	43
Cuadro 3.2. Pureza y concentración de los controles positivos para la detección de Organismos Genéticamente Modificados	47
Cuadro 3.3. Resumen de resultados para la presencia de CaMV 35S y T-NOS	52



RESUMEN

La miel es uno de los alimentos más antiguos que el hombre ha aprovechado para nutrirse, su contenido en gran variedad de sustancias, además de los carbohidratos que la caracterizan, hacen de esta un alimento de gran valor nutricional y funcional. Además, la apicultura representa una actividad económica importante para nuestro país, ya que México es uno de los principales productores y exportadores de miel a nivel mundial, por lo que la mayor preocupación de los productores es garantizar su calidad y de ese modo mantener la aceptación de miel tanto en el mercado nacional como en el internacional, en ese sentido, resultan de gran valor los trabajos de investigación tendientes al análisis de la misma.

Siendo que año tras año han aumentado en nuestro país los permisos para el cultivo de transgénicos, es de esperarse que también aumente la posibilidad de encontrar polen con contenido transgénico en nuestras mieles, situación que nos lleva a cuestionarnos si se tiene conciencia acerca de la propagación de material genéticamente modificado inducida por las abejas de forma natural hacia otros alimentos como la miel. A pesar de la falta de pruebas contundentes de daños a la salud humana por el consumo de este tipo de alimentos, no se descartan posibles riesgos, por lo que es de vital importancia que acuerdos, documentos y marcos jurídicos que se tienen en nuestro país como el Protocolo de Cartagena y la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados para el manejo responsable de los mismos, sean respetados por parte de organizaciones dedicadas a su producción.

El objetivo principal del presente proyecto fue la detección de las secuencias del promotor CaMV 35S y del terminador T-NOS, dos de las secuencias ampliamente utilizadas dentro de los Organismos Genéticamente Modificados. Para lo cual se recurrió a una de las técnicas más efectivas para dicho fin, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), así como un pretratamiento para extraer el polen de la miel, un método de extracción para la obtención del ADN conocido como método de Sambrook y la utilización de un kit especial para plantas que permitió llevar a cabo la PCR de forma directa, los resultados de la reacción fueron analizados mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa. Finalmente se concluyó con la presencia de material transgénico en seis de las doce muestras evaluadas, de las cuales, ninguna declaraba la presencia del mismo en su etiqueta.



INTRODUCCIÓN

A principios de la década de los 80's, la agricultura a nivel mundial comenzó un proceso de cambios profundos sustentados en el desarrollo de la Ingeniería Genética y la Biología Molecular. Entre otros cambios, se produjo la proliferación de cultivos genéticamente modificados, posibilitando nuevas capacidades para la producción agropecuaria (Fernández y Cornejo, 2006). Pero este desarrollo, no sólo cambió las estrategias de producción de bienes y servicios agroindustriales, sino que fue introduciendo en la sociedad nuevos desafíos: los riesgos ambientales de esta tecnología y la capacidad estatal de prevenirlos y regularlos. El rápido desarrollo de cultivos genéticamente modificados ha incrementado la preocupación por los posibles efectos sobre el medio ambiente y la seguridad alimentaria (Cheng *et al.*, 2007).

La apicultura ha estado presente en el desarrollo del ser humano desde épocas muy remotas, existen registros de la recolección de miel de más de 7000 años antes de Cristo, en culturas como la egipcia, mesopotámica o griega se han encontrado datos históricos que muestran los inicios en el manejo de la colmena y por ende del control de las abejas con lo que se dan los inicios de la apicultura (Pardo, 2005). Uno de los efectos que se han presentado en nuestro país en los últimos años por el cultivo de transgénicos, como por ejemplo la soya, es la aparición de miel con contenido de polen transgénico. Esto se hace posible debido a que las abejas obtienen el polen de las flores de cultivos transgénico, lo mezclan con el néctar y lo transportan a las colmenas (Narváez, 2013).

México se encuentra entre los diez primeros países en producción y exportación de miel, situación que obliga la calidad del producto nacional. La producción apícola en México se dirige principalmente a la Unión Europea, situación que exige el cumplimiento de sus reglas relacionadas con los alimentos transgénicos. En el año 2013, el Tribunal de Justicia de la Unión Europea, encargado del cumplimiento de la legislación para cada uno de los países miembros, declaró que el polen de plantas transgénicas en la miel debe ser clasificado como un ingrediente y por consiguiente, el polen en cuestión, entra en el ámbito de la regulación, y está sujeto a un régimen de autorización (Waiblinger *et al.*, 2012).



CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. Generalidades de la miel

1.1.1. Definición y características

La miel es la sustancia dulce natural producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones o de otras partes vivas de la planta, que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias y almacenan en panales, de los cuales se extrae el producto sin ninguna adición (NOM-145-SCFI-2001).

Producida por la abeja *Apis mellifera* (Figura 1.1), la miel está compuesta esencialmente de diferentes azúcares, sobre todo de fructosa y glucosa, así como de otras sustancias, como ácidos orgánicos, enzimas (Real Decreto 1049, 2003), aminoácidos, minerales, sustancias aromáticas, pigmentos, cera y granos de polen (CGG y SENASICA, 2014).



Figura 1.1. *Apis mellifera*

El color puede ser un tono casi incoloro a un tono pardo oscuro (Figura 1.2). Puede tener una consistencia fluida, espesa o cristalizada (en parte o en su totalidad). El sabor y el aroma pueden variar, pero se derivan del origen vegetal (Real Decreto 473, 2015).

La miel de flores es elaborada por la abeja a partir del néctar de las flores. A través de su lengua, el néctar es ingerido y llega al buche donde se mezcla con enzimas de la saliva que, junto con los que recoge del néctar floral, hidrolizan la sacarosa del néctar en fructosa y glucosa, principales azúcares contenidos en la miel.



Figura 1.2. Miel de abeja

Cuando la abeja regresa a la colmena, regurgita la carga del néctar en las celdillas próximas a la entrada (Sainz *et al.*, 2000). Transcurridos unos días, el néctar que ha sido depositado en los alvéolos de los panales, se deshidrata hasta una concentración de agua de entre 14 y 25%, al mismo tiempo que la concentración de azúcares se eleva hasta el 70-80% y su espectro de azúcares se modifica por la acción enzimática. Finalmente, la abeja recubre la celdilla con miel ya madurada mediante un opérculo de cera (Jean-Prost y Le Conte, 2007).

1.1.2. Especificaciones físicas y químicas

La cantidad de azúcares puede variar, de acuerdo con el tipo de alimentación que recibe la colmena, o bien, si la cosecha fue prematura; la calidad de la miel depende en buena medida de los azúcares contenidos en ella, estos deben corresponder a los de la miel y no a los del azúcar común (sacarosa). Estos son los que le dan sus características organolépticas, siendo la fructosa la que predomina en la mayoría de las mieles (PROFECO, 2015).

El contenido de agua (humedad) es un factor importante en la calidad de la miel, su presencia en exceso puede hacerla susceptible de fermentación. El contenido de humedad es atribuible a ciertos factores ambientales; el agua presente en el néctar influye también en la viscosidad y color, lo que afecta a su vez las propiedades organolépticas y de conservación (PROFECO, 2015). Según la Norma Mexicana de Miel (*NMX-F-036-NORMEX-2006*), esta debe cumplir con las especificaciones físicas y químicas establecidas en el cuadro 1.1.

**Cuadro 1.1.** Especificaciones fisicoquímicas de la miel

Especificaciones	Mínimo	Máximo
Azúcar reductor expresado como (g/100g) de azúcar invertido.	63.88	-
Sacarosa (g/100g).	-	5.00
Glucosa (g/100g).	-	38.00
Humedad (%)	-	20.00
Sólidos insolubles en agua (g/100g).	-	0.30
Cenizas (g/100g).	-	0.60
Acidez expresada como miliequivalentes de ácido/kg.	-	40.0

Fuente: NMX-F-036-NORMEX-2006. Alimentos-Miel-Especificaciones y Métodos de prueba.

La composición de la miel es bastante variable y principalmente depende de la fuente floral. Una amplia gama de constituyentes menores está presente en la miel, muchos de los cuales se sabe que tienen propiedades antioxidantes, estos incluyen los ácidos fenólicos y flavonoides y ciertas enzimas como la glucosa oxidasa y la catalasa (Alvarez *et al.*, 2010).

1.1.3. Importancia de la miel en la alimentación mexicana

Como el único edulcorante natural disponible, la miel era un alimento importante para el *Homo sapiens* desde sus inicios. De hecho, la relación entre las abejas y el hombre comenzó desde la Edad de Piedra (Crane, 1983). La primera referencia escrita sobre la miel menciona el uso de la misma como un medicamento y un ungüento y data del año 2100-2000 aC. En la mayoría de las culturas antiguas la miel se utilizaba, tanto para propósitos alimenticios como médicos (Allsop y Miller, 1996).

La miel tiene una variedad de efectos nutricionales y de salud positivos. Contiene por lo menos 181 sustancias, es una solución sobresaturada de azúcares, y contiene pequeñas cantidades de proteínas, enzimas, aminoácidos, vitaminas, minerales, compuestos aromáticos y polifenoles, por lo que se ha utilizado como alimento y producto médico desde hace mucho tiempo (Alvarez *et al.*, 2010). Se ha demostrado que sirve como una fuente natural de antioxidantes, los cuales son efectivos para reducir el riesgo de enfermedades del corazón, sistema inmune, cataratas y diferentes procesos inflamatorios (Bogdanov *et al.*, 2008).



La miel permaneció como el único endulzante primario natural disponible hasta el pasado siglo XIX, cuando su consumo fue superado por el azúcar de caña, y más tarde por azúcares derivados del maíz. Hoy en día se acepta que la miel puede ser además un alimento protector, ya que tiene un gran número de sustancias que actúan de esa manera, incluyendo el ácido ascórbico, péptidos pequeños, flavonoides, tocoferoles y enzimas, pudiendo ser una alternativa natural al uso de aditivos alimentarios para controlar el oscurecimiento enzimático durante el procesamiento de frutas y verduras, así como ingrediente en la elaboración de jugos y conservas alimenticias, y en muchos otros alimentos para inferirles propiedades sensoriales propias de la miel (Ulloa *et al.*, 2010).

El consumo de miel en México ha sufrido importantes incrementos en los últimos años, esto es debido a la tendencia generalizada por consumir productos de origen natural o que no contengan sustancias químicas en su elaboración (SAGARPA, 2013). El consumo se divide en dos categorías: la primera es el consumo directo y la segunda es por medio de productos industrializados donde se emplea la miel como un edulcorante, los principales productos que la ocupan son: leches endulzadas, cereales, yogurt y dulces típicos mexicanos entre otros (SAGARPA, 2013).

1.1.4. Producción de miel en México

Además de ser indispensable para nuestra agricultura, por la polinización de los cultivos que realizan las abejas, la apicultura es una actividad básica para la economía mexicana (Alvarez *et al.*, 2010). México se ubica entre los principales países productores y exportadores de miel a nivel mundial, ocupando el sexto lugar como productor y tercero como exportador mundial (PROFECO, 2015). En el cuadro 1.2 se muestra la producción de miel por cada estado del país para el año 2015.

**Cuadro 1.2.** Producción de miel en México 2015

Estado	Producción (Ton)	Precio (pesos por Kg)	Valor de la producción (miles de pesos)
Yucatán	11 629	35.61	414 099
Campeche	7 736	33.71	260 756
Chiapas	5 144	38.02	195 570
Jalisco	5 047	42.65	215 250
Veracruz	4 754	37.96	180 469
Oaxaca	3 826	40.30	154 158
Quintana Roo	3 480	35.57	123 755
Puebla	2 528	38.88	98 302
Guerrero	2 079	40.24	83 650
Michoacán	1 905	48.78	92 931
Morelos	1 655	46.21	76 461
Zacatecas	1 654	41.31	68 327
Hidalgo	1 320	40.49	53 448
México	1 097	44.70	49 039
Tlaxcala	1 088	40.77	44 354
San Luis Potosí	1 058	40.54	42 876
Guanajuato	803	44.88	36 016
Tamaulipas	666	38.45	25 602
Aguascalientes	616	40.46	24 928
Chihuahua	583	43.31	25 250
Sonora	526	44.25	23 263
Durango	462	45.73	21 140
Colima	408	38.76	15 804
Nayarit	358	36.72	13 150
Tabasco	341	39.19	13 362
Coahuila	266	45.97	12 207
Baja C. Sur	256	42.53	10 906
Sinaloa	192	42.79	8 205
Querétaro	135	39.89	5 376
Nuevo León	97	40.00	3 862
Distrito Federal	88	44.33	3 908
Baja California	87	43.00	3 752
NACIONAL	61 881	38.79	2 400 177

Fuente: Elaboración propia con datos del SIAP, con información de las delegaciones de la SAGARPA (2015).



Alemania es el país que nos compra la mayor parte de la miel que producimos. La península de Yucatán produce la mayor parte de la miel del país, más de una tercera parte de la miel proviene de los estados de Yucatán, Campeche y Quintana Roo. En el país existen 1.9 millones de colmenas a cargo de 42 mil apicultores (SAGARPA, 2015).

De acuerdo a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 2010) nuestro país está dividido en 5 regiones apícolas (Figura 1.3) por sus diferentes climas y flora, que influyen directamente en la composición del néctar y en el tipo de polen en la miel.



Figura 1.3. Regiones apícolas de México

Estas regiones se encuentran bien definidas por su grado de desarrollo y variedad de tipos de mieles en cuanto a sus características de humedad, color, aroma y sabor; estas regiones son:

1. **Región del Norte:** Caracterizada por la miel que se produce, principalmente de mezquite, miel extra clara ámbar cuya producción en su mayoría se destina al mercado de los EE.UU. El precio de esta miel es uno de los mejores a nivel nacional. Los estados que integran esta región son: Baja California, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Coahuila, Nuevo León, y parte del norte de Tamaulipas y altiplano de San Luis Potosí.



2. **Región de la costa del Pacífico:** Se caracteriza por producir mieles de origen multifloral y de mangle, siendo principalmente oscuras, aunque también se obtienen las de color ámbar y ámbar clara. Forman parte de esta región los estados de Sinaloa, Nayarit, poniente de Jalisco y Michoacán, Colima, parte de Guerrero, Oaxaca y Chiapas.
3. **Región del Golfo:** Posee una gran producción de cítricos, miel ámbar clara producida principalmente a partir de la flor del naranjo, siendo esta una miel muy apreciada en el mercado internacional, en especial el japonés. También se obtienen mieles oscuras y claras. Esta región se compone por el estado de Veracruz y parte de los estados de Tabasco, Tamaulipas y la región Huasteca de San Luis Potosí, Hidalgo y Querétaro.
4. **Región del Altiplano:** Se distingue por tener mieles ámbar y ámbar clara, la cual tiene mucha demanda en el mercado europeo. Su origen floral es el acahual y la acetilla. Esta región se compone de Tlaxcala, Puebla, México, Morelos, Distrito Federal, Guanajuato, Aguascalientes, parte oriental de los estados de Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, y parte poniente de Hidalgo y Querétaro, así como la región media de San Luis Potosí.
5. **Región Sureste o Península de Yucatán:** La más importante por su volumen de producción de miel y por ubicar a la mayor parte de los apicultores del país. La miel de esta zona goza de un gran prestigio nacional y sobretodo internacional ya que se caracteriza por tener su origen en floraciones únicas, como son la de Dzidzilche y de Tajonal, las dos por su excelente calidad destinadas en su mayoría a la venta en el Mercado Europeo

1.2. Biotecnología e Ingeniería Genética en plantas

La Biotecnología tiene como objetivo el desarrollo de productos comerciales que contribuyan de forma benéfica para la humanidad. Esta disciplina fue definida como la aplicación de los conceptos teóricos de la ingeniería genética, la microbiología, la bioquímica y la ingeniería química, para procesar materiales con el uso de agentes biológicos y proveer productos con mejor calidad.



Actualmente se sabe que tanto los microorganismos como las células de eucariontes superiores pueden ser modificados, transfiriendo unidades específicas de información genética de un organismo a otro para obtener organismos modificados con propiedades nuevas y útiles para el ser humano (Glick y Pasternak, 1998).

Los principales problemas a los que se enfrenta la industria agrícola son ocasionados principalmente por la competencia de las plantas con las malezas, el ataque de patógenos tales como bacterias, hongos o virus, y el ataque por plagas de insectos, roedores y aves. Todo esto ocasiona la reducción del volumen de cosecha y la consecuente pérdida económica para los productores de granos, frutas y hortalizas (Carrillo y Félix, 1996).

1.2.1. Definición de Organismos Genéticamente Modificados

Un organismo genéticamente modificado (OMG) se refiere a un organismo vivo cuyo genoma ha sido modificado por la introducción de un gen exógeno capaz de expresar una proteína adicional que confiere nuevas características, como por ejemplo, la tolerancia a herbicidas, resistencia a virus, antibióticos e insectos. El ADN exógeno se inserta generalmente en un gen “casete” (Figura 1.4) que consiste en un promotor de expresión (P), un gen estructural (región de codificación) y un terminador de expresión (T) (Mannelli *et al.*, 2003).

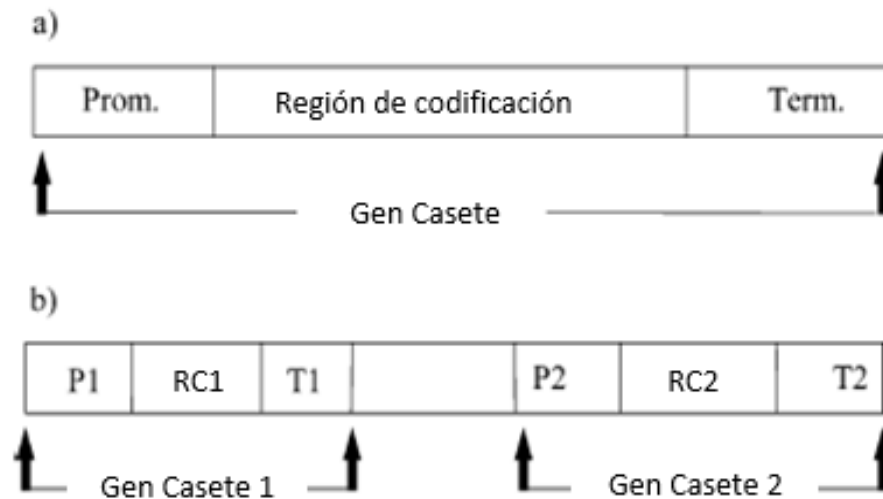


Figura 1.4. (a) Representación esquemática de un gen “casete” consiste de un promotor P, un gen estructural (región de codificación) y un terminador T; (b) Dos casetes integrados en el genoma hospedador.



Dos secuencias particulares son insertadas en la mayoría de los productos transgénicos disponibles: el promotor de la subunidad 35S del ARN ribosomal de virus de mosaico de la coliflor (35S) y el TNos del *Agrobacterium tumefaciens*. Ampliamente utilizados para la producción de muchos vegetales transgénicos disponibles comercialmente, como la soya, el maíz y el tomate (Mannelli *et al.*, 2003).

1.2.2. Tecnología del ADN recombinante

La Biotecnología de plantas y en particular la transferencia de material genético, representa una herramienta potencial para resolver problemas agrícolas con el mínimo riesgo, debido a que es una tecnología limpia, donde solo es modificada aquella característica que se quiere contrarrestar (Singh y Sansavini, 1998). Los métodos biotecnológicos y moleculares ofrecen una alternativa a las técnicas convencionales debido a que permiten introducir uno o más genes para la corrección de deficiencias de cultivares (Mehlenbaker, 1995). La transformación de genotipos altamente adaptados, y su producción, dependerá de la estabilidad de la integración del material genético foráneo al genoma de la planta, seguida por la propagación *in vitro* y la consecuente regeneración para producir plantas intactas que expresen la información deseada. (Singh y Sansavini, 1998).

La Tecnología de ADN Recombinante o Ingeniería Genética, permite aislar de un organismo la secuencia de interés de ADN y propagarlo en otro organismo, permitiendo obtener cantidades ilimitadas del producto codificado por dicho gen. En términos simples, la metodología consiste en tomar un fragmento de ADN, obtenido habitualmente por acción de enzimas de restricción, el que se une covalentemente por medio de una enzima ADN ligasa a un vector o plásmidio generando una molécula nueva conocida como recombinante. El vector que se utiliza contiene secuencias que permiten la replicación y secuencias que facilitan su selección. Estas últimas, en ocasiones son genes que confieren resistencia a antibióticos específicos. Luego, el ADN recombinante obtenido, se introduce en un microorganismo, el que se cultiva y selecciona por su resistencia al antibiótico. Al crecer, se expresa el gen de interés y se introduce en el vegetal que se desea modificar, obteniéndose el producto transgénico (Reyes y Rozowski. 2003). Las técnicas de transformación utilizadas para generar plantas transgénicas son (Rivera, 2006):



- **Transferencia mediada por el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.** Este es un sistema excelente y altamente eficiente, limitado principalmente a plantas monocotiledóneas.
- **Bombardeo con microproyectiles (biobalística).** Técnica utilizada en un amplio rango de plantas y tejidos. Es un método fácil y económico.
- **Vectores virales.** Una vía no muy efectiva para cultivos celulares y plantas completas.
- **Transferencia directa a protoplastos.** Puede usarse solo en protoplastos celulares de plantas que pueden ser regeneradas a plantas completas.
- **Microinyección.** Tiene uso limitado dado que sólo una célula puede ser inyectada. Además, requiere de entrenamiento altamente específico.
- **Fusión de liposomas.** Puede ser utilizado sólo en protoplastos.
- **Electroporación.** Generalmente limitado a protoplastos.

El cultivo de tejidos no es un prerequisite para llevar a cabo la transformación genética de plantas, pero es empleado en casi todas las prácticas comunes de transformación, para llevar la transferencia eficiente del gen y para la selección y regeneración de las transformantes (Gamborg y Phillips, 1995). En un sistema de cultivo de tejidos lo más importante es obtener un gran número de células regenerables que sean accesibles para la transformación genética y que puedan conservar la capacidad de regeneración durante la proliferación celular y los tratamientos de selección (Livingstone y Birch, 1995).

1.2.3. Miel Genéticamente Modificada en México

En 2012 surgió el problema del rechazo de mieles orgánicas de la Península de Yucatán en el mercado alemán por contener polen de soya GM. Una de las razones es que en México la superficie de soya GM cultivada en la Península se ha incrementado sustancialmente. A partir de 2010 se solicitó una autorización para sembrar Soya Roundup Ready (RR) en 12 mil hectáreas en la región. Y en febrero de 2012, al menos se quintuplicó la superficie solicitada por la compañía Monsanto: sólo en Yucatán solicitaron 60 mil hectáreas (CIBIOGEM, 2013). La SEMARNAT y la SAGARPA, decidieron autorizar la siembra de soya transgénica tolerante al herbicida glifosato de Monsanto (evento MON-04032-6) en 253 mil 500 hectáreas enfocadas a dicha actividad para el 2012, en los estados



de Yucatán, Campeche, Quintana Roo, Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz y Chiapas (GREENPEACE, 2013).

Actualmente, y debido a estas siembras comerciales y experimentales de soya GM en Yucatán y Campeche, algunos importadores de mieles alemanes mandan analizar muestras de esas producciones y han detectado secuencias GM, entre un 10 y un 13% en las mieles de la Península. Puesto que las cantidades presentes fueron lo suficientemente altas para ser detectadas, la consecuencia fue su rechazo por los importadores europeos de mieles orgánicas (Gálvez y Quirasco, 2013).

1.2.4. Regulación en México sobre el uso de transgénicos

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, esta tecnología como cualquier otra, puede tener riesgos. Por ello, la Organización de las Naciones Unidas (ONU), concertó e instrumentó a través de sus organismos, diferentes acuerdos, documentos y marcos jurídicos para el manejo responsable de los OGM. México firmó uno de esos documentos, el Protocolo de Cartagena, que establece el marco para el manejo transfronterizo de los OGM. Con base en este compromiso, el Senado de la República en el año 2000, elaboró una iniciativa de Ley de Bioseguridad para el manejo de los OGM (LBOGM) que se convirtió en Ley en 2005, cuando las dos Cámaras del Congreso la aprobaron. Estos dos mandatos constituyen el marco jurídico que tenemos en México para el manejo de los OGM. Como lo establece el Protocolo de Cartagena y la LBOGM, la evaluación del riesgo debe considerar las características del OGM, en particular el nuevo gen y la proteína para la que codifica, el análisis de todos los productos del metabolismo, y por ende de la composición de la planta, así como los efectos no intencionales de la modificación. Entre otras pruebas, se requiere la demostración de inocuidad mediante pruebas con diferentes animales de experimentación, tanto de las proteínas de origen transgénico, como del alimento en su conjunto (en el que las proteínas constituyen una cantidad mínima), a fin de garantizar un uso responsable de estos organismos, en beneficio de la salud humana, de la biodiversidad y del medio ambiente (AMC, 2013).



México adquiere semillas transgénicas como alimento de ganado. Existen centros de investigación que trabajan en el desarrollo de cultivares adecuados para las condiciones del país. También existen empresas en el área de la Salud que producen proteínas recombinantes humanas para el tratamiento de varias enfermedades y problemáticas clínicas.

Desde 1988, la SAGARPA ha evaluado la liberación experimental de OGM. En el marco de la LBOGM se han empezado a evaluar, más recientemente, los posibles usos y liberación de OGM por la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. En México los registros de los cultivares transgénicos están a nombre de compañías transnacionales: Monsanto y filiales, Bayer y filiales y Dow Agro Sciences. En marzo de 2013, la SAGARPA otorgó a la compañía Monsanto el primer permiso para la siembra de maíz transgénico a nivel piloto en Tamaulipas, fase previa para la comercialización del grano (AMC, 2013).

En el cuadro 1.3 y figura 1.5 se muestran los permisos de liberación al ambiente de cultivos genéticamente modificados en México, del 14 de junio de 2005 a diciembre de 2015, conforme la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGMs). Así como el tipo de solicitud durante el mismo periodo, mostrado en la figura 1.6.

Cuadro 1.3. Permisos de liberación de cultivos GM del año 2005 al 2015

Organismo	No. Permisos 2014	No. Permisos 2015	No. Permisos Totales
Alfalfa		1	3
Algodón	24	6	296
Frijol	1		1
Limón mexicano	3		3
Maíz			202
Soya	1		44
Trigo	1		41
TOTAL	30	7	590

Fuente: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, 2015).

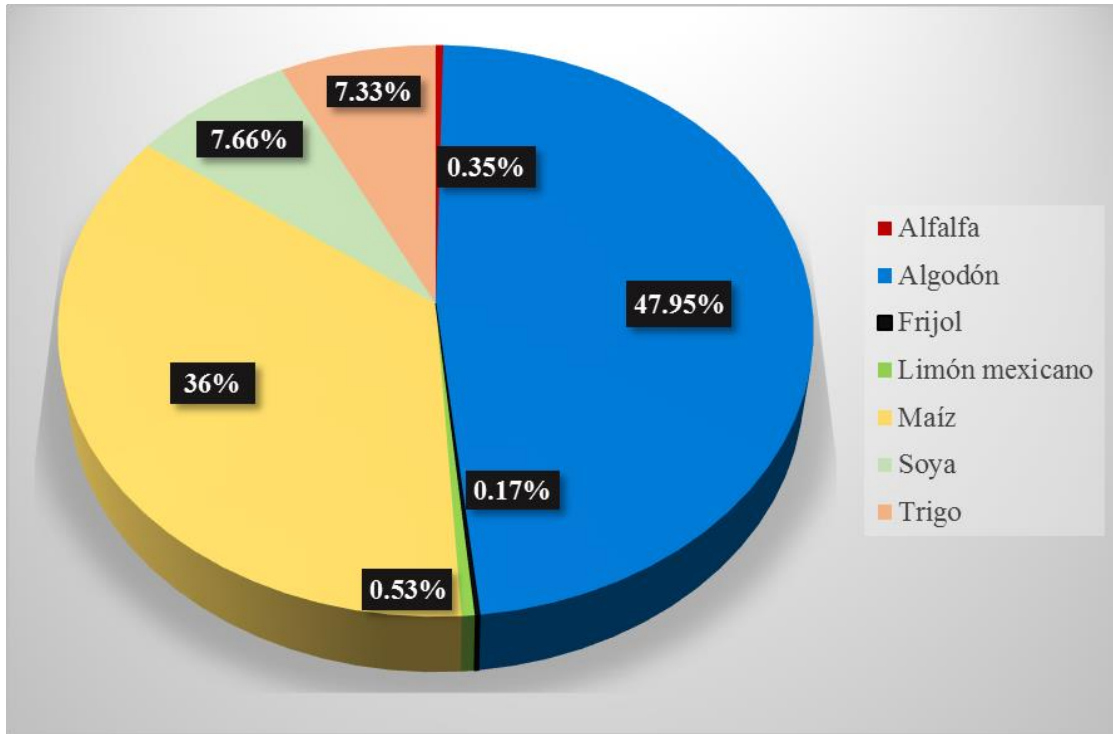


Figura 1.5. Porcentajes de cultivos GM permitidos para su liberación del 2005 al 2015.

Fuente: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, 2015).

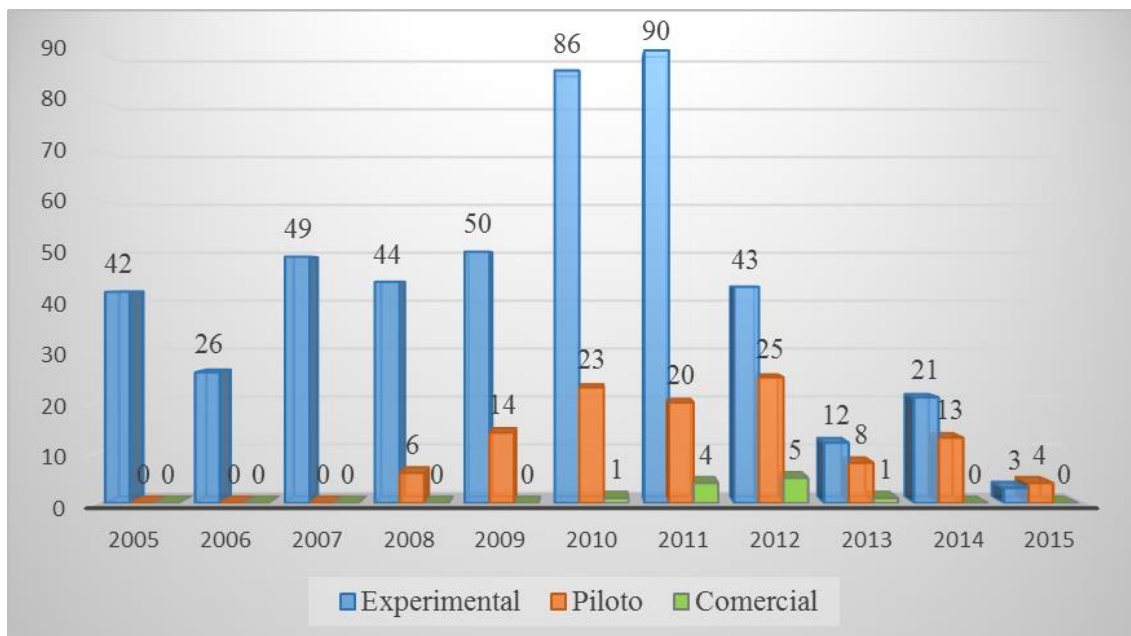


Figura 1.6. Permisos de liberación al ambiente de OGM por tipo de solicitud del 2005 al 2015.

Fuente: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, 2015).



Es relevante enfatizar que independientemente del marco jurídico existente para el uso responsable de los OGM, nuestro país carece de una política de Estado agropecuaria integral que contemple éstos y otros asuntos relevantes (como el de propiedad intelectual, la derrama de beneficios a los campesinos) para garantizar un uso más justo y equitativo del conocimiento y la tecnología en beneficio de la sociedad y la biota mexicana (AMC, 2013).

1.3. Métodos para la autenticación de alimentos

1.3.1. Métodos de análisis basados en la detección de proteínas

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

Las tecnologías de inmunoensayo con anticuerpos son ideales para la detección cualitativa y cuantitativa de muchos tipos de proteínas en matrices complejas cuando el analito diana es conocido (Brett *et al.*, 1999). En base a las concentraciones típicas de material transgénico en el tejido vegetal (> 10 g por tejido), los límites de detección de los inmunoensayos pueden predecir la presencia de proteínas genéticamente modificadas en un orden del 1% (Stave, 1999).

A continuación, se describen dos de las tecnologías más utilizadas en el análisis de proteínas para la detección y cuantificación de organismos transgénicos en alimentos no procesados.

1.3.1.1. ELISA

Los análisis 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 sin embargo, menos susceptibles 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. Una limitación tecnológica para utilizar el método ELISA como análisis rutinario es que se debe conocer previamente qué proteína concreta se busca en cada caso (por ejemplo, proteínas modificadas o transgénicos) y se deben desarrollar anticuerpos frente a esa proteína (López *et al.*, 2003).

El método ELISA puede ser útil para la detección de OGM's en materia prima, alimentos semielaborados e ingredientes procesados, siempre que la proteína expresada no esté degradada y pueda ser detectada (Ahmed, 1995). Sin embargo, debido a que el método tiene un poder de detección más bajo que los métodos de PCR, es menos sensible para el ensayo de productos alimenticios terminados con muchos ingredientes, sobre todo si el umbral de detección es bajo. Aunque las pruebas a base de proteínas son prácticas y eficaces, algunos productos transgénicos no expresan un nivel detectable de proteína (Ahmed, 1995).

1.3.1.2. Western Blot

Western Blot es un método altamente específico particularmente útil para el análisis de proteínas insolubles (Brett *et al.*, 1999). En esta técnica se aplica la electroforesis en gel de poliacrilamida para la separación y caracterización de proteínas. La técnica se realiza usando una corriente eléctrica "electrotransferencia". Como muchas proteínas funcionales están compuestas de dos o más subunidades, los polipéptidos individuales se separan por electroforesis en presencia de un detergente (Dodecil Sulfato de Sodio), que desnaturaliza las proteínas. Después de la electroforesis, las proteínas se detectan comúnmente por tratamiento con azul de Coomassie o solución colorante de plata. Sin embargo, los polipéptidos separados en el gel también pueden ser transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Después de la transferencia, la proteína de interés específica se identifica colocando la membrana con las proteínas inmovilizadas en una solución que contiene un anticuerpo para la proteína. Los anticuerpos no unidos se eliminan luego de la membrana por lavado, y la presencia del anticuerpo inicial (primario) se detecta colocando la



membrana en una solución que contiene un anticuerpo secundario, el cual reacciona con las inmunoglobulinas (grupo de proteínas que contienen todos los anticuerpos) en general. El anticuerpo secundario se conjuga ya sea con un isótopo radiactivo (que permite la autorradiografía) o una enzima que produce un producto visible cuando se agrega el sustrato adecuado (Gardner *et al.*, 2002).

1.3.1.3. Enfoque Isoeléctrico

El enfoque isoelectroenfoque (IEF) es un método electroforético para la separación de proteínas, de acuerdo con sus puntos isoelectroenfoque (pI), en un gradiente de pH estabilizado. El método consiste de un medio de soporte, por lo general un gel de poliacrilamida, pero también se puede utilizar uno de agarosa, que contiene una mezcla de anfolitos portadores (ácidos poliamino-policarboxílico sintéticos de bajo peso molecular). Cuando se aplica un campo eléctrico a través del gel, los anfolitos portadores se disponen en orden creciente según su punto isoelectroenfoque desde el ánodo al cátodo. Cada anfolito portador mantiene un pH local correspondiente a su pI y por lo tanto se genera un gradiente de pH uniforme a través del gel. Si se aplica una muestra de proteína a la superficie del gel, también migrará bajo la influencia del campo eléctrico hasta que alcanza la región del gradiente en el que el pH corresponde a su punto isoelectroenfoque. A este pH, la proteína no tendrá ninguna carga neta y por lo tanto se volverá estacionaria en este punto. Por tanto, la proteína queda atrapada o "enfocada" en el valor de pH en el que tiene la carga cero. Las proteínas se separan en función de su carga, y no de su tamaño como ocurre en la electroforesis en gel (Walker, 1994).

1.3.2. Métodos de análisis basados en la detección de ADN

Los métodos analíticos basados en la detección de ADN suelen emplearse cuando el alimento ha sido procesado o tratado fisicoquímicamente (calor, presión, etc.), ya que la proteína puede haberse desnaturalizado o degradado en el proceso, y los métodos analíticos de proteína se ven afectados por estos cambios. En cambio, el ADN es más termoestable que la mayoría de las proteínas, por lo que es menos susceptible a ser degradado durante el procesamiento de los alimentos, no obstante, aun degradado parcialmente permite identificar diferencias. Las técnicas con marcadores de ADN son más sensibles, además de



que el ADN está presente en la mayoría de las células de un organismo, y con la misma información independientemente del tejido (López et al., 2003).

Para la detección de ADN se utilizan dos técnicas, la técnica Southern Blot y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La primera, tiene su principal aplicación en la confirmación de resultados obtenidos en la detección de transgénicos y la segunda es una técnica muy extendida tanto para la detección de transgénicos como en la identificación de especies (Ahmed, 2002).

1.3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica de PCR se utiliza para la amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos. En las últimas dos décadas, la PCR se ha convertido en un recurso integral para la mayoría de los laboratorios de biotecnología en todo el mundo. Es una herramienta de gran alcance, ya que es sensible y específica en la amplificación de ADN (Rakshit, 2010).

La idea de utilizar la ADN polimerasa termorresistente de bacteria termófila *Thermus aquaticus*, fue descrita en 1969 por Brock y Freeze, dando origen a la moderna técnica de PCR. La técnica de PCR fue desarrollada en 1985 por K. Mullis, quien recibió el Premio Nobel de Química en 1993 por este descubrimiento. Dentro de pocos años de su invención, la PCR ha sido ampliamente utilizada para diversos fines, por lo que es uno de los acontecimientos más espectaculares de la historia de la Biología Molecular (Holst *et al.*, 2003).

Fue hasta la introducción de las ADN polimerasas termoestables que se hizo ampliamente aplicable (Holst, 2003). Las ADN polimerasas han revolucionado la Biología Molecular con su capacidad para amplificar pequeñas cantidades de ADN *in vitro*. Durante los últimos años su uso en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha superado un importante factor limitante en el problema cuantitativo de pequeñas cantidades de ADN disponibles para las pruebas (Drouin *et al.*, 2007).

1.3.3.1. Fundamento de la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) implica un conjunto de tratamientos desarrollados *in vitro* sobre una región de ADN para su amplificación selectiva. El proceso requiere el conocimiento previo de la secuencia de dos regiones cortas que flanqueen a la



que se pretende amplificar; estas regiones son utilizadas como cebadores en la reacción de elongación catalizada por la polimerasa, para lo cual es necesario previamente conseguir su asociación al ADN molde desnaturalizado (Perera, 2002). La amplificación del ADN por PCR requiere de un ADN molde, el cual contiene la región objetivo. Los mejores resultados se obtienen mediante el uso de ADN bien purificado carente de contaminación por ARN o proteína. Se requieren dos cebadores que determinen el inicio y el final de la región a amplificar. La elección de los cebadores es crítica, y varios factores deben ser cuidadosamente considerados, por ejemplo, la temperatura de fusión (T_m), que se define como la temperatura a la cual la mitad de los sitios de unión del cebador están ocupados, contenido de guanina y citosina (G y C), la presencia de estructuras secundarias. La secuencia de los cebadores debe ser tal que no permita la formación de horquillas o híbridos entre ellos. La elección de la ADN polimerasa depende de la aplicación específica. Los desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) son los monómeros de los cuales la ADN polimerasa sintetiza el nuevo ADN. El buffer empleado para la reacción de PCR mantiene el pH en un nivel óptimo para la polimerasa. Los cationes bivalentes (Mg^{2+}) y cationes monovalentes (K^+ , Na^+ o NH_4^+) son necesarios para neutralizar las cargas negativas de los grupos fosfato del ADN y para estabilizar los híbridos ADN / ADN. La reacción de PCR se lleva a cabo en un termociclador que calienta y enfría sucesivamente los tubos de reacción a las temperaturas precisas y para los periodos específicos requeridos para cada etapa de la reacción.

La PCR es una herramienta poderosa, pero los errores y equivocaciones pueden ocurrir fácilmente. La reacción de la polimerasa es muy sensible a diferentes variables. Los cationes divalentes, especialmente Mg^{2+} , juegan un papel importante en la estabilidad de los nucleótidos y afectan a la actividad de polimerización de las ADN polimerasas (Drouin et al., 2007).

1.3.3.2. Etapas de la PCR

La técnica de PCR por lo general consiste de tres etapas principales: desnaturalización, hibridación o alineamiento del cebador y extensión (Figura 1.7), los cuales se repiten de 20 a 30 ciclos (Pelt-Verkuil et al., 2008).



Desnaturalización: La muestra de ADN se desnaturaliza inicialmente con el fin de desenrollar y separar la doble hélice de ADN en cadenas sencillas. Esto se consigue normalmente mediante el calentamiento de la muestra de ADN en un entorno acuoso, por lo general a una temperatura de 94 ° C durante 30 segundos a 5 minutos.

Alineamiento: La hibridación de los cebadores de oligonucleótidos específicos a cada hebra se consigue mediante la reducción de la temperatura de la mezcla de reacción a la temperatura de hibridación (T_m) que se fija por lo general entre 40°C y 65°C (dependiendo del diseño de las secuencias de oligonucleótidos utilizados como cebadores).

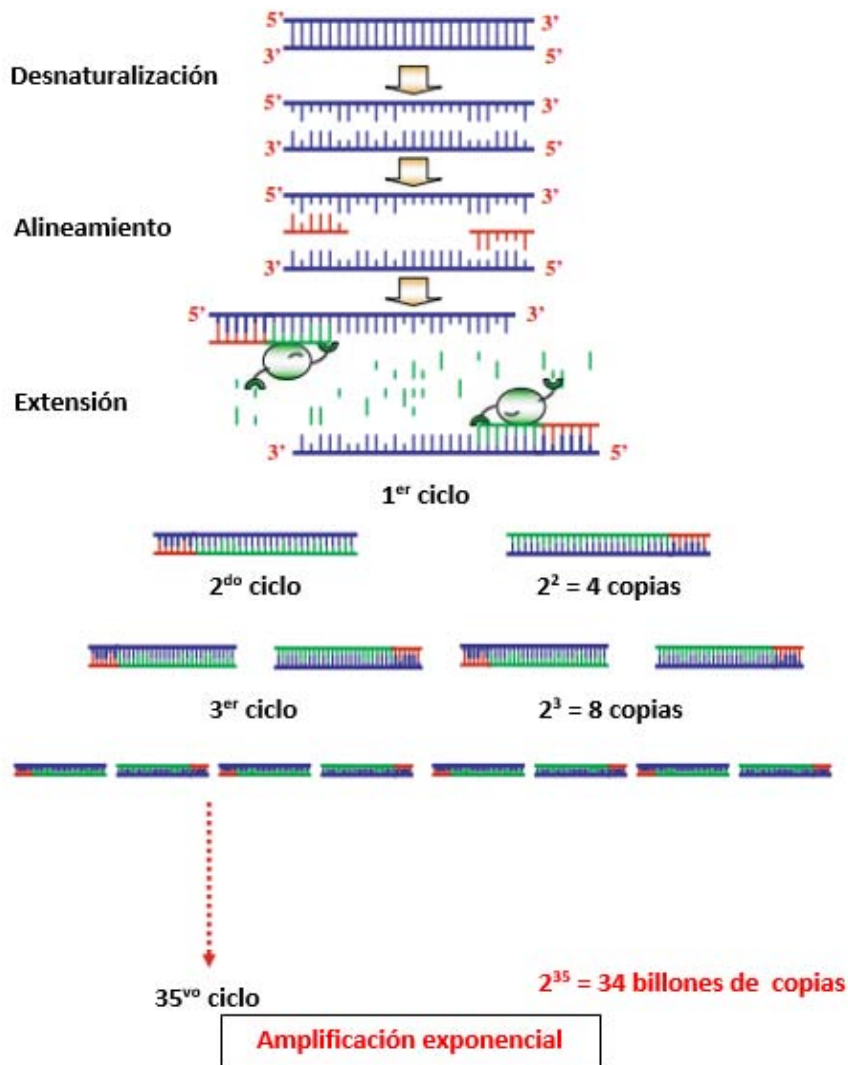


Figura 1.7. Etapas de la PCR



Extensión: Después de la etapa de hibridación de los cebadores, la temperatura se eleva a aproximadamente 72°C, (una temperatura óptima para la ADN polimerasa termoestable mediada por la replicación de la hebra de ADN), y todo el ciclo se repite un número predeterminado de veces.

Después de cada ciclo de replicación, cada nueva molécula sintetizada de ADN de doble cadena (conocido como amplicón) contiene secuencias terminales, las cuales son complementarias a las secuencias de los cebadores utilizados. Este proceso permite que cada amplicón sirva como una plantilla para la replicación en los posteriores ciclos de PCR, resultando en una duplicación teórica (amplificación exponencial) del número de moléculas diana durante cada ciclo (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

1.3.3.3. Componentes de la PCR

1) Secuencia a amplificar o secuencia blanco: El ADN portador de la secuencia a amplificar puede incorporarse a la reacción en forma mono o bicatenaria. Aunque su tamaño no es un factor crítico, la amplificación de secuencias presentes en un ADN muy grande produce mejor rendimiento si se fragmenta previamente (Perera, 2002).

La adición de ADN a la reacción implica su previa extracción de la célula o del tejido y la solubilización en agua. Es requerida una concentración adecuada para lograr una amplificación óptima, si la concentración de ADN es menor es probable que no se visualice una banda clara en el gel, por otro lado, si la concentración es muy alta, la ADN polimerasa probablemente no podrá actuar sobre las cadenas desnaturalizadas de ADN (Sambrook y Russell, 2001). Gracias a la alta especificidad de la reacción de PCR, la secuencia no ha de ser previamente purificada: a partir de un extracto crudo se consigue fácilmente su amplificación (Perera, 2002).

2) Cebadores: El tipo de cebador que se utilice en la PCR dependerá del tipo de identificación que se requiera. Se utilizarán cebadores específicos, diseñados a partir de una secuencia de ADN conocida previamente y complementarios de la misma. Habitualmente la longitud de los oligonucleótidos utilizados para cebar la reacción de PCR suele ser del rango de 15 a 30 nucleótidos. Cuanto mayor sea su tamaño, mayor es la posibilidad de que se asocien a secuencias no perfectamente complementarias y conduzcan a la amplificación



de productos no específicos; para las mismas condiciones de reacción, cuanto más corto sea el cebador, más perfecta tiene que ser su complementariedad con el molde, y más específica será la amplificación. La composición de bases de los cebadores es importante por el efecto que tiene sobre la estabilidad del híbrido, lo ideal es que tenga un 50% de GC. Si el porcentaje es inferior interesa que tenga una mayor longitud, para evitar una baja temperatura de fusión. Deben evitarse secuencias con bases repetidas (más de 3 o 4 seguidas), para dificultar uniones incorrectas (Perera, 2002).

Los cebadores han de estar presentes en la reacción a una concentración adecuada. Su ausencia detiene el proceso de amplificación, pero una cantidad excesiva puede provocar su unión inespecífica y la amplificación de secuencias no deseadas (Perera, 2002).

3) ADN polimerasa termoestable: La actividad más utilizada hoy en día para la amplificación por PCR es la ADN polimerasa *Taq*. (Perera, 2002). Procedente de la bacteria *Thermus aquaticus*, enzimáticamente activa a temperaturas relativamente altas. La estabilidad de la polimerasa a temperaturas de hasta 95°C permite que recupere su actividad al enfriarse de nuevo evitando así reponer la enzima en sucesivos ciclos (Herráez, 2012). La actividad polimerasa va acompañada de una exonucleasa 5' → 3', pero carece de exonucleasa 3' → 5' por lo que no son capaces de corregir los errores producidos en la elongación (Perera, 2002).

4) dNTP's en exceso: Son nucleótidos sintéticos que no forman ninguna secuencia al inicio de la reacción, es decir, son el sustrato de la enzima ADN polimerasa y serán los componentes de miles de copias de fragmento diana al final de la reacción. Pueden denominarse como dATP's, dTTP's, dGTP's y dCTP's. (Sambrook y Russell, 2001). Para ser reconocidos por la polimerasa, deben ir acompañados de Mg²⁺ que es, además, una coenzima requerida por la polimerasa (Herráez, 2012).

1.3.3.4. Ventajas y desventajas de la técnica

El gran nivel de amplificación que consigue a partir de muestras de ADN extraordinariamente escasas, convierte a la PCR en una técnica analítica insustituible. Sin embargo presenta una importante limitación: produce una alta tasa de errores en la incorporación de dNTP's; la polimerasa *Taq* carece de actividad exonucleasa 3' → 5' y por



lo tanto, de la capacidad para la revisión del nucleótido incorporado y en su caso, para su degradación y sustitución por el correcto. Esto provoca la incorporación de errores con una frecuencia de alrededor de 1×10^{-4} por ciclo (Perera, 2002).

La especificidad es muy elevada. Esta característica, está determinada especialmente por la secuencia de los dos cebadores utilizados y por las condiciones de hibridación. Si la temperatura de hibridación se reduce en exceso se producen falsos positivos, debidos fundamentalmente, a emparejamientos imperfectos del cebador con secuencias distintas de la diana. La capacidad de detección (sensibilidad) es muy alta, tanto que la PCR puede permitir detectar una única molécula de ADN en casi cualquier tipo de muestra de cualquier tejido. Sin embargo, esta característica supone también un elevado riesgo de contaminación por moléculas de origen ajeno a la muestra (Herráez, 2012). Aunque la tecnología de PCR tiene limitaciones obvias, el potencialmente alto grado de sensibilidad y especificidad explica por qué ha sido la primera opción de la mayoría de los laboratorios de análisis interesados en la detección de organismos genéticamente modificados (Holst *et al.*, 2003).

1.3.3.5. Análisis de los productos de la PCR

La electroforesis en gel es una técnica que se emplea para separar macromoléculas en función de la carga eléctrica, el tamaño y otras propiedades físicas. Consiste en aplicar corriente eléctrica a las moléculas para que atraviesen una capa de gel. La corriente eléctrica de un electrodo repele las moléculas, al tiempo que el otro electrodo las atrae. La fuerza de fricción del material de gel actúa como tamiz molecular, separando las moléculas en función de su tamaño. Cuando se aplica un campo eléctrico a un gel con pH neutro, los grupos fosfato del ADN cargados negativamente lo harán migrar hacia el ánodo (Somma y Querci, 2007).

Según Perera (2002), los factores que constituyen la base de esta técnica son:

➤ La matriz o soporte reticulado a través del que han de desplazarse las moléculas que se analizan. Su entramado tridimensional forma huecos cuyas dimensiones deben permitir el paso de aquellas. Un entramado denso produce poros pequeños y las moléculas de tamaño similar o mayor encuentran gran resistencia en su movimiento y resultan retrasadas (efecto tamiz). El grado de reticulación que se puede lograr en la matriz es



determinante para definir el rango de tamaño de las moléculas que se pueden separar y el nivel de definición que se puede conseguir. En el trabajo con ácidos nucleicos se utilizan básicamente dos tipos de soportes: los geles de agarosa y los de poliacrilamida.

- La disolución tampón o buffer de electroforesis, imprescindible para ofrecer una conductividad adecuada en el medio, mediante la aportación de una concentración moderada de iones, y para mantener un valor constante de pH a lo largo de todo el proceso, asegurando una carga constante en las moléculas que se están preparando.
- El campo eléctrico, causante directo del movimiento de las moléculas. Depende a su vez, de la diferencia de potencial aplicada por la fuente de tensión y de la resistencia que presentan el soporte y el tampón de electroforesis.
- La temperatura, cuyo aumento, resultado del paso de corriente y de la resistencia presentada por el medio y el soporte, puede afectar negativamente tanto a la integridad del soporte como a la estructura de las propias moléculas, que podrían incluso desnaturalizarse.
- La estructura y naturaleza de las moléculas a separar, en concreto su carga, su tamaño y su forma. La movilidad de una molécula cualquiera aumenta con su carga y disminuye con su tamaño.

Para visualizar los fragmentos de ADN después de la electroforesis, el gel se sumerge en una solución que contiene bromuro de etidio. Esta molécula se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos y emiten fluorescencia roja-naranja cuando se excita con la luz ultravioleta. Una vez teñido, el gel se analiza bajo una lámpara U.V. y las moléculas de ADN unidas al bromuro de etidio se vuelven visibles (Tagu y Moussard, 2006). Como marcadores de tamaño o peso molecular se suelen utilizar mezclas de fragmentos de restricción procedentes de ADN plasmídico o viral (Perera, 2002).

Electroforesis en gel de agarosa: La agarosa es un polisacárido de estructura lineal, soluble en medios acuosos a 100°C. Cuando la disolución se enfría, la agarosa gelifica, formando un reticulado microscópico por cuyos poros pueden desplazarse moléculas de ácidos nucleicos de dimensiones medias (hasta 40-50 kb) cuando se les coloca en un campo eléctrico. La electroforesis en gel de agarosa es un método comúnmente utilizado para separar moléculas de ADN y ARN de diferentes tamaños, pero puede ser también utilizado



para evaluar la calidad del ADN y proporciona información útil con respecto a la cantidad de ADN en una solución (Perera, 2002).

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE): La poliacrilamida es un polímero formado a partir de acrilamida y N-N'-metilenbisacrilamida. La concentración de ambos reactivos define el grado de reticulación del gel, que es bastante superior al conseguido en los geles de agarosa. Los geles de poliacrilamida son estables química y mecánicamente en un amplio rango de pH y temperatura. Su gran ventaja frente a los geles de agarosa es que presentan mayor poder de separación al permitir una mayor densidad de reticulación, una red más tupida y unos poros menores. En el trabajo con ácidos nucleicos, este tipo de electroforesis se suele aplicar al análisis de fragmentos pequeños (5-500 pb) donde se consigue mejores resultados que los geles de agarosa, por ejemplo, en el aislamiento y purificación de pequeños fragmentos de ADN amplificados. (Perera, 2002).



CAPÍTULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. Objetivos

Objetivo general

Identificar la presencia de polen transgénico en miel de abeja (*Apis mellifera*), empleando el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para la amplificación e identificación de fragmentos recombinantes en el ADN del polen proveniente de organismos genéticamente modificados.

- **Objetivo Particular 1**

Extraer polen a partir de miel de abeja mediante diluciones, centrifugaciones y lavados, para posteriormente llevar a cabo la extracción de ADN.

- **Objetivo Particular 2**

Obtener y cuantificar el ADN del polen de todas las muestras de miel de abeja mediante el método de extracción de Sambrook, para posteriormente llevar a cabo la PCR.

- **Objetivo Particular 3**

Definir las zonas de amplificación mediante el análisis de secuencias de ADN genéticamente modificado, para la selección de los cebadores que serán utilizados en la PCR.

- **Objetivo Particular 4**

Comprobar la amplificación de las zonas de interés en función de cebadores seleccionados, previamente diseñados para la detección de los transgenes CaMV 35S y T-NOS, aplicando la técnica de PCR, para asegurar su posterior utilización.

- **Objetivo Particular 5**

Evaluar experimentalmente las muestras de miel aplicando la técnica de PCR, para identificar la presencia de polen transgénico.



2.2. Justificación del proyecto

El estudio de los alimentos transgénicos ha generado gran controversia entre la sociedad desde hace algunos años debido a que no se tiene suficiente conocimiento acerca del tema por parte de la mayoría de la población. Esto se debe a que hasta el momento no se tienen evidencias contundentes sobre la plena seguridad del consumo de este tipo de alimentos, además de los impactos que pueden generar al ambiente, como es el caso de la contaminación y pérdida de cultivos nativos.

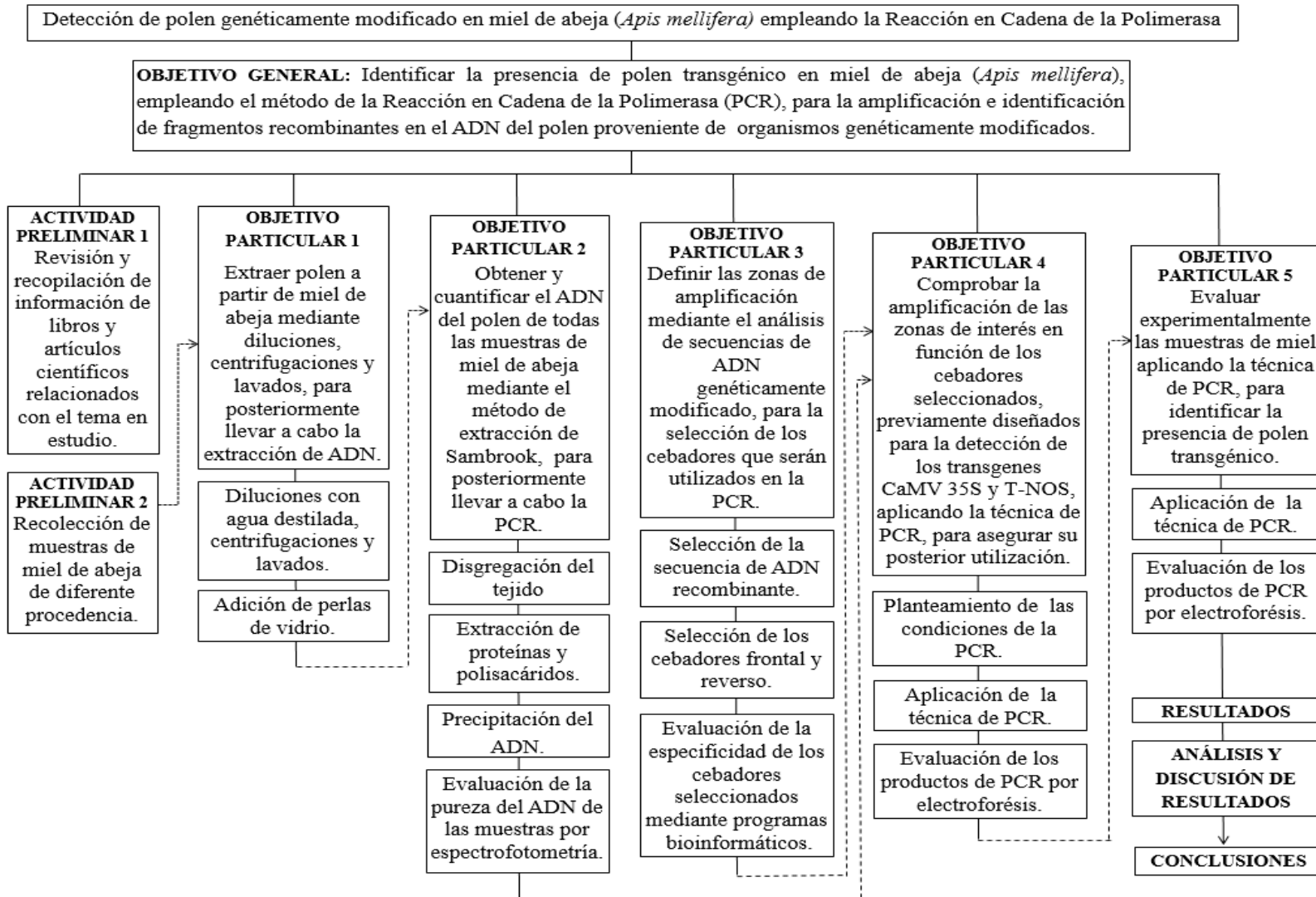
Aunado a lo anterior, en los últimos años se ha desarrollado una problemática en cuanto a la contaminación de mieles con polen transgénico, debido a que las abejas visitan los cultivos genéticamente modificados, colectan el polen, lo transportan al panal y termina en las mieles, lo que demerita su calidad en el mercado orgánico. México es uno de los principales exportadores de miel a nivel mundial, siendo uno de sus principales mercados el continente Europeo, donde los transgénicos no son muy bien vistos, por lo que la problemática antes mencionada, deriva en el rechazo del producto en el mercado internacional, con un consecuente impacto negativo para los apicultores. Por todo lo anterior, es importante el estudio de la problemática de mieles contaminadas con polen transgénico, ya que es necesario conocer los alcances y el grado de contaminación que hasta el momento se han producido gracias a los cultivos de organismos genéticamente modificados en nuestro país.

2.3. Hipótesis

Si al analizar el ADN del polen de miel de abeja (*Apis mellifera*) es encontrada la secuencia del promotor CaMV y/o el terminador T-Nos, entonces se podrá deducir que se trata de polen proveniente de organismos genéticamente modificados.



2.4. Cuadro metodológico





2.5. Material

2.5.1. Material biológico

Para llevar a cabo el estudio se consiguieron doce muestras de miel de abeja tanto en mercados como en centros comerciales de diferente procedencia, estas se muestran en el cuadro 2.1.

Cuadro 2.1. Muestras de miel de abeja analizadas

Nº muestra	Marca	Nomenclatura	Procedencia
1	Realkab	R	Yucatán
2	*SM	C4	Estado de México (FESC C4)
3	Carlota	CA	*NR
4	*SM	K	Estado de México
5	Abel Ha	AH	Yucatán
6	Nutrisa	N	*NR
7	*SM	SL	San Luis Potosí
8	Muuk´Kaab	MK	Yucatán
9	Karo	Ka	*NR
10	*SM	X	Xochimilco
11	*SM	CY	Coyoacán
12	*SM	A	Estado de México (Atizapán)

*SM: Sin marca

*NR: No reportado

2.5.2. Reactivos

A continuación se presentan los reactivos utilizados para cada uno de los métodos.

Extracción de polen de la miel

↗ Agua destilada.

↗ Perlas de vidrio.

Extracción de ADN

↗ Solución de lisis (Tris-base 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 250 mM, SDS 0.3%, pH=8).

↗ Enzima proteinasa K *Promega*®.

↗ Mezcla Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico, en proporción 25:24:1.

↗ Etanol frío.

↗ Agua libre de nucleasas.



Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

- Kit para PCR *Promega*®, el cual contiene: Mezcla Master Mix (50 unidades de Taq ADN polimerasa, 400 μ M de cada dNTP y 3 mM de $MgCl_2$).
- Agua libre de nucleasas.
- Cebadores frontal (F) y reverso (R).
- ADN del polen de todas las muestras de miel (concentración de 40-80 ng/ μ L).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (directa)

- Kit para PCR directa *Thermo Scientific Phire Plant Direct*®, el cual contiene: un buffer que incluye dNTPs y 1.5 mM de $MgCl_2$ (2X Phire Plant PCR Buffer), una enzima (Phire Hot Start II DNA Polymerase) y un buffer de dilución.
- Agua libre de nucleasas.
- Cebadores frontal (F) y reverso (R).

Electroforesis

- Agarosa *Gibco ERL*.
- Tris acetato y EDTA (TAE 1X) como solución buffer, pH=8.
- Bromuro de etidio (BrEt).
- Marcador de peso molecular *Promega*®.
- Tinte cargador azul/naranja 6X *Promega*®.

2.5.3. Equipo

- Balanza analítica electrónica, *Sartorius*.
- Juego de micropipetas *Rainin* de 0.5-1000 μ L.
- Agitador Vortex *Genie K-550-G*.
- Microcentrífuga *Minispin plus Eppendorf*.
- Termoblok *Thermomixer compact Eppendorf*.
- Nanoespectrofotómetro *Accesolab ND-1000*.
- Termociclador.
- Horno de microondas *Mirage JMI-010*
- Cámara de electroforesis.



➤ Trasluminador de luz UV *Cleaver Scientific LTD.*

➤ Equipo de fotografía para luz UV *Kodac Digital Science.*

2.6. Métodos

2.6.1. Extracción de polen

Antes de realizar la extracción de ADN, se desarrolló el método descrito por Narváez (2013) para la obtención de polen, basado en diluciones, centrifugaciones y lavados, con el fin de eliminar los azúcares y otros componentes naturales de la miel, mismo que se describe a continuación:

Se colocaron 50 mL de miel en un vaso de precipitado y se añadieron 50 mL de agua destilada, se mezcló y calentó a 70 °C durante 10 minutos. Enseguida se dividió la mezcla bien homogeneizada en 7 tubos de 14 mL cada uno. Se llevó a centrifugación a 4 500 rpm durante 30 minutos (revisando que se formara un pellet en las paredes de los tubos), posteriormente se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de cada tubo con 1 mL de agua destilada. Se mezcló el volumen de los 7 tubos en uno solo y se realizó una segunda centrifugación a 4 500 rpm, esta vez durante 15 minutos. Se decantó el sobrenadante y nuevamente se resuspendió el pellet con 1 mL de agua destilada para realizar una última centrifugación a 4 500 rpm durante 10 minutos. Finalmente se decantó el sobrenadante (el pellet obtenido contenía el polen de la muestra de miel) y se agregó 200 µL de agua destilada, se agitó y se trasladó la muestra a un tubo Eppendorf estéril de 2 000 µL. Algunas características que proporcionan su estructura química a los gránulos de polen son resistencia, dureza y flexibilidad, por lo cual una vez extraído el polen de la miel, se adicionó perlas de vidrio y se dejó reposar durante el resto del día y la noche, lo cual ayudó con la disrupción de la pared y membrana celulares de los gránulos de polen, facilitando de este modo la liberación del ADN de interés.

2.6.2. Extracción de ADN a partir del polen

Para la extracción de ADN de las muestras de polen, se lleva a cabo el protocolo descrito por Sambrook y Russel (2001) el cual se basa en la disolución del tejido de la muestra usando detergentes y una enzima proteinasa, extracción de proteínas y polisacáridos con



ayuda de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, y finalmente la precipitación de ADN con etanol. A continuación se presenta a detalle el protocolo antes mencionado.

A la muestra de polen obtenida se adicionaron 1 250 μ L de solución de lisis (Tris-base 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 250 mM, SDS 0.3%, pH=8) y se agitó con ayuda del Vortex (Figura 2.1) con el fin de homogeneizar la muestra. Posteriormente se adicionaron 7 μ L de enzima proteinasa K y se incubó a 50°C a 300 rpm durante dos horas en el Termoblok (Figura 2.2) con el fin de activar la enzima y una hora más a 60°C a 300 rpm para desactivarla.



Figura 2.1. Agitador
Vortex Genie K-550-G



Figura 2.2. Termoblok
Thermomixer compact eppendorf

Para la extracción de proteínas y polisacáridos, se adicionaron 250 μ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico a la muestra con la enzima inactiva y se mezcló suavemente por inversión de forma manual, posteriormente se llevó a centrifugación a 10 000 rpm durante 10 minutos con ayuda de la microcentrífuga (Figura 2.3).



Figura 2.3. Microcentrífuga
Minispin plus eppendorf



Enseguida se observó una separación de fases, de la cual se recuperó cuidadosamente la parte acuosa superior, la cual contenía el ADN y ésta se trasladó a dos nuevos tubos eppendorf estériles. Finalmente para la precipitación de ADN, se adicionaron 1 000 μL de etanol frío a cada tubo que contenía el ADN recuperado y se mezcló suavemente por inversión de forma manual, enseguida se llevó a centrifugación a 10 000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se decantó el etanol y se dejó secar el ADN colocando los tubos en el termoblok a una temperatura de 37°C durante aproximadamente una hora. Por último, se adicionó 50 μL de agua libre de nucleasas para resuspender el ADN y se agitó suavemente de forma manual para lograr su completa disolución. La extracción de ADN se realizó por duplicado para cada una de las muestras en estudio.

2.6.3. Cuantificación de ADN por absorbancia a 260/280 nm

El método más común para cuantificar ADN es por una medición de absorbancia. Los ácidos nucleicos absorben luz a una longitud de onda de 260 nm, por lo que la concentración de estos suele determinarse midiendo a 260 nm y comparando con un blanco (Somma, 2007). Este método es útil para preparaciones de ácidos nucleicos altamente puras, pues se detecta cualquier compuesto que absorbe la luz significativamente a 260 nm, lo cual incluye: ADN, ARN, EDTA y fenol. La relación de absorbancia 260 nm se utiliza como prueba de contaminación de una preparación de ADN y ARN con proteínas, puesto que los aminoácidos aromáticos absorben luz a 280 nm. En este caso, sólo un nivel significativo de proteína en la preparación puede causar un cambio significativo en la relación de absorbancia de ambas longitudes de onda (Sambrook y Russell, 2001).

Para cuantificar la cantidad de ADN, las lecturas se toman a 260 y 280 nm. La relación entre las lecturas proporciona un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. Preparaciones puras de ADN tienen valores de 1.8, mientras que valores de/o por encima de 2, muestran la existencia de preparaciones puras de ARN. Si existe contaminación significativa con fenol o proteínas, la relación 260/280 será menor de 1.7, entonces no es posible cuantificar el ADN presente en la solución (Sambrook y Russell, 2001). A continuación se describe el método:

La cuantificación de ADN obtenido en el punto 2.5.1 se llevó a cabo en un nanoespectrofotómetro (Figura 2.4), el cual se encontraba conectado a una computadora.



En primer lugar fue necesario calibrar el equipo colocando 2 μL de agua libre de nucleasas en el brazo del mismo, a continuación se ingresó al programa Nanodrop y se seleccionó la opción de ácidos nucleicos, se limpió el sensor con ayuda de un pañuelo y se colocó nuevamente 2 μL de agua libre de nucleasas, se registró como blanco y se corrió el programa (todos los valores debían dar cero). Posteriormente se colocaron 2 μL de la muestra de ADN a cuantificar y se corrió el programa, finalmente se obtuvo y registró la concentración de ADN proporcionada por la relación 260/280.



Figura 2.4. Nanoespectrofotómetro
Accesolab ND-1000

2.6.4. Localización de las secuencia de CaMV y T-NOS

Para localizar el gen de la secuencia de los cebadores disponibles para la identificación de transgénicos, la posición de la misma y el tamaño del amplificado, se empleó el programa bioinformático Mitomap (ver anexo), en el cual se encontró la secuencia del promotor del Virus del Mosaico de la Coliflor en el gen CaMVgp7, ubicando el cebador frontal de la posición 7 190 a la 7 208 y para el cebador reverso de la posición 7 366 a la 7 385 dando como resultado un amplificado de 195 pares de bases. En el caso de la secuencia de T-NOS localizada en el gen que codifica la Nopalina Sintetasa, el cebador frontal se ubicó de la posición 1 885 a la 1 904 y en el caso del cebador reverso de la posición 2 045 a la 2 064, dando como resultado un amplificado de 180 pares de bases.



2.6.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Preparación de la reacción

La estandarización de las concentraciones de los componentes principales de la reacción (cebadores y ADN) es fundamental para preparar la reacción. Los cebadores deben ser solubilizados a una concentración de 25 μM (para ello, se diluyeron 2 μL de cebador concentrado en 18 μL de agua libre de nucleasas). Mientras que el ADN requiere una concentración baja (40-80 $\text{ng}/\mu\text{L}$) puesto que, teóricamente, una sola copia de ADN es suficiente para una adecuada amplificación.

En el cuadro 2.2 se muestran los cebadores utilizados para la identificación de organismos genéticamente modificados, los cuales fueron tomados de Paredes (2013).

Cuadro 2.2. Cebadores utilizados para la detección de transgénicos

Especie	Secuencia del cebador	Tamaño del amplificado (pb)
Promotor CaMV 35S (Virus del Mosaico de la Coliflor)	F 5'-GCT CCT ACA AAT GCC ATC A-3' R 5'-GGA TAG TGG GAT TGT GCG TC-3'	195
Terminador T-NOS (Terminador de la Nopaline Sintetasa)	F 5'-GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG-3' R 5'-TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA-3'	180

Fuente: Paredes, 2013.

La preparación de la reacción se realizó en tubos eppendorf para PCR de 25 μL (previamente esterilizados). En el cuadro 2.3 se muestran los componentes de la reacción, según el protocolo que precisa el kit de PCR.

Cuadro 2.3. Componentes de la PCR

Componente	Volumen (μL)
Mezcla master mix	12.5
Cebador frontal	0.5
Cebador reverso	0.5
ADN	1.5
Agua libre de nucleasas	10
Volumen total de la reacción	25



Cabe mencionar que para cada reacción de PCR se incluyó una muestra blanco (no contenía ADN) y un control positivo (ADN genéticamente modificado).

Etapas y ciclos de la reacción

La programación del termociclador (Figura 2.5) se realizó de acuerdo a los cebadores utilizados.



Figura 2.5. Termociclador
Apollo instrumentation ATC 401

En la figura 2.6 se muestran las condiciones del programa de PCR utilizado para la detección de polen genéticamente modificado en miel de abeja. Programa propuesto por Paredes (2013).

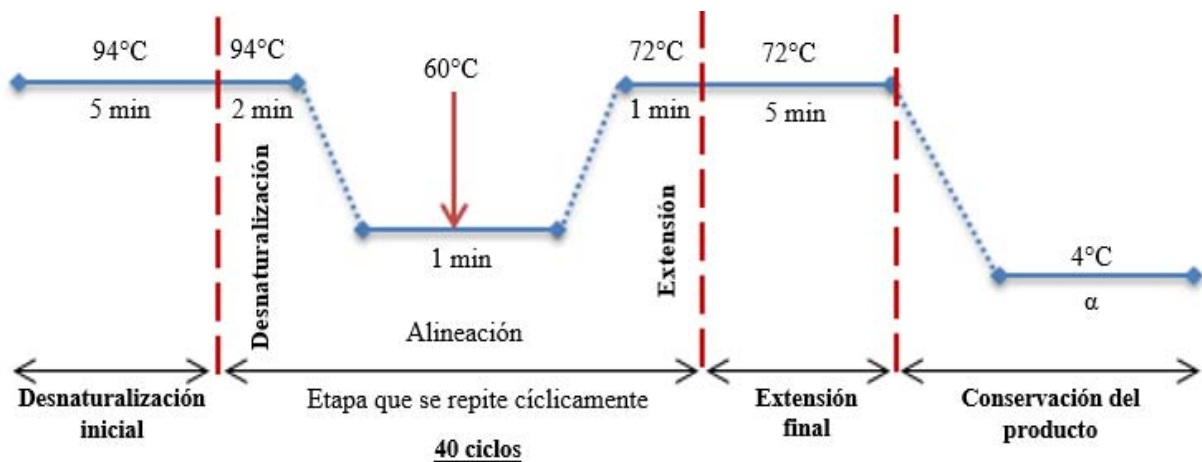


Figura 2.6. Programa de PCR utilizado para la detección de polen genéticamente modificado.



2.6.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) directa

2.6.6.1. Detección de material vegetal en muestras de miel

Para confirmar la presencia de material vegetal en las muestras de miel en estudio, se contó con la ayuda de un kit especial para plantas “*Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR*”, con el cual fue posible llevar a cabo la reacción de forma directa, sin necesidad de una extracción previa del ADN de la muestra. Esto con el fin descartar aquellas muestras que presentaran ausencia de material vegetal, ya que de este es de donde podría provenir el ADN genéticamente modificado, transmitido por las abejas a la miel a través del polen, lo que daría como resultado una miel con contenido transgénico (Court of Justice of the European Union, 2013).

El único pre tratamiento realizado antes de llevar a cabo la PCR, fue la dilución de cada muestra de miel en un buffer de dilución que incluía el kit, esto con el fin de optimizar la liberación de ADN de cada una de las muestras durante la lisis celular que ocurre en la primera etapa de la PCR. Para ello se colocaron aproximadamente 5 μ L de miel en un tubo eppendorf y se adicionaron 20 μ L de buffer de dilución, enseguida se dio vortex a la muestra y se dejó reposar por 6 minutos. Pasado dicho tiempo la muestra estuvo lista para ser utilizada para preparar la reacción, la cual se llevó a cabo como se muestra en el cuadro 2.4.

Cuadro 2.4. Componentes de la PCR directa para la detección de material vegetal

Componente	Volumen (μ L)
2X Phire Plant PCR Buffer	10
Control primer mix	0.4
Phire Hot Start II DNA Polymerase	0.4
ADN	1.0
Agua libre de nucleasas	8.2
Volumen total de la reacción	20

Los cebadores universales para plantas (Cuadro 2.5) que codifican para la región del ADN del cloroplasto y que amplifican a 297 pares de bases se incluían en el kit como una mezcla de los mismos.



Cuadro 2.5. Cebadores universales para plantas

Secuencia del cebador	Tamaño del amplificado (pb)	Región para la que codifica
F 5'-AGTTCGAGCCTGATTATCCC-3'	297	Cloroplasto
R 5'-GCATGCCGCCAGCGTTCATC-3'		

Etapas y ciclos de la reacción

En la figura 2.7 se muestran las condiciones del programa de PCR utilizado para la detección de material vegetal en las muestras de miel de abeja.

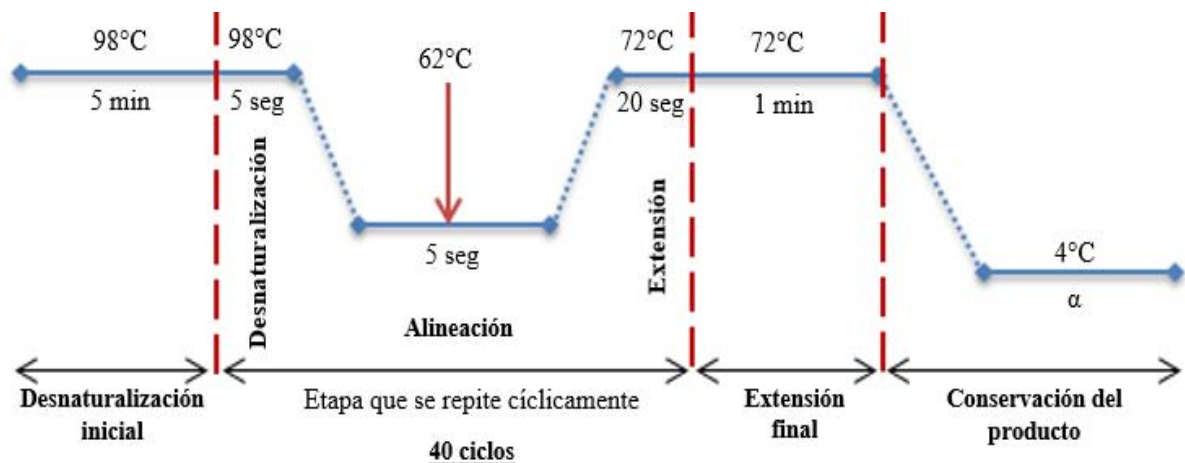


Figura 2.7. Programa de PCR utilizado para la detección de material vegetal en miel de abeja.

2.6.6.2. Detección de Organismos Genéticamente Modificados

La PCR directa para la detección de transgénicos, fue también realizada con el kit para plantas “*Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR*”, siguiendo el pre tratamiento descrito en el punto 2.5.4.1., pero en este caso utilizando los cebadores del promotor CaMV y el terminador T-NOS. Los componentes de la reacción se muestran en el cuadro 2.6.

Las condiciones de la reacción fueron las mismas que se muestran en la figura 2.6 tanto para la detección de CaMV como para T-NOS.

**Cuadro 2.6.** Componentes de la PCR directa para la detección de transgénicos

Componente	Volumen (μL)
Phire Plant PCR Buffer	10
Cebador frontal	0.5
Cebador reverso	0.5
Phire Hot Start II DNA Polymerase	0.4
Muestra de miel en buffer de dilución	1
Agua libre de nucleasas	7.6
Volumen final	20

2.6.7. Electroforesis

Para poder llevar a cabo el análisis de los productos de la PCR se empleó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 3%, la cual se describe a continuación:

En primer lugar se realizó la preparación del gel de agarosa en una cámara de 50 mL, para ello, se pesaron 1.5 g de agarosa y se agregaron 50 mL de TAE 1X, para poder disolver perfectamente la agarosa se calentó la disolución en el horno de microondas durante aproximadamente 1 minuto en intervalos de tiempo de 10 segundos, con el fin de evitar que por efecto de la ebullición esta se evaporara, posteriormente se dejó enfriar hasta una temperatura cercana a la ambiente (durante 10-15 minutos), se agregó una gota de bromuro de etidio (colorante fluorescente, que tiene la capacidad de intercalarse en el ADN, permitiendo la tinción del mismo en el gel) y se homogenizó manualmente. Una vez cerradas las aperturas laterales del soporte del gel, se vertió la disolución de agarosa en el soporte evitando la formación de burbujas, inmediatamente después se colocó el peine y se esperó a que solidificara el gel para poder retirarlo. Por último, se colocó el soporte con el gel en la cámara de electroforesis y se adicionó TAE 1X a la cámara, de modo que el gel quedara completamente cubierto.

Una vez preparado el gel, se prosiguió a cargar las muestras como se muestra en el esquema representativo de la figura 2.8. En el primer posillo del gel de agarosa, se colocaron 3 μL de marcador de peso molecular. Sobre un parafilm se colocaron 3 μL de tinte cargador azul/naranja, 3 μL de bromuro de etidio y 5 μL del producto de la PCR, estos tres se mezclaron con ayuda de una micropipeta (evitando la formación de burbujas), y con la misma se depositó la mezcla en el posillo correspondiente en el gel de agarosa



(repetiendo el mismo procedimiento para el resto de las muestras). Una vez que se terminaron de cargar las muestras se cerró la cámara de electroforesis, se conectó a la fuente de poder, se encendió, se programó la energía potencial eléctrica requerida y se dejó correr hasta que el tinte cargador recorrió 2/3 partes del gel.

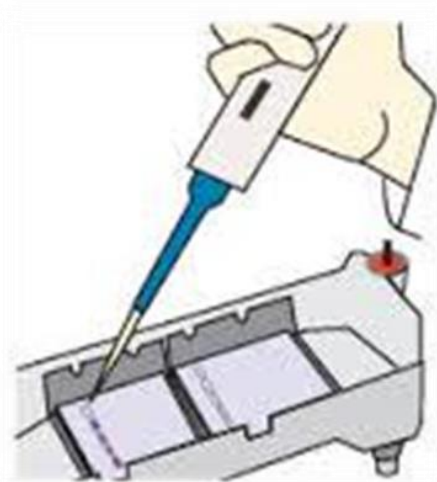


Figura 2.8. Esquema representativo de la carga de muestras en gel de agarosa

Finalmente, la visualización del gel de electroforesis se realizó con ayuda del transluminador y el equipo de fotografía para luz UV (Figura 2.9).



Figura 2.9. Trasluminador de luz UV
Cleaver Scientific LTD



CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Objetivo particular 1.

Obtención de polen

La obtención del polen de todas las muestras de miel se logró con ayuda del método basado en diluciones, centrifugaciones y lavados a fin de eliminar los azúcares y otros componentes naturales de la miel presentes (que pudieran haber afectado la extracción de ADN), propuesto por Narváez (2013). Gracias a la metodología antes mencionada, se obtuvieron pellets de todas las muestras, como el que se muestra en la figura 3.1., los cuales contenían el polen de interés utilizado para llevar a cabo la extracción del material genético.

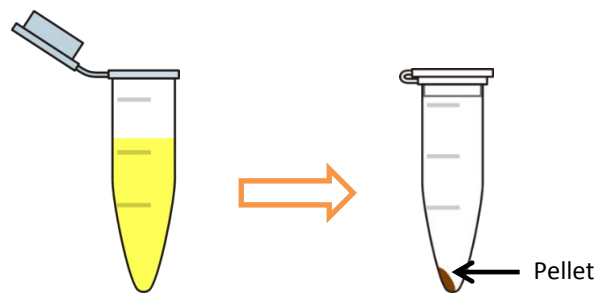


Figura 3.1. Esquema representativo del pellet de polen obtenido a partir de las muestras de miel.

3.2. Objetivo particular 2.

Obtención y cuantificación de ADN del polen de la miel

Para poder llevar a cabo la PCR de una forma eficiente, es necesario contar con una concentración de ADN no muy alta, pero suficiente ($60 \text{ ng}/\mu\text{L}$) que permita la réplica del material genético y al mismo tiempo la correcta hibridación de los cebadores durante la reacción, por lo que una vez realizada la extracción de ADN del polen de cada una de las muestras, se realizó la cuantificación de las mismas.

En la cuarta columna del cuadro 3.1 se muestran las concentraciones de ADN obtenidas inmediatamente después de la extracción, las cuales se observa que fueron de 343.6 a $1176.9 \text{ ng}/\mu\text{L}$, por lo que fue necesario diluirlas con agua libre de nucleasas, de modo que se obtuviera una concentración de $60 \text{ ng}/\mu\text{L}$ o cercana a esta.

**Cuadro 3.1.** Pureza y concentración de las muestras de ADN extraídas

Muestra	Nomenclatura	Concentración inicial		Concentración final	
		260/280	ng/ μ L	260/280	ng/ μ L
Karla	K	1.72	429.6	1.61	69.3
Atizapán	A	1.75	1 176.9	1.75	53.2
Karo	KR	1.79	1 105.9	1.79	51.7
Muuk'Kaab	MK	1.73	343.6	1.69	62.0
Nutrisa	N	1.74	379.3	1.72	73.9
Abel Ha	AH	1.62	624.7	1.61	56.7
Xochimilco	X	1.75	469.1	1.69	56.3
Realkab	R	1.60	1 063.0	1.56	53.3
Carlota	CA	1.54	879.1	1.53	55.6
Campo 4	C4	1.62	843.5	1.59	66.4

En la sexta columna se pueden apreciar las concentraciones finales que resultaron ser de 51.7 a 73.9 ng/ μ L. En la tercer y quinta columna se observa la pureza del ADN obtenido mediante la relación 260/280; teóricamente un valor de 1.8 nos indica una pureza óptima, y como se muestra en el cuadro, se obtuvieron valores por debajo del mismo, lo cual teóricamente significa la presencia de proteínas, sin embargo, la miel es un producto con un mínimo contenido en proteínas en su composición química, por lo que es más probable la presencia de fenol, isopropanol o etanol no eliminados por completo durante la extracción.

Ya que la pureza obtenida mediante la relación 260/280 no resultó ser la más adecuada, se decidió llevar a cabo una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, donde se corrieron las 10 muestras y sus duplicados para observar la integridad del ADN extraído, esto con el fin de seleccionar los ADN más íntegros y poder utilizarlos en la PCR. Los resultados de esta prueba se muestran en las figuras 3.2 y 3.3.

En el primer gel de la figura 3.2 se puede observar que en la parte inferior de los pocitos del gel se alcanza a visualizar en algunos casos una ligera banda que representa la presencia de ADN (carriles K-1, K-2, A1, A2, MK-1, MK-2, N1 y N2) de las muestras evaluadas, sin embargo, sólo una de las muestras y su repetición (MK-1 y MK-2) se observa íntegra y pura, ya que el resto presentan barridos, los cuales se deben a la presencia de ARN, pues el método de extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico es empleado para ácidos nucleicos en general y no solo para ADN.



Por otro lado, para las muestras ubicadas en los carriles KR-1 y KR-2 no se apreció la presencia de ADN, únicamente barridos que representan al ARN.

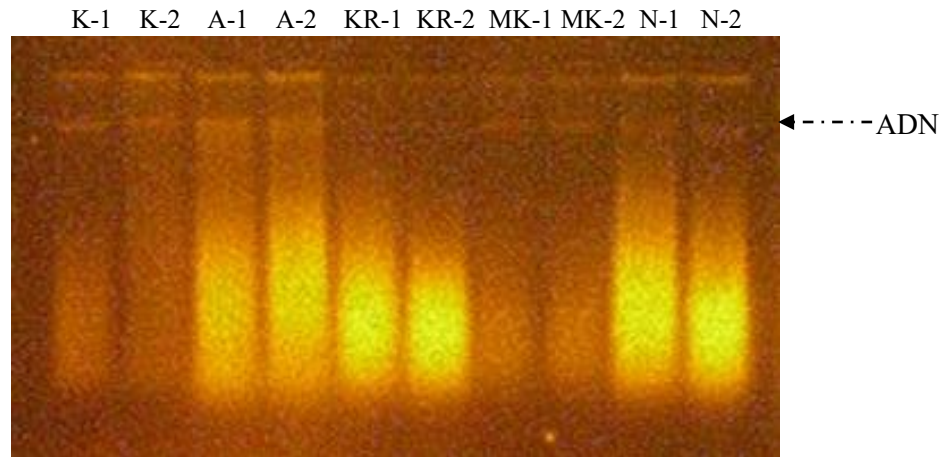


Figura 3.2. Gel de agarosa (1%) para confirmar la presencia de ADN en muestras de miel (Karla, Atizapán, Karo, Muuk’Kaab, Nutrisa) y sus repeticiones, extraídas mediante protocolo de Sambrook.

En el segundo gel de la figura 3.3 se observa la presencia de ADN en los carriles AH-1, AH-2, X-1 y X-2 de las cuales ninguna resultó ser íntegra ni pura.

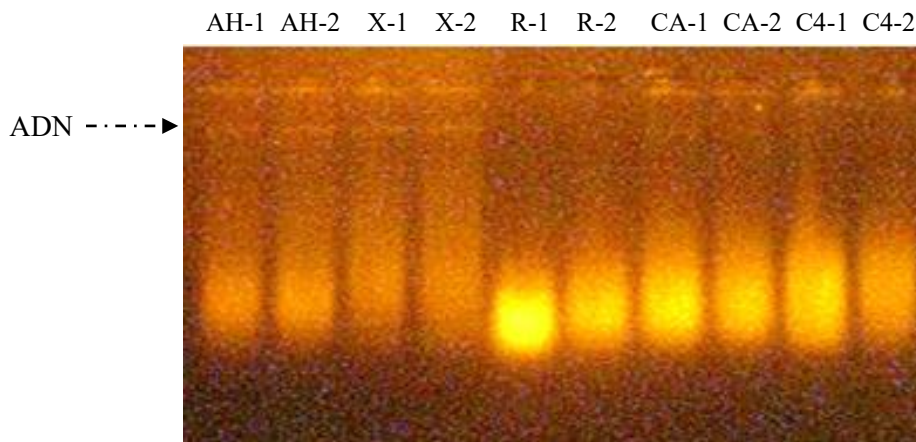


Figura 3.3. Gel de agarosa (1%) para confirmar la presencia de ADN en muestras de miel (Abel Ha, Xochimilco, Realkab, Carlota, Campo 4) y sus repeticiones, extraídas mediante protocolo de Sambrook.

Por otro lado, para las muestras localizadas en los carriles R-1, R-2, CA-1, CA-2, C4-A y C4-2 no se observó ninguna banda, lo cual indicó la ausencia de ADN, únicamente fue



posible la apreciación de barridos de ARN, lo cual indicó que con el método de extracción de Sambrook no se logró una eficiente extracción de material genético.

3.2.1. Detección de material vegetal en muestras de miel

Debido a que se observó que con el método de extracción de Sambrook no se logró la obtención de muestras de material genético puro que permitieran asegurar la confiabilidad de los resultados, se optó por realizar una prueba de PCR directa con ayuda del kit “*Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR*” para confirmar la presencia de ADN de material vegetal en las muestras de miel en estudio y por otro lado se corroboró la integridad y funcionalidad de los cebadores universales para plantas, incluidos en el kit. Los resultados de la prueba se muestran en las figura 3.4 y 3.5.

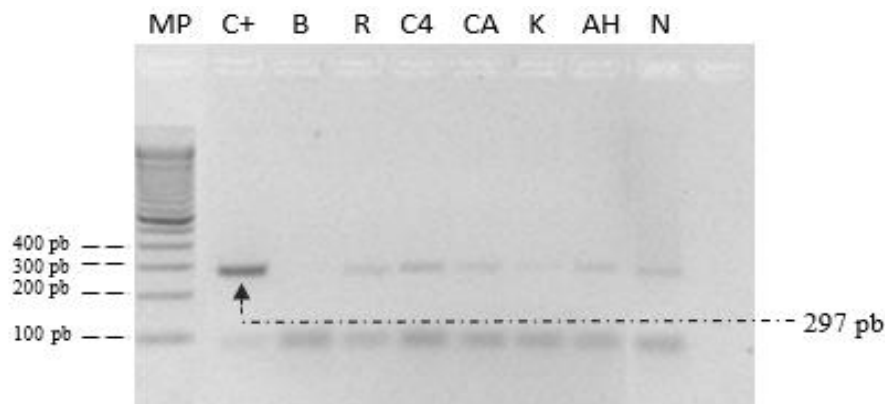


Figura 3.4. Gel de agarosa (1.5%) para confirmar la presencia de material vegetal en las muestras de miel en estudio; (MP) marcador de peso molecular de 100 pb, (C+) control positivo, (B) blanco, (R) miel Realkab, (C4) miel de FESC Campo 4, (CA) miel Carlota, (K) miel Karla, (AH) miel Abel Ha, (N) miel Nutrisa.

En el gel de la figura 3.4 se observa el amplificado de las seis muestras a 297 pares de bases, amplificado esperado con los cebadores universales para plantas, sin embargo, se pueden apreciar bandas más definidas que otras, lo que indica un mayor contenido de ADN vegetal, como en el caso de las muestras de miel ubicadas en los carriles C4, N, AH, R y CA respectivamente, mientras que en el carril K apenas se alcanza a distinguir el ADN de la muestra.

Para el gel de la figura 3.5 se confirmó la presencia de ADN vegetal en las muestras ubicadas en los carriles A, MK, SL, KR y X, en orden de mayor a menor contenido vegetal



según la definición de las bandas. En el caso de la miel de Coyoacán (CY) no se distingue ninguna banda, sin embargo, no se puede asegurar la ausencia de ADN, ya que cabe la posibilidad de que durante la reacción no se haya llevado a cabo una correcta lisis celular que permitiera la completa liberación del material genético, esto debido a la complejidad de la estructura química del polen, lo cual pudo resultar en una deficiente cantidad de ADN disponible para completar la reacción de PCR directa.

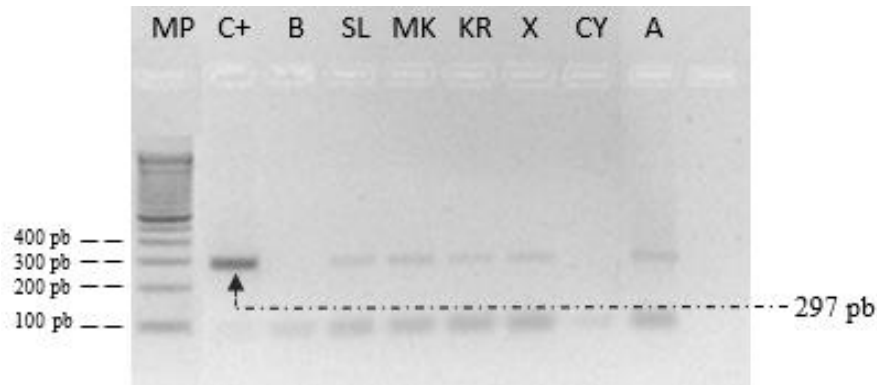


Figura 3.5. Gel de agarosa (1.5%) para confirmar la presencia de material vegetal en las muestras de miel en estudio; (MP) marcador de peso molecular de 100 pb, (C+) control positivo, (B) blanco, (SL) miel de San Luis Potosí, (MK) miel Muuk´Kaab, (KR) miel Karo, (X) miel de Xochimilco, (CY) miel de Coyoacán, (A) miel de Atizapán.

3.3. Objetivo particular 3.

Selección de cebadores para la detección de transgénicos

Para la identificación de organismos genéticamente modificados fueron utilizados dos pares de cebadores disponibles en el laboratorio y utilizados con anterioridad para la detección de transgénicos en otras variedades de alimentos, mismos que amplifican para las regiones derivadas del promotor del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV 35S) y el terminador de la Nopaline Sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens* (T-NOS). Cabe señalar que la selección de dichos cebadores fue basada con anterioridad en el trabajo elaborado por Karamollaoglu (2009).

3.4. Objetivo particular 4.

Amplificación de los cebadores de CaMV y T-NOS para el control positivo

Para comprobar la amplificación de las zonas de interés en función de los cebadores previamente diseñados para la detección del promotor CaMV 35S y el terminador T-NOS,



se llevó a cabo la prueba de PCR con las muestras obtenidas en el objetivo particular 2, únicamente para aquellas en las que se pudo apreciar la presencia de ADN, así como en las cuales se observó una mejor integridad del mismo, según lo observado en la figura 3.2 y 3.3. Para asegurar la presencia de material transgénico se emplearon como controles positivos ADN de maíz que contenía el gen de CaMV 35S y ADN de canola con el gen de T-NOS, los cuales habían sido previamente extraídos para el estudio de la presencia de transgénicos en otros alimentos y se encontraban disponibles en el laboratorio, únicamente se midió la pureza y concentración de los mismos lo cual se muestra en el cuadro 3.2.

Cuadro 3.2. Pureza y concentración de los controles positivos para la detección de OGM

Control positivo	260/280	ng/ μ L
Maíz (CaMV 35S)	1.89	58.20
Canola (T-NOS)	1.72	44.70

Los resultados de la reacción de PCR evaluados mediante electroforesis se muestran en la figura 3.6 y 3.7.

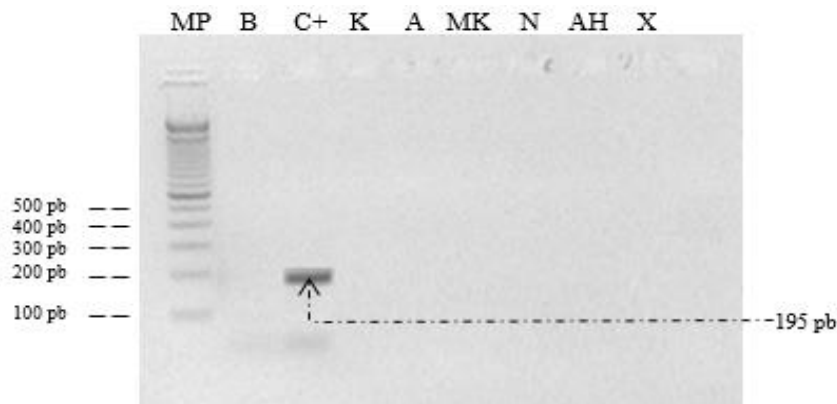


Figura 3.6. Gel de agarosa (3%) para corroborar la amplificación de los cebadores para CaMV 35S; MP (marcador de peso molecular de 100 pb); B (blanco); C+ (control positivo); K (miel Karla); A (miel de Atizapán); MK (miel Muuk'Kaab); N (miel Nutrisa); HA (miel Abel Ha); X (miel de Xochimilco).

Como se observa en la figura 3.6 únicamente se aprecia el amplificado del control positivo para el promotor CaMV a 195 pares de bases, sin embargo, en ninguna de las muestras experimentales de ADN de miel seleccionadas se aprecia alguna banda que represente la presencia de material genéticamente modificado.

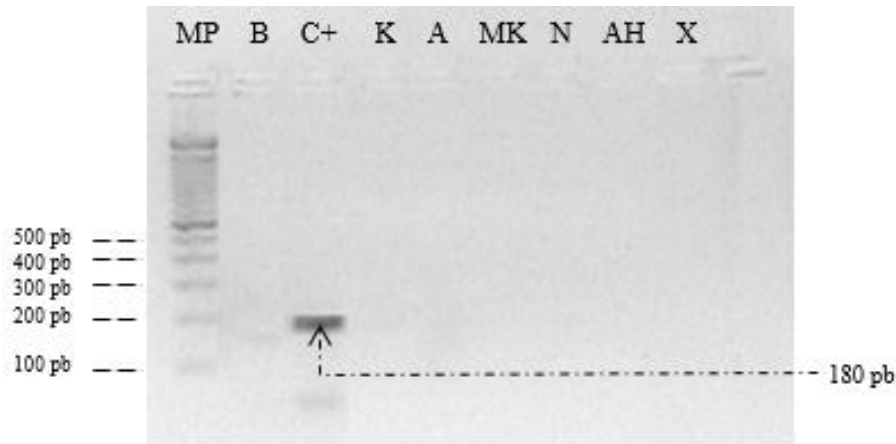


Figura 3.7. Gel de agarosa (3%) para corroborar la amplificación de los cebadores para T-NOS; MP (marcador de peso molecular de 100 pb); B (blanco); C+ (control positivo); K (miel Karla); A (miel de Atizapán); MK (miel Muuk'Kaab); N (miel Nutrisa); HA (miel Abel Ha); X (miel de Xochimilco).

Lo mismo para la figura 3.7, en la cual se observa una banda a 180 pares de bases que representa el control positivo para el terminador T-NOS y ningún amplificado para las muestras de miel, a pesar de ello, no se descarta la posible presencia de alguno de los transgénos, ya que cabe la posibilidad de una deficiente cantidad y calidad del material genético de las muestras utilizadas para la PCR.

Por otro lado, se pudo corroborar mediante esta prueba la presencia e integridad de material genético de los controles positivos para la detección de CaMV y T-NOS, así como la amplificación de las zonas de interés en función de los cebadores previamente diseñados para la detección de organismos genéticamente modificados, asegurando de este modo su correcta utilización.

3.5. Objetivo particular 5.

Detección de transgénicos en muestras de miel de abeja

3.5.1. Detección del promotor CaMV 35S en muestras de miel

Para una mayor confiabilidad de resultados, la evaluación de las muestras para la detección de transgénicos se realizó por medio de PCR directa con ayuda del kit para plantas, en primer lugar se realizó la prueba para la identificación del transgen CaMV 35S, obteniendo los resultados que se muestran en los geles de las siguientes figuras.

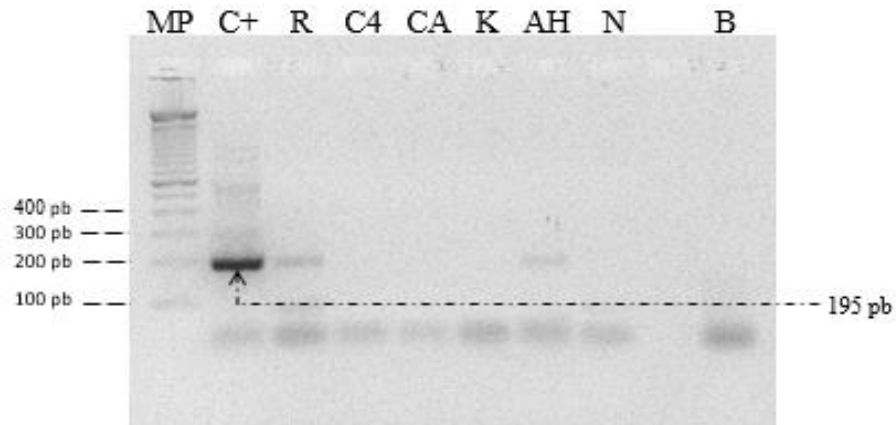


Figura 3.8. Gel de agarosa (3%) para la detección del transgen CaMV 35S en las muestras de miel en estudio; (MP) marcador de peso molecular, (C+) control positivo, (R) miel Realkab, (C4) miel de FESC Campo 4, (CA) miel Carlota, (K) miel Karla, (AH) miel Abel Ha, (N) miel Nutrisa, (B) blanco.

Como se puede observar en la figura 3.8, las bandas que representan amplificadas de 195 pares de bases demuestran la presencia del transgen CaMV 35S en las mieles de las marcas Realkab (R) y Habel Ha (AH), cabe destacar que ambas mieles registraron en su etiqueta ser recolectadas en Yucatán, uno de los estados con gran cantidad de plantaciones de soya genéticamente modificada (además de los estados de San Luis Potosí, Tamaulipas, Campeche, Veracruz, Chiapas y Quintana Roo), que año con año se han ido incrementando, gracias a los permisos otorgados para dicha actividad desde el año 2010 (CIBIOGEM, 2013). Siendo el promotor CaMV 35S un transgén bastante común en especies genéticamente modificadas como el maíz y la soya (Holden y Levine, 2010).

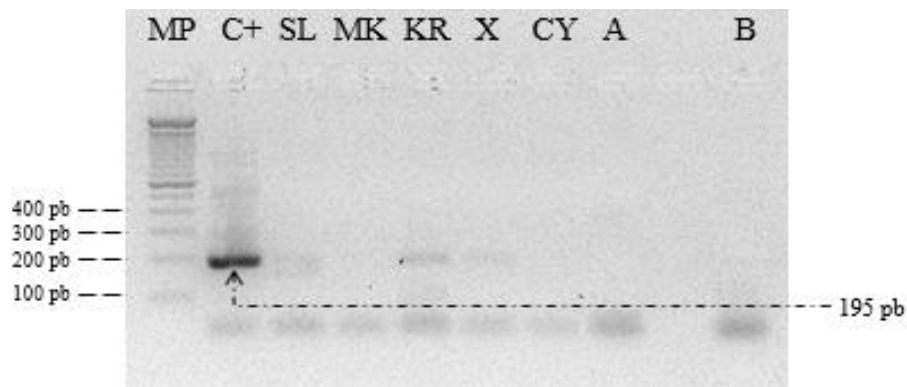


Figura 3.9. Gel de agarosa (3%) para la detección del transgen CaMV 35S en las muestras de miel en estudio; (MP) marcador de peso molecular, (C+) control positivo, (SL) miel de San Luis Potosí, (MK) miel Muuk'Kaab, (KR) miel Karo, (X) Miel de Xochimilco, (CY) miel de Coyoacán, (A) miel de Atizapán, (B) blanco.



En la figura 3.9, se aprecian tres amplificados a la misma distancia que el control positivo, uno para la miel de la marca Karo (KR), y dos para las mieles provenientes de Xochimilco (X) y del estado de San Luis Potosí (SL). En el caso de estas dos últimas, en las cuales se observan amplificados de menor intensidad, puede atribuirse a una baja concentración del transgen en la muestra y/o a que probablemente al momento de llevar a cabo la reacción de PCR no haya habido suficiente ADN de las muestras.

3.5.2. Detección de terminador T-NOS en muestras de miel

Al evaluar las muestras de miel en búsqueda del transgen T-NOS, se obtuvieron los resultados que se muestran en los geles de las siguientes figuras.

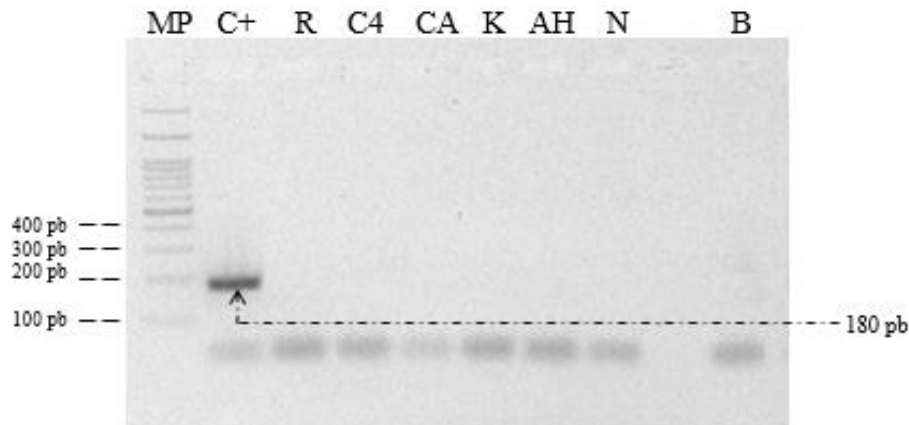


Figura 4.0. Gel de agarosa (3%) para la detección del transgen T-NOS en las muestras de miel en estudio; (MP) marcador de peso molecular de 100 pb, (C+) control positivo, (R) miel Realkab, (C4) miel de FESC Campo 4, (CA) miel Carlota, (K) miel Karla, (AH) miel Abel Ha, (N) miel Nutrisa (B) blanco.

La figura 4.0 nos muestra la ausencia del transgén en las muestras de miel cargadas en dicho gel, ya que el único amplificado que se observa es el del control positivo. Lo contrario para la figura 4.1, donde se alcanza a percibir un par de amplificados cercanos a 200 pares de bases igual que el del control positivo (que amplifica a 180 pares de bases), lo que nos muestra la presencia del transgen T-NOS en la miel de la marca Muuk'Kaab (MK) proveniente del estado de Yucatán y la otra se trata de una miel adquirida en el estado de San Luis Potosí.

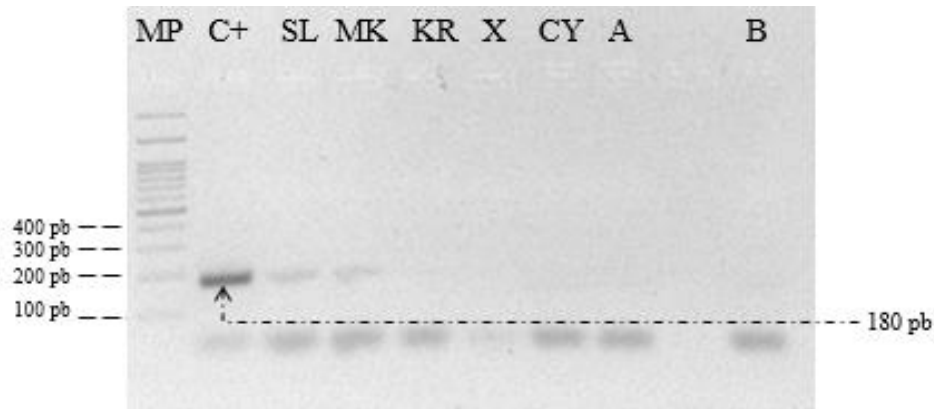


Figura 4.1. Gel de agarosa (3%) para la detección del transgen T-NOS en las muestras de miel en estudio; (MP) marcador de peso molecular de 100 pb, (C+) control positivo, (SL) miel de San Luis Potosí, (MK) miel Muuk’Kaab, (KR) miel Karo, (X) miel de Xochimilco, (CY) miel de Coyoacán, (A) miel de Atizapán, (B) blanco.

Siendo la miel proveniente de San Luis Potosí la única muestra que resultó ser positiva a la presencia tanto del promotor CaMV como del terminador T-NOS, no se puede asegurar la ausencia de algún otro promotor o terminador ya sea en las muestras que resultaron positivas a solamente uno de los transgenes en estudio o en las muestras que no se detectó la presencia de ninguno de estos, pues existen otros promotores y terminadores que son utilizados según la especie y las características que quieran ser conferidas a la misma.

Cabe recordar que en el año 2012 fueron reportados en nuestro país problemas de rechazo por parte del mercado alemán, de mieles provenientes de la península de Yucatán con contenido de polen proveniente de soya genéticamente modificada. Por tal motivo se realizó en nuestro país un estudio ese mismo año para buscar la presencia de polen proveniente de soya y maíz genéticamente modificados, en mieles producidas en el estado de Yucatán, en el cual se detectó la presencia del promotor CaMV y el terminador T-NOS en una de las muestras analizadas (Gálvez y Quirasco, 2013). Sin embargo, comparando los resultados obtenidos en ese entonces y los resultados obtenidos en el presente estudio, fue mayor la presencia tanto del promotor CaMV como del terminador T-NOS en las muestras analizadas en esta ocasión, los motivos pueden ser diversos en base al lugar y temporada en que fueron recolectadas las mieles utilizadas para cada estudio.

Muchos son los factores que pueden causar la presencia de polen transgénico en las mieles, el simple hecho de que las abejas se posen sobre cualquier flor, hace posible que el



polen de la misma se adhiera al cuerpo de las abejas, llevándolo hacia la colmena, y si a esto se le suma la coincidencia entre el periodo de floración de cultivos transgénicos y la actividad apícola, aumentan las posibilidades de transferencia de material genéticamente modificado a las colmenas en aquellos estados donde además de producir miel, se permiten este tipo de cultivos. Otro factor podría ser la misma alimentación de las abejas, ya que en algunos casos los apicultores complementan la dieta de las abejas con harina de soya como suplementación proteica (Álvarez, 2002), lo cual hace posible que soya genéticamente modificada pueda llegar a la miel si se tratara además de harina elaborada con soya transgénica.

Finalmente, en el cuadro 3.3 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en este estudio para la presencia y/o ausencia de los transgenes CaMV y T-NOS.

Cuadro 3.3. Resumen de resultados para la presencia de CaMV y T-NOS

Muestra	Promotor CaMV 35S	Terminador T-NOS
Realkab	Presente	Ausente
FESC C4	Ausente	Ausente
Carlota	Ausente	Ausente
Karla	Ausente	Ausente
Abel Ha	Presente	Ausente
Nutrisa	Ausente	Ausente
San Luis Potosí	Presente	Presente
Muuk'Kaab	Ausente	Presente
Karo	Presente	Ausente
Xochimilco	Presente	Ausente
Coyoacán	Ausente	Ausente
Atizapán Edo. Méx.	Ausente	Ausente



CONCLUSIONES

El método de extracción de polen de la miel utilizado resultó ser de utilidad, ya que se logró la obtención de polen de todas las muestras de miel, sin embargo, lo que no resultó ser muy adecuado para la extracción del ADN a partir del polen fue el método de Sambrook, pues se obtuvieron mínimas cantidades de material genético que además no fue puro, por lo cual no fue de utilidad para la detección de transgénicos. Esto se atribuye a la complejidad estructural del polen, lo cual requiere otro método de extracción que favorezca una adecuada lisis celular que permita la liberación del ADN.

El kit especial para plantas “*Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR*”, resultó ser de gran ayuda para optimizar el proceso durante la búsqueda de Organismos Genéticamente Modificados, pues permitió llevar a cabo la PCR de forma directa con la miel.

Los cebadores disponibles en el laboratorio para la detección de los transgenes CaMV 35S y T-NOS hicieron posible la detección de ADN transgénico en algunas de las muestras en estudio, por lo cual se concluye que los cebadores fueron bien diseñados para cumplir dicho fin.

La mitad de las muestras en estudio resultó ser positiva a la presencia de polen transgénico, en cuatro de ellas se detectó únicamente la presencia de la secuencia del promotor CaMV 35S, dos de ellas provenientes de Yucatán, en cuanto a las otras dos muestras, se desconoce el estado de procedencia de las mismas. Por otro lado, solo en una muestra se detectó únicamente la presencia de la secuencia del terminador T-NOS, miel proveniente también del estado de Yucatán; y por último, en una se detectó tanto al promotor como al terminador, la cual fue una muestra adquirida en el estado de San Luis Potosí. Con los resultados obtenidos, se cumple con la hipótesis establecida, la cual planteaba que si al analizar el ADN del polen de miel de abeja (*Apis mellifera*) se encontraba la secuencia del promotor CaMV y/o el terminador T-Nos, entonces se podría deducir que se trataba de polen proveniente de organismos genéticamente modificados.

Es importante mencionar que en ninguna de las mieles etiquetadas, en las cuales se detectó la presencia de polen transgénico, se mencionaba la posible presencia del mismo,



esto pudo deberse incluso a que los mismos productores lo desconocían, sin embargo, siendo México uno de los principales productores y exportadores, es indispensable el análisis de las mieles producidas para detectar la presencia de material genéticamente modificado, sobre todo en aquellos estados productores donde se reporta el permiso para la siembra de este tipo de cultivos, y en los casos que resulten positivas a la presencia de polen transgénico, sea obligatoria su declaración en la etiqueta, como lo indica la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, y de este modo, sean los consumidores quienes decidan si consumen o no un producto de este tipo.

Es ahí donde este trabajo toma relevancia, al dejar una propuesta abierta para el análisis de mieles previo a su consumo y exportación, ya que actualmente no existe algún método establecido en la legislación de nuestro país para la detección de miel transgénica. Útil también para aquellos laboratorios dedicados a la búsqueda de transgénicos, pues plantea un método directo con la utilización de un kit para plantas, sin tener que realizar extracciones previas, con lo cual se ahorraría tiempo y gasto de reactivos, además de ser eficaz no solo para la miel, sino para el análisis de cualquier alimento de origen vegetal.

Finalmente se recomienda que además del análisis para la detección de transgénicos en miel, una vez detectada la presencia, se realicen pruebas pertinentes para descartar posibles riesgos, como podrían ser casos de alergenicidad, y de este modo, asegurar la salud de los consumidores.



GLOSARIO

- **Ácido desoxirribonucleico (ADN):** Polímero de cadena larga de desoxinucleótidos, a su vez compuestos por pares de bases nitrogenadas. Soporte del código genético de todas las células vivas, a partir del cual se construyen las proteínas. Observado como una doble hélice formada por dos cadenas complementarias.
- **ADN Polimerasa:** Enzima que tiene la capacidad de sintetizar la cadena complementaria de un ADN molde de cadena sencilla. La síntesis sólo se extiende a partir de secuencias de doble cadena ya existentes, a través de un molde de cadena sencilla.
- **ADN recombinante (ADNr):** ADN formado por la unión artificial y deliberada, *in vitro*, del ADN de diferentes especies, mediante técnicas de ingeniería genética.
- **Alineamiento:** Unión de hebras individuales de ADN en pares comunes según sus bases complementarias.
- **Amplificación (de ADN):** Incremento del número de copias de una secuencia de nucleótidos, utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- **Anfólito:** Moléculas que actúan como anfóteros, es decir, como ácidos y como bases.
- **Biotecnología:** Se refiere a toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos.
- **Cebadores:** Oligonucleótidos que se unen a una secuencia complementaria de ADN e inician la Reacción en Cadena de la Polimerasa.



- ↗Desnaturalización:** Cambio de la conformación nativa de un biopolímero. Esta puede ser inducida por el aumento de la temperatura y / o presión o mediante la adición de un reactivo químico. La desnaturalización puede ser reversible o irreversible.
- ↗Gen:** Es la unidad hereditaria que consiste en un segmento de ADN que contiene cientos de miles de nucleótidos, y que se encuentra dentro de los cromosomas. Un gen codifica para una proteína específica.
- ↗Gen exógeno:** Gen de un organismo que puede ser incorporado en el genoma de otro organismo.
- ↗Genoma:** Se refiere a todo el ADN de un organismo incluido en sus genes, los cuales llevan la información para la fabricación de proteínas.
- ↗Genotipo:** Información genética contenida en los genes que determinan las características de un organismo.
- ↗Ingeniería genética:** Conjunto de técnicas que permiten manipular el material hereditario modificando, introduciendo o eliminando uno o más genes.
- ↗In vitro:** Ambiente artificial, fuera de un organismo vivo.
- ↗Nucleótidos:** Unidades monoméricas de las cuales está constituido el ADN, consta de una base púrica (adenina o guanina) o pirimídica (timina o citosina), un azúcar pentosa, y un grupo fosfato.
- ↗Organismo Genéticamente Modificado:** Organismos vivos cuyas características han sido cambiadas, usando técnicas de Ingeniería Genética, para introducir genes que proceden de otras especies.



➤ **Oligonucleótido:** Fragmento corto de ADN, típicamente de 10-20 nucleótidos. Generalmente se refiere a moléculas de ADN de una sola hebra, sintéticos y utilizados como sonda o cebador.

➤ **Pares de bases (pb):** Las bases de adenina (A) y timina (T), o de citosina (C) y guanina (G), unidas por enlaces de hidrógeno (A=T, o C≡G) a cadenas complementarias de ADN.

➤ **Polen:** Granos que se hallan en los órganos masculinos de las flores. Considerado como un ingrediente natural de la miel.

➤ **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** Técnica que consiste en la amplificación de regiones particulares de ADN, utilizando cebadores que flanquean la región de ADN a amplificar y una ADN polimerasa (de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*). Implica 30 o más ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión hasta crear un gran número de copias de la secuencia de ADN de interés.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmed, F. E. (1995). Application of molecular biology to biomedicine and toxicology. *J. Environ. Sci. Health*, 11, 1–51.
2. Ahmed, F. E. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology*, 20(5), 215-223.
3. Álvarez, C. (2002). Suplementación proteica en abejas, alimentadas con harina de lúpino y harina de soya. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile.
4. Alvarez, J. M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E. & Battino, M. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterr J Nutr Metab*, 3, 15–23.
5. Allsop, K. A. & Miller, J. B. (1996). Honey revisited: a reappraisal of honey in pre-industrial diets. *British Journal of Nutrition*, 75, 513–520.
6. AMC, Academia Mexicana de Ciencias. (2013). Por un uso responsable de los Organismos Genéticamente Modificados. Comité de Biotecnología. Recuperado de http://www.uam.mx/librosbiotec/uso_responsable_ogm/uso_responsable_ogm/files/assets/downloads/files/uso_responsable_OGM.pdf (consulta, marzo 2014).
7. Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R. & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health. *American Journal of the College of Nutrition*, 27, 677-689.
8. Brett, G. M., Chambers, S. J., Huang, L. & Morgan, M. R. (1999). Design and development of immunoassays for detection of proteins. *Food Control*, 10, 401–406.
9. Carrillo, L. A. & Félix, F. F. (1996). La tecnología poscosecha para la conservación en fresco de frutas y hortalizas. Sinaloa: Universidad Autónoma de Sinaloa.



10. CGG, Coordinación General de Ganadería y SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2014). Recuperado de http://www.sada.org.ar/Libros/buenas_practicas.pdf (consulta, abril 2014).
11. Cheng, H., Jin, W., Wu, H., Wang, F., You, C., Peng, Y. & Jia, S. (2007). Isolation and PCR detection of foreign DNA sequences in bee honey raised on genetically modified Bt (Cry1Ac) cotton. *Food and Bioproducts Processing*, 85, 141–145.
12. CIBIOGEM, Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados. (2013). Recuperado de http://www.cibiogem.gob.mx/OGMs/Paginas/Solicitudes_Reg_OGMs05.html (consulta, abril 2014).
13. CONACYT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. (2015). Sistema Nacional de Información sobre Bioseguridad. Recuperado de <http://www.conacyt.mx/cibiogem/index.php/permisos-por-cultivo-durante-este-periodo> (consulta, abril 2015).
14. COURT OF JUSTICE OF THE EUROPEAN UNION. (2013). Honey and food supplements containing pollen derived from a GMO are foodstuffs produced from GMOs which cannot be marketed without prior authorisation. Recuperado de www.curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/2013-09/cp110079en.pdf (consulta, abril 2015).
15. Crane, E. (1983). *The archaeology of beekeeping*. Londres: Duckworth
16. Drouin, R., Dridi, W. & Samassekou, O. (2007). DNA polymerases for PCR applications. En J. Polaina y A. P. MacCabe (eds.), *Industrial Enzymes* (pp. 379-401), Canada: Springer.
17. Fernández, C. J. (2006). *Biotechnology and Agriculture. Agricultural Resources and Environmental Indicators*. Estados Unidos: Departamento de Agricultura.
18. Gálvez, A. & Quirasco, M. (2013). Reporte técnico: Detección de polen de plantas Genéticamente Modificadas en miel. Fase I. Facultad de Química. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.



19. Gamborg, O. L. & Phillips, G. C. (1995). *Plant Cell Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*. Berlin: Springer.
20. Gardner, E. J., Simmons, M. J. & Snustad, D. P. (2002). *Principios de Genética*. 4a ed. Utah: Limusa.
21. Glick, B. R. & Pasternak, J. J. (1998). *Molecular Biotechnology. Principles and applications of recombinant ADN*. 2a ed. Washington DC: ASM PRESS.
22. GREENPEACE. (2013). Miel mexicana amenazada por la soya transgénica. Recuperado de http://www.greenpeace.org/mexico/Global/mexico/report/2013/Miel_transgenica_13_de_marzo.pdf (consulta, abril 2014).
23. Herráez, A. (2012). *Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*. 2a ed. España: Elsevier.
24. Holden, M. & Levine, M. (2010). The use of 35S and TNOS expressions elements in the measurement of genetically engineered plant materials. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396, 2175-2187.
25. Holst, J. A., Ronning, S. B., Lovseth, A. & Berdal, K. G. (2003). PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal Bioanal Chem*, 375, 985-993.
26. Jean-Prost, P. & Le Conte, Y. (2007). *Apicultura: Conocimiento de la abeja, Manejo de la colmena*. 4a ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
27. Karamollaoglu, I., Avni, O. H. & Mutlu, M. (2009). QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs). *Biochemical Engineering Journal*, 44, 142-150.
28. Livingstone, D. M. & Birch, R. G. (1995). Plant regeneration and microprojectil-mediated gene transfer in embryogenic leaflets of peanut (*Arachis hypogaeo L.*). *Aust. J. Plant Physiol*, 22, 585-591.



29. López, M., Mallorquín, P. & Vega, M. (2003). Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria. Informe de vigilancia Biotecnológica. Madrid: Genoma España.
30. Mannelli, I., Minunni, M., Tombelli, S. & Mascini, M. (2003). Quartz crystal microbalance (QCM) affinity biosensor for genetically modified organisms (GMOs) detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 129-140.
31. Mehlenbacher, S. A. (1995). Classical and molecular approaches to breeding fruit and nut crops for disease resistance. *Hort Science*, 30(3), 466-477.
32. Narváez, T. P. (2013). *Detección de polen convencional y genéticamente modificado de soya, Glycine max L., en la miel de abeja, Apis mellifera, de los estados de Campeche y Yucatán*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
33. NCBI, National Center for Biotechnology Information. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (consulta, abril 2014).
34. Norma Mexicana NMX-F-036-NORMEX-2006. Alimentos-Miel-Especificaciones y Métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación.
35. Norma Oficial Mexicana NOM-145-SCFI-2001. Información comercial-etiquetado de miel en sus diferentes presentaciones. Diario Oficial de la Federación.
36. Pardo, G. A. (2005). Descubra el poder de la miel. Buenos Aires: Grupo Imaginador.
37. Paredes, B. (2013). *Detección de organismos genéticamente modificados en productos derivados de maíz o soya utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Estado de México.
38. Pelt-Verkuil, E., Belkum, A. & Hays, J. P. (2008). Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Berlín, Alemania: Springer.
39. Perera, J. (2002). Ingeniería Genética: Preparación, Análisis, Manipulación y Clonaje de DNA. España: Editorial Sintesis.



40. PROFECO, Procuraduría General del Consumidor. (2015). Recuperado de https://issuu.com/profeco/docs/rc456-febrero_2015 (consulta, abril 2015).
41. Rakshit, S. K. (2010). Thermostable enzymes used in Polymerase Chain Reaction. En Bustin, S. A. (ed). *The PCR Revolution: Basic technologies and applications* (pp. 12-18), Nueva York: Cambridge University Press.
42. Real Decreto 473/2015, de 12 de junio, por el que se modifica el Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel. Boletín Oficial del Estado. Madrid.
43. Reyes, S., Rozowski, N. J. (2003). Alimentos transgénicos. Revista Chilena de Nutrición. Recuperado de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071775182003000100003 (consulta, marzo 2014).
44. Rivera, D. M. (2006). La biotecnología en plantas y aspectos biotecnológicos del mango. Centro de Investigación y Desarrollo, A.C. (CIAD), México. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S037818442006000200004&script=sci_arttext (consulta, marzo 2014).
45. SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2010). Recuperado de <http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/SAGARPA/PerspectivaMiel2010.pdf> (consulta, abril 2014).
46. SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2013). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Recuperado de http://www.infoaserca.gob.mx/mexbest/Proyecto%202013/PROYECTO_APIMONDIA_2013.pdf (consulta, abril 2014).
47. SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2015). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Recuperado de http://infosiap.siap.gob.mx/anpecuario_siapx_gobmx/indexnal.jsp (consulta, diciembre 2016).



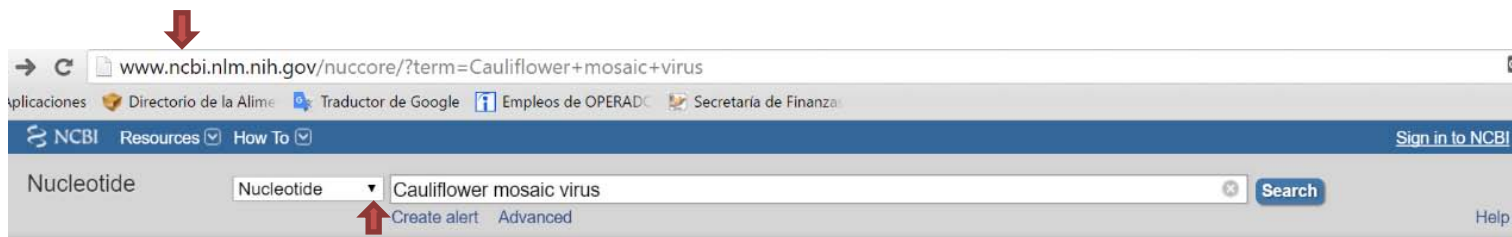
48. Sáinz, C. & Gómez, C. (2000). Mielles Españolas. Características e identificación mediante el análisis del polen. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
49. Sambrook, J. & Russel, D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3^{ra} ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory press.
50. Singh, Z. & Sansavini, S. (1998). Genetic transformation and fruit crop improvement. *Plant Breeding Rev.*, 16, 87-134.
51. Somma, M. (2007). Extraction and Purification of DNA. *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms*. (pp. 3-18), Institute for Health and Consumer Protection: European Commission.
52. Somma, M. & Querci, M. (2007). Electroforesis en gel de agarosa. *Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos*. (pp. 3-12), Instituto de Salud y Protección al Consumidor: Comisión Europea.
53. Stave, J. W. (1999). Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO-future needs. *Food Control*, 10, 367–374.
54. Tagu, D. & Moussard, C. (2006). Fundamento de las técnicas de Biología Molecular. España: Acribia.
55. Ulloa, J.A., Mondragón, P.M., Rodríguez, M., Reséndiz, J.A. & Ulloa, P. R. (2010). La miel de abeja y su importancia. *Revista Fuente*, 2(4), 11-18.
56. Waiblinger, H.U., Ohmenhaeuser, M., Meissner, S., Schillinger, M., Pietsch, K., Goerlich, O., Mankertz, J., Lieske, K. & Broll, H. (2012). In-house and interlaboratory validation of a method for the extraction of DNA from pollen in honey. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 7, 243–254.
57. Walker, J. M. (1994). Isoelectric Focusing of proteins in ultra-thin polyacrylamide gels. *Methods in Molecular Biology: Basic proteins and peptide protocols* (pp. 59-65). Totowa, Nueva Jersey: Humana Press Inc.



ANEXO

Para corroborar que las secuencias de los cebadores a utilizar fueran correctas, se verificaron con ayuda del programa Gen Bank, el procedimiento se describe a continuación:

1. Entrar a la página de NCBI, seleccionar la opción Nucleotide y a continuación escribir el nombre de la especie Cauliflower mosaic virus (promotor CaMV 35S). Se selecciona el resultado del genoma de interés.



Species: Plants (82), Fungi (4), Protists (3), Bacteria (23), Viruses (593), Customize ...

Molecule types: genomic DNA/RNA (733), mRNA (22), Customize ...

Source databases: INSDC (GenBank) (1,026), RefSeq (60), Customize ...

Genetic compartments: Chloroplast (1), Plasmid (12), Plastid (1)

Sequence length: Custom range...

Summary ▾ 20 per page ▾ Sort by Default order ▾ Send to: ▾ Filters: [Manage Filters](#)

See Gene information for cauliflower mosaic cauliflower in [Arabidopsis thaliana](#) 1 Gene record mosaic in [Drosophila melanogaster](#) 1 Gene record

Items: 1 to 20 of 1086

<< First < Prev Page 1 of 55 Next > Last >>

1. [Cauliflower mosaic virus isolate NY8153, complete genome](#)
8,030 bp circular DNA
Accession: M90541.1 GI: 331566
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
2. [Cauliflower mosaic virus isolate BBC, complete genome](#)
8,032 bp circular DNA
Accession: M90542.1 GI: 678542
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
3. [Cauliflower mosaic virus, complete genome](#) ←
8,033 bp circular DNA
Accession: M90543.1 GI: 331549

Results by taxon

Top Organisms [\[Tree\]](#)

- Cauliflower mosaic virus (475)
- synthetic construct (59)
- Zea mays (28)
- Arabidopsis thaliana (17)
- Dahlia mosaic virus (17)
- All other taxa (490)

More...

Find related data

Database:

Search details

"Cauliflower mosaic virus"[Organism] OR Cauliflower mosaic virus[All Fields]



2. Para buscar el fragmento de interés en la secuencia seleccionada, dar click en la opción “Find in this Sequence”

www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M90543.1

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Search Advanced Help

GenBank

Cauliflower mosaic virus, complete genome

GenBank: M90543.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: ☑

LOCUS MCACOMGEN 8033 bp DNA circular VRL 03-FEB-2010
 DEFINITION Cauliflower mosaic virus, complete genome.
 ACCESSION M90543
 VERSION M90543.1 GI:331549
 KEYWORDS DNA-binding protein; aphid transmission protein; capsid protein; inclusion body matrix protein; movement protein; reverse transcriptase.
 SOURCE Cauliflower mosaic virus
 ORGANISM [Cauliflower mosaic virus](#)
 Viruses; Retro-transcribing viruses; Caulimoviridae; Caulimovirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 8033)
 AUTHORS Chenault,K.D. and Melcher,U.
 TITLE Cauliflower mosaic virus isolate CMV-1
 JOURNAL Plant Physiol. 101 (4), 1395-1396 (1993)
 PUBMED [8310068](#)
 COMMENT Original source text: Cauliflower mosaic virus (individual_isolate CMV-1) DNA.
 FEATURES Location/Qualifiers
 1 8033

Send: ▾
 Change region shown ▾
 Customize view ▾

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

Related information ▾
 Full text in PMC
 Genomic Neighbours
 Protein
 PubMed
 RefSeq Genome for Species
 RefSeq Genome Sequences
 Taxonomy



- En la parte inferior de la página, escribir la secuencia del cebador frontal de CaMV: GCTCCTACAAATGCCATCA, se oprime Find y el programa muestra la localización dentro del genoma.

www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/M90543.1

```

6061 gggataaggc ttacagtgcc aggggacttt ttacgtcctc atcaggggaat tccaatccca
6121 caaaaatctg agcttagcag cacagtgtct cctctcagag cagaatcggg tattcaacac
6181 cctcatatca actactacgt tgtgtataac ggtccacacg ccggtatata tgatgactgg
6241 ggttgtagca aggcggcaac aaacggcggt cccggagttg cacacaagaa gtttgccact
6301 attacagagg caagagcagc agctgacgcg tacacaacaa gtcagcaaac agacaggttg
6361 aacttcatcc ccaaaggaga agcccactc aagcccaga gctttgcgaa ggccttaacc
6421 agcccaccaa agcaaaaagc ccactggctc acgctaggaa ccaaaaggcc cagcggtgat
6481 ccaggcccaa aagagatctc ctttgccccg gagatcacia tggacgattt cctctatctt
6541 tacgaacttg ggaggaagt cgcaggagaa ggtgacgata ccatgttcac cactgataat
6601 gagaagatta gcctcttcaa tttcagaag aatgctgacc cacagatggt tagagaggcc
6661 tacgcagcag gtctcatcaa gacgatctac ccgagtaata atctccagga gatcaaatc
6721 cttccaaga aggttaaaga tgcagtcaaa agattcagga ctaactgcat caagaacaca
6781 gagaaagata tatttctcaa gttcagaagt actattccag tatggacgat tcaaggcttg
6841 cttcataaac caaggcaagt aatagaatg ggagtctcta agaaagtagt tcctactgaa
6901 tcaaaggcca tggagtcaaa aattcagatc gaggctctaa cagaactcgc cgtgaagact
6961 ggcaaacagt tcatcacagag tcttttacga ctcaatgaca agaagaaaat cttcgtcaac
7021 atgggtggagc acgacactct cgtctactcc aagaatatca aagatacagt ctcagaagac
7081 caaagggcta ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatcgg gaaacctct cggattccat
7141 tgcccagcta tctgtcactt catcgaagg acagtagaga aggaaggtg ctcctacaaa
7201 tgccatcatt gcgataaagg aaaggctatc gttcaaatg cctctgccga cagtgggtccc
7261 aaagatggat cccaccac gaggagcctc gtgaaaaag gagacgttc aaccacgtct
7321 tcaaagcaag tggattgatc tcacatctcc actgacgtaa gggatgacgc acaatcccac
7381 tatccttcgc aagacccttc ctctataata ggaagttcat ttcatttga gaggacacgc
7441 tgaatcacc agtctctctc tacaaatcta tctctctcta ttttctccgt aataatgtgt
7501 gagtagttcc cagataaggg aattaggggt cttatagggt ttcgctcatg tgttgagcat
7561 ataagaacc cttagatgt atttgtattt gtaaaatact tctatcaata aaatttctaa
7621 ttctaaaac caaatccag tactaaaatc cagatctcct aaagtcccta tagatctttg
7681 tcgtgaatat aaaccagaca tgagacgact aaacctggag cccagacgcc gttcgaagct
7741 agaagtaccg cttaggcagg aggccgttag gaaaaagatg ctaaggcagg gttggttacg
7801 ttgactcccc tgtaggtttg gtttaaatat gatgaagtgg acggaaggaa ggaggaagac
7861 atggaaagat aaggttgtag gccctgtgca aggtaagaag atggaaatgt gatagaggta
7921 cattaactata cctatactat aagctgaggg aatcgttgtt tttacctat atcatctaat
7981 aacccttat cgatttaag aaataatccg cataagcccc caaacaataa att
    
```

//

GCTCCTACAAATGCCATCA **Find** 1 of 1 M90543 : 7190-7208



4. Se prosigue a la búsqueda del cebador reverse de CaMV (GGATAGTGGGATTGTGCGTC) de la siguiente manera: GACGCACAATCCCACTATCC, se oprime Find y el programa muestra la localización dentro del genoma.

www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M90543.1

```

6061 gggataaggc ttacagtgc aggggacttt ttacgtctc atcaggggat tccaatccca
6121 caaaaatctg agcttagcag cacagttgct cctctcagag cagaatcggg tattcaacac
6181 cctcatatca actactacgt tgtgtataac ggtccacacg ccggtatata tgatgactgg
6241 ggttgtacaa aggcgccaac aaacggcgtt cccggagtgg cacacaagaa gtttgccact
6301 attacagagg caagagcagc agctgacgcg tacacaacaa gtcagcaaac agacaggttg
6361 aacttcatcc ccaaaggaga agcccaactc aagcccaaga gctttgcgaa ggccttaacc
6421 agcccaccaa agcaaaaagc ccaactggctc acgctaggaa ccaaaaggcc cagcggtgat
6481 ccaggcccaa aagagatctc ctttgccccg gagatcacia tggacgattt cctctatctt
6541 tacgaacttg ggaggaagtt cgacggagaa ggtgacgata ccatgttcac cactgataat
6601 gagaagatta gcctcttcaa tttcagaaa aatgctgacc cacagatggt tagagaggcc
6661 tacgcagcag gtctcatcaa gacgatctac ccgagtaata atctccagga gatcaaatc
6721 cttccaaga aggttaaaga tgcagtcaaa agattcagga ctaactgcat caagaacaca
6781 gagaagata tatttctcaa gttcagaagt actattccag tatggacgat tcaaggcttg
6841 cttcataaac caaggcaagt aatagaattt ggagtctcta agaaagtagt tcctactgaa
6901 tcaaaggcca tggagtcaaa aattcagatc gaggctctaa cagaactcgc cgtgaagact
6961 ggccaacagt tcatacagag tcttttacga ctcaatgaca agaagaaat cttcgtcaac
7021 atgggtggagc acgacactct cgtctactcc aagaatatca aagatacagt ctcagaagac
7081 caaagggcta ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatcgg gaaacctcct cggattccat
7141 tgcccagcta tctgtcactt catcgaagg acagtagaga aggaaggagg ctcctacaaa
7201 tgccatcatt gcgataaagg aaaggctatc gttcaaatg cctctgccga cagtggtccc
7261 aaagatggat ccccaccac gaggagcacc gtggaaaaag gagacgttcc aaccactct
7321 tcaaagcaag tggattgatc tcacatctcc actgacgtaa gggatgacgc acaatcccaac
7381 tatccttgc aagacccttc ctctatataa ggaagtcat ttcatttggg gaggacacgc
7441 tgaaatcacc agtctctctc tacaatcta tctctctcta tttctccgt aataatgtgt
7501 gagtagttcc cagataaggg aattaggggt cttatagggg ttcgctcatg tttgagcat
7561 ataagaaacc cttagtatgt attgtatatt gtaaaact tctatcaata aaatttctaa
7621 ttctaaaaac caaatccag tactaaaatc cagatctcct aaagtcccta tagatcttg
7681 tcgtgaatat aaaccagaca tgagacgact aaacctggag cccagacgcc gttcgaagct
7741 agaagtaccg cttaggcagg aggccgttag ggaaaagatg ctaaggcagg gttggttacg
7801 ttgactcccc ttaggtttg gtttaaatat gatgaagtgg acggaaggaa ggaggaagac
7861 atggaaggat aaggttgacg gccctgtgca aggtaagaag atggaaattt gatagaggta
7921 cattactata cctatactat aagctgaggg aatcgttgtt tttaccctat atcatcfaat
7981 aacccttat cgatttaaag aaataatccg cataagcccc caaacaataa att
    
```

GACGCACAATCCCACTATCC Find 1 of 1 M90543 : 7366-7385



5. A continuación se realiza la búsqueda del genoma de *Agrobacterium tumefaciens nopaline synthetase* (terminador T-NOS).

The screenshot shows the NCBI Nucleotide search interface. The search query is "Agrobacterium tumefaciens nopaline synthetase". The results are displayed on page 2 of 28. The search results list three items:

- 21. [Bordetella parapertussis strain 12822, complete genome](#)
4,773,551 bp circular DNA
Accession: BX470249.1 GI: 33591070
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- 22. [Agrobacterium tumefaciens strain S33 chromosome linear, complete sequence](#)
2,983,661 bp linear DNA
Accession: NZ_CP014260.1 GI: 987876472
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- 23. [Agrobacterium tumefaciens gene encoding nopaline synthetase. \(Resident in plasmid pTIT37.\)](#)
2,521 bp linear DNA
Accession: V00087.1 GI: 39105

The search results are filtered by taxon, showing top organisms such as *Burkholderia thailandensis* (27), *Proteus mirabilis* (19), *Agrobacterium tumefaciens* (17), *Achromobacter xylooxidans* (13), synthetic construct (12), and All other taxa (462). The search results are also filtered by database, with a dropdown menu set to "Select".



- Realizar la búsqueda de la secuencia del cebador frontal de T-NOS: GAATCCTGTTGCCGGTCTTG, oprimir Find y el programa muestra la localización dentro del genoma.

www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/V00087.1

```

181 taaatatccg ttattctaataaacgctctt ttctcttagg tttacccgcc aatataatcct
241 gtcaaacact gatagtttaa actgaaggcg ggaacgaca atctgatcat gagcggagaa
301 ttaagggagt caggttatga cccccccga tgacgcggga caagccggtt tacgtttgga
361 actgacagaa ccgcaacgat tgaaggagcc actcagccgc gggtttctgg agtttaatga
421 gctaagcaca tacgtcagaa accattattg cgcgttcaaa agtcgcctaa ggtcactatc
481 agctagcaaa tttttcttgt caaaaatgct ccaactgacgt tccataaatt cccctcggtg
541 tccaattaga gtctcatatt cactctcaat ccaataatc tgcaatggca attaccttat
601 ccgcaacttc tttacctatt tccgcccag atcaccatcc gcttcccttg accgtagggtg
661 tcctcgggtc tggtcacgcg gggactgcat tagcggcttg gttcgcctcc cggcatgttc
721 ccacggcgct gtgggaccca gcagatcatc caggatcgat ctacagcaatc aaggccaatg
781 aaggagttaa caccaccgag ggaatgatta acggctcatt tagggtctca cctgtgtagt
841 accttgccgc agttattcgc tccagccgtg tactgattat tgtaaccctg cgggacgttc
901 acgacagctt cgtcaacgaa ctgcgaact tcaacggcga actcgcaca aaggatattg
961 tcgtcgtgtg cggccatggc ttctccatca agtacgagag acagctgcga ttcaagcga
1021 tattcgagac ggataattcg ccataacgt ctaagctatc ggatcaaaaa aaatgtaacg
1081 tcaacatcaa ggaaatgaaa gcgtctttcg gactgtcatg tttccaatt catcgcgatg
1141 atgctggcgt gattgatcta cccaagata ccaagaacat ctttcccag ctattttccg
1201 ctagaatcat ctgcatccc cgttgcaag tgctattctt ttccaactgt atcactcatg
1261 cggttccggc agtcatgaac atcgggaagac tccgcgacc agccaattct cttactaaaa
1321 gagctgagaa gtggcttctt gaactagac agcgaacccc acgagccgag aagggtttt
1381 tcttttatgg tgaaggatcc aacacttac tttgcaactg ccaagagcaa atagaccacg
1441 aacgccggaa ggttgccgca gcgtgtggat tgcgtctcaa ttctctcttg caggaatgca
1501 atgatgaata tgatactgac tatgaaactt tgagggaata ctgcctagca cgtcacctc
1561 ataactgca tcatgcatgc cctgacaaca tggaaactc ctatttttct gaagaattat
1621 gctcgttggg ggatgtcgcg gcaattgcag ctattgcaa catcgaacta cccctcacgc
1681 atgcattcat caatattatt catgccccga aaggcaagat taatccaact ggcaaatcat
1741 ccagcgtgat tggtaacttc agttccagc acttgattcg ttttgggtgct acccagttt
1801 tcaataagga cgagatgggt gagtaagaa ggagtgcgtc gaagcagatc gttcaaacat
1861 ttggcaataa agtttctaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcatga ttatcatata
1921 atttctgtt aattacgta agcatgtaa aattaacatg taatcagta cgttatttat
1981 gagatgggtt tttatgatta gattcccga attatacatt taatacgcga tagaaaacaa
2041 aatatagcgc gcaaacctagg ataaattatc gcgcgcgggt tcatctatgt tactagatcg
2101 atcaaacctc ggtactgtgt aatgacgatg agcaatcgag aggctgacta acaaaaggta
2161 tgccccaaaa caacctctcc aaactgttc gaattggaag tttctgctca tgcccagagg
2221 cataacttag atattcggc gctattcca ctaattcgtc ctgctgggtt gcgcaagat
2281 aaatcaatc atctccttac aattctctt etctteteaa ateaactect gactccccc
    
```

GAATCCTGTTGCCGGTCTTG Find 1 of 1 V00087 : 1885-1904



7. Finalmente se realiza la búsqueda de la secuencia del cebador reverso de T-NOS (TTATCCTAGTTTGCGCGCTA) de la siguiente manera: TAGCGCGCAAAGCTAGGATAA oprimir Find y el programa muestra la localización dentro del genoma.

```

www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/V00087.1
541 tccaattaga gtctcatatt cactctcaat ccaaataatc tgcaatggca attaccttat
601 ccgcaacttc tttacctatt tccgccgcag atcaccatcc gcttcccttg accgtagggtg
661 tcctcgggtc tggtcacgcg gggactgcat tagcggcttg gttcgcctcc cggcatgttc
721 ccacggcgct gtgggcacca gcagatcatc caggatcgat ctcaagcaatc aaggccaatg
781 aaggagttat caccaccgag ggaatgatta acggtccatt tagggctca cctgtgtgatg
841 accttgccgc agttattcgc tccagccgtg tactgattat tghtaaccgt gccggacttc
901 acgacagctt cgtcaacgaa ctgcaccaact tcaacggcga actcgcaca aaggatattg
961 tcgtcgtgtg cggccatggc ttctccatca agtacgagag acagctgcga ttcaagcga
1021 tattcgagac ggataattcg ccataacgt ctaagctatc ggatcaaaaa aaatgtaacg
1081 tcaacatcaa ggaaatgaaa gcgtctttcg gactgtcatg tttccaatt catcgcgatg
1141 atgctggcgt gattgatcta cccgaagata ccaagaacat ctttgcccag ctattttccg
1201 ctagaatcat ctgcatcccg ccgttgcaag tgctattcct ttccaactgt atcactcatg
1261 cggttccggc agtcatgaac atcgggaagac tccgcgaccc agccaattct ctactaaaa
1321 gagctgagaa gtggcttctt gaactagacg agcgaacccc acgagccgag aagggtttt
1381 tcttttatgg tgaaggatcc aacacttacg tttgcaacgt ccaagagcaa atagaccacg
1441 aacgccggaa ggttgccgca gcgtgtggat tgcgtctcaa ttctctcttg caggaatgca
1501 atgatgaata tgatactgac tatgaaactt tgagggaata ctgcctagca ccgtcacctc
1561 ataacgtgca tcatgcatgc cctgacaaca tggaaacatc ctatttttct gaagaattat
1621 gctcgttggg ggatgtcgcg gcaattgcag ctattgcaa catcgaacta cccctcacgc
1681 atgcattcat caatattatt catgcccggg aaggcaagat taatccaact ggcaaatcat
1741 ccagcgtgat tggtaacttc agttccagcg acttgattcg ttttgggtct acccacgttt
1801 tcaataagga cgagatggtg gagtaaagaa ggagtgcgtc gaagcagatc gttcaaacat
1861 ttggcaataa agtttcttaa gattgaaatc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata
1921 atttctgttg aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat
1981 gagatgggtt tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatagcga tagaaaaca
2041 aatatagcgc gcaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatcg
2101 atcaaacttc gttactgtgt aatgacgatg agcaatcgag aggtgacta acaaaaggta
2161 tgcccaaaaa caacctctc aaactgtttc gaattggaag tttctgctca tgccgacagg
2221 cataacttag atattcgcg gctattcca ctaattcgtc ctgctggttt gcgcaagat
2281 aaatcagtgc atctccttac aagttcctct gtcttgtaa atgaactgct gactgcccc
2341 caagaaagcc tctcatctc ccagttggcg gcggctgata caccatcga aaccacgctc
2401 cgaacacttg atacatgtgc ctgagaaata ggcctacgct caagagcaag tcctttctgt
2461 gctcgtcggg aattcctctc ctgtcagacg gtcgtgcgca tgtcttgctg tgatgaagct
2521 t
//
TAGCGCGCAAAGCTAGGATAA Find 1 of 1 V00087 : 2045-2064
    
```

