



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Detección de trigo (*Triticum* spp) transgénico en granos
y productos comerciales, mediante la Reacción en Cadena de la
Polimerasa (PCR)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

LAURA BELEN LÓPEZ BARRAGÁN

ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
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 trigo (*Triticum spp*) transgénico en granos y productos comerciales, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Que presenta la pasante: Laura Belén López Barragán

Con número de cuenta: 306253100 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 16 de Marzo de 2017.

PROFESORES QUE ÍNTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
SECRETARIO	I.A. María Guadalupe López Franco	
1er. SUPLENTE	Dr. Sergio Jiménez Ambriz	
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*



DEDICATORIAS

A mi mamá, Delia Barragán por ser siempre mi ejemplo de fortaleza y bondad, por ser la mujer valiente y guerrera incansable, que me enseñó a superar los obstáculos y jamás rendirme en el camino para llegar hasta este éxito, por darme su amor incondicional, siempre escucharme y abrazarme, por formarme en todo aspecto. Te amo mamá, lo hiciste muy bien.

A mi maestro de vida, mi papá, mi amigo, mi cómplice, a mi abuelo Dario, me enseñaste los primeros números y letras de mi vida, a ver la vida de diferentes maneras, me ayudaste a creer siempre en mí y a no tener miedo, me haces mucha falta; ya estas con mi tío Fili, quien siempre me brindo su apoyo incondicional y cuidó de mi mamá y de mí, siempre supieron que superaría barreras y esta es una de muchas. Algún día nos volveremos a ver y podré abrazarlos hasta la eternidad.

A Miguel Soltero, por ser el amigo, novio y esposo que siempre había querido, por soportarme tantos años y los que faltan, por esa manera tan tuya de hacerme ver las cosas, de motivarme, de darme fuerzas, por compartir a tu lado tantas alegrías y tristezas. A seguir escribiendo nuestra historia juntos, amando y formando a un hombre exitoso, ILY.

A Diego Miguel por ser mi ángel, llegaste a poner orden y sentido a mi vida, en tampoco tiempo me has enseñado lo fuerte que soy, me motivas a ser mejor persona cada día, a despertar para ver tu sonrisa y poderte abrazar. Aprende, descubre, valora, ama, respeta y disfruta la vida, pero recuerda que la vida tiene propósitos. Siempre estaré a tu lado, TE AMO.

A la familia Ponce Mata, por su cariño y apoyo incondicional, gracias a ustedes fue posible concluir esta etapa. Ya somos una familia Chilpitina. Infinitas gracias.

A Katty, Pelusa y Ricardo, por ser mis hermanos, estar a mi lado en cada noche de tarea, trabajo u ocio, por darme calidez, amor y motivación.

A mis más que amig@s Claudia, Yatzel, Verónica T., Verónica A., Andrea, Elidaí, Juan Luis, Gabriela, Brenda, Meztli, Arturo y Marino, por hacer de mi etapa universitaria increíble, y se vienen años mejores. Gracias por su amistad.

A toda mi familia y amigos que me han apoyado y brindado su cariño.



Un agradecimiento especial al proyecto “Técnicas genómicas multidisciplinares aplicadas en las ciencias de la salud y producción de alimentos” con clave PI-API1617.



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Francisco Montiel Sosa por su apoyo, interés, tiempo y sabiduría brindada, es un excelente profesor y un hombre excepcional.

A la M. en C. Karla Mariana García Banda por su apoyo, consejos y conocimientos brindados en el taller de Biotecnología y personales, le deseo mucho éxito.

A la M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza por su apoyo, paciencia, consejos, y conocimientos brindados, durante mi experimentación y revisión de mi tesis, la admiro mucho por su entrega y dedicación, ya esta terminado un éxito mas de muchos que esperan por usted.

A la M. en C. Josefina Moreno Lara por su apoyo, consejos, sonrisas, paciencia, ánimos, conocimiento brindado durante mi experimentación y elaboración de mi tesis, es una excelente maestra y amiga, infinitas gracias.

A la M. en C. Tais Nopal Guerrero, tomar clase con usted fue muy grato, gracias por su tiempo y consejos brindados, por su interés en la revisión y elaboración de esta tesis.

A la I.A. María Guadalupe López Franco, por los conocimientos brindados en las clases que pude tomar con usted, gracias por su interés, sus consejos y apoyo brindado para la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Sergio Jiménez Ambriz, por su interés, consejos y tiempo brindado a la elaboración de esta tesis.

Al I.Q. Daniel Mauricio Vicuña Gómez, por no ser solo un maestro, por ser también un excelente amigo, gracias por siempre apoyarme, a motivarme a no rendirme y siempre estar conmigo en las buenas y en las malas; en gran parte por usted pude llegar a este logro. GRACIAS, lo quiero mucho y me cae muy mal.

Gracias UNAM mi alma mater, fuiste durante varios años mi hogar, gracias por todo lo que me haz brindado, como profesionista espero retribuirte de manera honorable.



ÍNDICE

ÍNDICE	6
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	14
1.1 GENERALIDADES DEL TRIGO	14
1.1.1 Antecedentes históricos del Trigo	14
1.1.2 Estructura del grano de Trigo	15
1.1.3 Composición Química del Trigo	18
1.1.4 Clasificación del Trigo	20
1.1.4.1 Clasificación de Trigo en México.	20
1.1.4.2 Clasificación en Estados Unidos	21
1.1.4.3 Clasificación en Canadá	23
1.1.5 Producción de Trigo	23
1.1.6 Producción en México.....	24
1.1.7 Almacenamiento del Trigo	25
1.1.8 Importancia del Trigo en la industria alimenticia.....	26
1.2 ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS (OGM)	27
1.2.1 Definición de un organismo transgénico.	27
1.2.2 Métodos de transformación genética de plantas	27
1.2.3 Tecnología del ADN recombinante.....	30
1.2.4 Enzimas de restricción.....	31
1.2.5 Vectores de clonación	32
1.2.6 Promotor CaMV y el terminador T-NOS	32
1.2.7 Especificación de Trigo transgénico.	33
1.2.8 Beneficios y desventajas de plantación de transgénicos.	34
1.2.9 Países que producen Trigo transgénico.	35
1.2.10 Productos comerciales elaborados con Trigo transgénico según Greenpeace	36
1.2.11 Regulación actual de OGM en México	37
1.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	40
1.3.1 Componentes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	41
1.3.2 Etapas de Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	42
1.3.3 Beneficios de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	44
1.3.4 Limitantes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	45
CAPITULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	47
2.1 CUADRO METODOLÓGICO.....	47
2.2 MATERIALES Y METODOS EXPERIMENTALES	49
2.2.1 Material biológico para controles positivos y muestras a estudiar	49
2.2.2 Extracción de ADN	51
2.2.3 Cuantificación de ADN.....	54
2.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	56
2.2.5 Electroforesis en gel de agarosa	60

2.2.6	Análisis de los resultados de electroforesis	61
CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		61
3.1	OBJETIVO PARTICULAR 1	62
3.1.1	Extracción y cuantificación de ADN de controles positivos y control interno	62
3.1.2	Extracción y cuantificación de ADN de granos de trigo	63
3.1.3	Extracción y cuantificación de ADN de productos procesados nacionales e importados.	64
3.1.4	Extracción y cuantificación de ADN de muestras para especificidad de primers de Trigo ...	68
3.2	OBJETIVO PARTICULAR 2	69
3.2.1	Primers promotor CaMV y terminador TNOS	69
3.2.2	Primers de trigo Citb.....	70
3.3	OBJETIVO PARTICULAR 3	71
3.3.1	Diseño de programa de PCR para identificación de trigo.....	71
3.3.2	Prueba de especificidad de primers de trigo	71
3.3.3	Diseño de programa de PCR para identificación de promotor CaMV y terminador TNOS ..	72
3.3.4	Prueba de amplificación de CaMV y TNOS	73
3.4	OBJETIVO PARTICULAR 4	74
3.4.1	Prueba de especificidad en granos de trigo.....	74
3.4.2	Prueba de especificidad de trigo en productos comerciales.....	75
3.4.3	Amplificación de promotor CaMV en granos y productos comerciales a base de trigo	77
3.4.4	Amplificación de terminador TNOS en granos y productos comerciales a base de trigo	80
CONCLUSIONES.....		84
BIBLIOGRAFÍA		86



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura grano de trigo.....	16
Figura 2. Principales estados productores de trigo en México 2014.....	25
Figura 3. ¿Cómo se transforma una planta? Método de <i>Agrobacterium</i> y cañón de partículas	29
Figura 4. Representación de obtención de ADN recombinante	31
Figura 5. Esquema general de PCR	43
Figura 6. Etapas y condiciones estándar de un ciclo de PCR	57
Figura 7. Gel de agarosa al 1% y 60V para electroforesis de pureza de ADN de granos de Trigo, con (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11)	64
Figura 8. Gel de agarosa al 1% y 60V para electroforesis de pureza de ADN de productos nacionales a base de trigo, con (HS) Harina Select, (BM) Barrita Marinela, (KD) Kinder Delice, (CHB) Cereal Hall Bran, (HSB) Harina San Blas, (PIB) Pan integral Bimbo, (PLM) Pasta La moderna, (SN) Sopa Nissin, (PA) Pasta Aurrera, (SM) Sopa Maruchan, (BMB) Barra Multigrano Bimbo, (PI) Pasta Itali, (NM) Napolitano Marinela, (THT) Tortilla harina Edo. Tlaxcala.	66
Figura 9. Gel de agarosa al 1% y 60V para electroforesis de pureza de ADN de productos importados a base de trigo, con (GCS) Galleta china de la suerte, (GG) Galleta Grandma, (FCH) Fideo China, (HTO) Harina Taiwan, (HHK) Harina Hong Kong, (MS) Muffin Seattle, (CSK) Cereal Special K Seattle, (CSB) Cereal Raisin Bran Seattle.....	68
Figura 10. Programa de PCR para especificidad de trigo	71
Figura 11. Gel de agarosa al 2% y 60V para electroforesis de especificidad de primers de trigo con (MPB) Marcador de Peso Molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de Trigo orgánico, (ZA) Zanahoria, (PA) Papa, (JI) Jitomate, (LE) Leche, (CC) Carne de cerdo, (CR) Carne de Res, (PA) Papaya	72
Figura 12. Programa de PCR para promotor CaMV y terminador TNOS.....	73
Figura 13. Gel de agarosa al 3% a 70 V para electroforesis de amplificación de primers de CaMV, (MPM) Marcador de peso molecular, (B) Blanco, (M1) Maíz transgénico, (C1) Canola transgénica.	73
Figura 14. Gel de al 3% a 70V para electroforesis de amplificación de primers de TNOS con (MPM) Marcador de peso molecular, (B) Blanco, (M1) Maíz transgénico, (C1) Canola transgénica.	74
Figura 15. Gel de agarosa al 2% y 60V para electroforesis de especificidad de trigo en granos con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene, (C+) Control positivo con ADN de Trigo orgánico, (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11) ADN de muestras de granos de trigo diversas.....	75
Figura 16. Gel de agarosa al 2% y 60V para electroforesis de especificidad de trigo en productos nacionales a base de trigo, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de Trigo orgánico, (HS) Harina Select, (BM) Barrita Marinela, (KD) Kinder Delice, (CHB) Cereal Hall Bran, (HSB) Harina San Blas, (PIB) Pan integral Bimbo, (PLM) Pasta La moderna, (SN) Sopa Nissin, (PA) Pasta Aurrera, (SM) Sopa Maruchan, (BMB) Barra Multigrano Bimbo.....	76
Figura 17. Gel de agarosa al 2% y 60V Electroforesis de especificidad de trigo en productos nacionales a base de trigo, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de Trigo orgánico, (PI) Pasta Itali, (NM) Napolitano Marinela, (THT) Tortilla de Harina edo. Tlaxcala.	76
Figura 18. Gel de agarosa al 2% y 60V para electroforesis de especificidad de trigo en productos importados, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de Trigo orgánico, (GCS) Galleta china de la suerte, (GG) Galleta Grandma, (FCH) Fideo China, (HTO) Harina Taiwan, (HHK) Harina Hong Kong, (MS) Muffin Seattle, (CSK) Cereal Special K Seattle.	77
Figura 19. Gel de agarosa al 3% y 60V para electroforesis de CaMV en granos de trigo, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de Maíz transgénico para CaMV, (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11) ADN de muestras de granos de trigo diversas.....	78
Figura 20. Gel de agarosa al 3% y 60V para electroforesis de CaMV en productos nacionales, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control	

positivo con ADN de Maíz transgénico para CaMV, (HS) Harina Select, (BM) Barrita Marinela, (KD) Kinder Delice, (CHB) Cereal Hall Bran, (HSB) Harina San Blas, (PIB) Pan integral Bimbo, (PLM) Pasta La moderna, (SN) Sopa Nissin, (PA) Pasta Aurrera, (SM) Sopa Maruchan, (BMB) Barra Multigrano Bimbo, (PI) Pasta Itali, (NM) Napolitano Marinela, (THT) Tortilla harina Edo. Tlaxcala..... **79**

Figura 21. Gel de agarosa al 3% y 60V para electroforesis de CaMV en productos importados, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de Maíz transgénico para CaMV, (GCS) Galleta china de la suerte, (GG) Galleta Grandma, (FCH) Fideo China, (HTO) Harina Taiwan, (HHK) Harina Hong Kong, (MS) Muffin Seattle, (CSK) Cereal Special K Seattle, (CSB) Cereal Raisin Bran Seattle..... **80**

Figura 22. Gel de agarosa al 3% y 60V para electroforesis de TNOS en granos, en con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de canola transgénica para TNOS, (T1, T2, T3, T4, T5, T6) ADN de muestras de granos de trigo diversas..... **81**

Figura 23. Gel de agarosa al 3% y 60V para electroforesis TNOS en granos, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de canola transgénica para TNOS, (T7, T8, T9, T10, T11) ADN de muestras de granos de trigo diversas..... **81**

Figura 24. Gel de agarosa al 3% y 60V para electroforesis de TNOS en productos nacionales, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de canola transgénica para TNOS, (HS) Harina Select, (BM) Barrita Marinela, (KD) Kinder Delice, (CHB) Cereal Hall Bran, (HSB) Harina San Blas, (PIB) Pan integral Bimbo, (PLM) Pasta La moderna, (SN) Sopa Nissin, (PA) Pasta Aurrera, (SM) Sopa Maruchan, (BMB) Barra Multigrano Bimbo..... **82**

Figura 25. Gel de agarosa al 3% y 60V para electroforesis de TNOS en productos nacionales, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de canola transgénica para TNOS, (PI) Pasta Itali, (NM) Napolitano Marinela, (THT) Tortilla harina Edo. Tlaxcala..... **82**

Figura 26. Gel de agarosa al 3% y 60V para electroforesis para TNOS en productos importados, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de canola transgénica para TNOS, (GCS) Galleta china de la suerte, (GG) Galleta Grandma, (FCH) Fideo China, (HTO) Harina Taiwan, (HHK) Harina Hong Kong, (MS) Muffin Seattle, (CSK) Cereal Special K Seattle, (CSB) Cereal Raisin Bran Seattle..... **83**



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del trigo (% en peso)	18
Tabla 2. Clasificación de Trigo en México.....	21
Tabla 3. Clasificación de trigo en Estados Unidos	22
Tabla 4. Clasificación de trigo en Canadá	23
Tabla 5. Proyección de Producción Mundial de Trigo 2016-2017	24
Tabla 6. Resultados de estudio de Greenpeace de marcas que utilizan o no trigo transgénico.	37
Tabla 7. Muestras de granos de trigo	49
Tabla 8. Muestras de productos nacionales a base de trigo.....	49
Tabla 9. Muestras de productos importados a base de trigo.....	50
Tabla 10. Muestras de controles internos.....	51
Tabla 11. Muestras para especificidad de primers de trigo.....	51
Tabla 12. Kit "Master Mix" Componentes	58
Tabla 13. Kit "Phire plant direct"	59
Tabla 14. Concentraciones de ADN de los controles positivos de maiz y canola transgenicos y como control interno trigo orgánico.....	62
Tabla 15. Concentraciones de ADN de granos de trigo.....	63
Tabla 16. Concentraciones de ADN de muestras de productos nacionales a base de trigo	65
Tabla 17. Concentraciones de ADN de muestras de productos importados a base de trigo.	67
Tabla 18. Concentraciones de ADN de muestras para uso de especificidad de primers de trigo.....	69
Tabla 19. Secuencia de primers utilizados para detección de secuenciación de promotor CaMV y terminador TNOS	70
Tabla 20. Secuencia de primers para detección de citb de trigo	70



RESUMEN

Se llevó a cabo la investigación de la importancia del trigo, siendo este un cereal relevante con usos diversos en productos alimenticios principalmente; con los avances tecnológicos no sólo se ha mejorado la tecnología de aparatos electrónicos, sino también se ha evolucionado en la elaboración de alimentos con procesos biotecnológicos produciendo así plantas transgénicas, las cuales pueden estar alteradas en sus componentes nutricionales, a la resistencia climáticas, a herbicidas y en otras características que no presentan originalmente los cultivos.

Se hicieron pruebas de especificidad de trigo en granos y productos comerciales a base de este cereal para comprobar su presencia; posteriormente se analizó si existía la presencia del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) y el Terminador de la Nopaline Sintetasa (TNOS) los cuales son generalmente utilizados por la ingeniería genética para introducir genes externos a plantas, mediante primers específicos para amplificar estos genes con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para llevar a cabo la técnica de PCR se extrajo el ADN de 11 granos de trigo, 14 productos nacionales a base de trigo, 9 productos importados a base de trigo, con el método de Sambrook para posteriormente llevar a cabo la amplificación de los fragmentos del material genético, y así mediante electroforesis se pudieron visualizar los resultados, los cuales se presentan en fotografías con las nomenclaturas de las muestras y la presencia de un marcador de peso molecular para analizar los resultados.

En la experimentación sólo se encontró la presencia del promotor del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) en una harina de trigo importada de Taiwán de la marca “Uni-President”, identificando así la presencia de trigo transgénico en la elaboración de este producto; y comprobando la eficiencia de la técnica de extracción de ADN por el método Sambrook y de PCR para la identificación de Organismos Genéticamente Modificados (OGM).

INTRODUCCIÓN

El trigo ocupa el segundo lugar en el mundo, de acuerdo con su volumen de producción después del maíz, aunque para consumo humano es el grano que tiene mayor relevancia; de acuerdo con la información sobre consumo, alrededor del 75% se consume de manera directa, esto es, a través de productos como panes, harinas, cereales para desayuno y pastas alimenticias; el 15% para consumo de animales y el resto se emplea como semilla (Muñoz, 2006).

Los avances biotecnológicos han alegado que es imprescindible que mejoremos la producción y distribución de los alimentos, si es que queremos alimentar y librar del hambre a la creciente población mundial, al mismo tiempo que se reducirán los impactos ambientales. Para lograrlo, será necesario hacer un uso adecuado y responsable de los descubrimientos científicos y las nuevas tecnologías, siendo los alimentos transgénicos una alternativa (Rivas, 2010).

Sin embargo, los riesgos sanitarios a largo plazo de los transgénicos presentes en nuestra alimentación o en la de los animales cuyos productos consumimos no han sido evaluados seriamente y su alcance ambiental o salud sigue siendo desconocido; y una vez liberados al medio ambiente los transgénicos no se pueden controlar. Las variedades transgénicas pueden contaminar genéticamente a otras variedades de la misma especie o a especies silvestres emparentadas. Por ejemplo, en México centro de diversidad y origen mundial del maíz, los maíces transgénicos importados de Estados Unidos están contaminando las variedades tradicionales (Greenpeace, 2009).

Los cultivos transgénicos comercializados hasta el momento (maíz, soja, algodón, canola), y que son utilizados en la industria alimentaria, han sido modificados genéticamente en dos rasgos principales: la resistencia a insectos y la tolerancia a herbicidas (Fernandez, 2009), y ya existe la creación de trigo transgénico potencialmente apto para quienes sufren de intolerancia al gluten, enfermedad llamada celiaquía y este trigo modificado, supone una importante mejora en la calidad de vida de los consumidores que padecen esta enfermedad (Martínez, 2014).



A pesar de que en México es poca la producción de cultivos transgénicos (maíz, soya y algodón), se importan granos y alimentos provenientes de Estados Unidos, el principal productor de cultivos y alimentos transgénicos, por lo tanto, es probable que algunos de los productos que ofrece la industria alimentaria sean alimentos elaborados a partir de materias primas transgénicas. Resulta complicado enunciar con certeza qué productos del mercado son transgénicos debido a que en México y Estados Unidos los alimentos transgénicos no son etiquetados como tales (Fernandez, 2009). Actualmente existen técnicas limitadas con potencial para ser utilizadas en la detección confiable de la presencia de alimentos transgénicos, siendo una de ellas la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Por estas razones, este trabajo es de gran importancia, ya que esta encaminado a evaluar la presencia de trigo transgénico en granos y productos comerciales derivados, mediante la amplificación de fragmentos específicos de ADN, utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).



CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1 GENERALIDADES DEL TRIGO

El trigo (*Triticum* spp), es una planta gramínea anual. La forma del grano de trigo es ovalada con extremos redondeados, en uno de ellos sobresale el germen y en el otro hay un mechón de pelos finos conocido como el pincel; los granos de trigo común pueden ser blandos o duros (Aguilar, 2010).

La palabra «trigo» proviene del vocablo latino *Triticum*, significa ‘quebrado’, ‘triturado’ o ‘trillado’, haciendo referencia a la actividad que se debe realizar para separar el grano de trigo de la cascarilla que lo recubre. *Triticum* significa, por lo tanto, "(el grano) que es necesario trillar para poder ser consumido"; tal como el mijo deriva del latín *milium*, que significa "molido, molturado", o sea, "el grano que es necesario molerlo para poder ser consumido". El trigo (*Triticum*) es, por lo tanto, una de las palabras más ancestrales para denominar a los cereales las que se referían a su trituration o molturación (OEIDRUS Baja California, 2005).

1.1.1 Antecedentes históricos del Trigo

El trigo fue de los primeros cultivos aprovechados por el hombre. En excavaciones realizadas por botánicos arqueólogos en Jarmo (Iraq), se tienen evidencias de tres clases de granos de cereales fechadas por el método de carbono radioactivo en aproximadamente 7,000 a.d.C.

- Cebada de dos carreras, un tipo antiguo intermedio entre formas silvestres y la actual cebada de dos carreras.
- Trigo diploide, similar al trigo silvestre (*Triticum aegilopoides*) o posible forma intermedia entre dicha especie y la escanda menor (*Triticum monococcum*)
- Trigo tetraploide, parecido a las formas silvestres (*Triticum dicocolides*) y cultivada, escanda, (*Triticum dicocum*) (Lluch, 2001).



Se dice que el trigo llegó a México en la época de la conquista, a través de embarcaciones españolas que arribaron con grandes cantidades de trigo, pero la historia lo documenta de otra manera. Como los viajes del viejo mundo a América eran largos, las provisiones se consumían y terminaban antes de llegar a su destino. Al parecer, los viajeros no se preocupaban por guardar algunas semillas para que fueran sembradas en México. Según relato de los historiadores Andrés de Tapia y Francisco López de Gómora, el negro portugués Juan Garrido, criado de Hernán Cortés fue el primero en sembrar y cosechar el primer trigo en México al encontrar mezclados tres granos en un costal de arroz. Solo germinó uno que dio 180 granos y de esa espiga se hicieron otras siembras que comenzaron a cultivarse en diferentes regiones de la Nueva España (Hernández, 2012).

Ya para 1534, a escasos 13 años de consolidar la conquista, se levantaban importantes cosechas de trigo en las inmediaciones de Texcoco y Puebla. Los jesuitas hicieron que el trigo llegara a la parte norte del país en donde enseñaron a los nativos a cultivarlo. Con la expulsión de estos religiosos, los franciscanos siguieron la labor del cultivo en toda la región. El cultivo del trigo, así como su transformación en harina y pan en la Nueva España, fue una necesidad imperiosa de los conquistadores, para satisfacer aquí viejas costumbres en su alimentación. También tuvieron la tarea de enseñar a los autóctonos la molienda y la elaboración del pan convirtiéndose en parte importante de la dieta americana desde entonces (Hernández, 2012).

1.1.2 Estructura del grano de Trigo

En la Figura 1 se muestra la estructura de un grano de trigo. La longitud del grano es en promedio, de 8 mm y el peso de 35 mg. El tamaño de los granos varía ampliamente según la variedad. Los granos de trigo son redondeados en la parte dorsal (el mismo lado del germen) y poseen un surco a lo largo de la parte ventral (lado opuesto del germen). El surco, que abarca aproximadamente toda la longitud del grano, penetra casi hasta el centro. Los dos carrillos pueden llegar a tocarse ocultando así la verdadera profundidad del surco. Este surco no solo representa una dificultad para que el harinero separe el salvado del endospermo con buen rendimiento, sino que también constituye un buen escondite para los microorganismos y el polvo (Hareland, 2003).



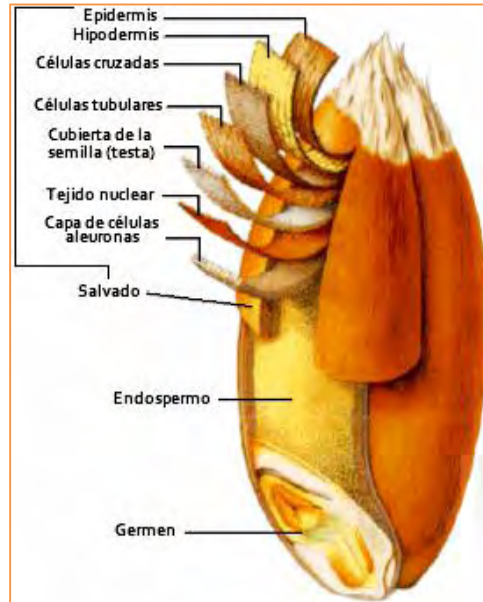


Figura 1. Estructura grano de trigo

Fuente: Henan Kingman M&E Complete Plant Co.,Ltd (KMEC), 2016

El grano de trigo se compone de tres partes principales:

1. Salvado.
2. Endospermo.
3. Germen.

Salvado: A su vez, este se divide en pericarpio, cubierta de la semilla o testa, tejido nuclear y una capa de células aleuronas. El pericarpio envuelve a la semilla protegiéndola contra el ataque de insectos y de las condiciones ambientales y está compuesto por varias capas:

- a) Epidermis.
- b) Hipodermis.
- c) Restos de células de paredes delgadas.
- d) Células intermedias.
- e) Células cruzadas.
- f) Células tubulares.

Las tres primeras capas componen al pericarpio externo (lo que los harineros llaman alas de abeja) y las tres restantes pertenecen al pericarpio interno (endocarpio). La parte más interna del



pericarpio externo está formada por restos de células de pared delgada. Ya que no tiene una estructura celular continua, constituye un plano natural para la división entre el pericarpio externo y el pericarpio interno (Ospina, 2002).

En el pericarpio interior, ni las células intermedias ni las tubulares cubren por completo el grano. Las células cruzadas son largas y cilíndricas y tienen su eje longitudinal perpendicular al eje longitudinal del grano, entre ellas hay poco o nada de espacio intercelular. Las células tubulares son del mismo tamaño y forma que las células cruzadas, pero tiene sus ejes longitudinales paralelos al eje longitudinal del grano y existen muchos espacios intercelulares. El pericarpio representa en volumen 5% de la totalidad del grano y tiene una composición aproximada de 6% proteína, 2% ceniza, 20% celulosa y 0.5% de grasa con el resto de pentosanas y fibra (Hoseney, 1991).

La cubierta de la semilla está compuesta por tres capas: una cutícula exterior gruesa, una capa pigmentada y una cutícula interior fina. El tejido nuclear tiene unos 7 μ m de espesor y está unido estrechamente tanto a la cubierta de la semilla como a la capa de aleuronas. La capa de aleurona, rodea el grano por completo. Botánicamente, es la capa exterior del endospermo, sin embargo, se elimina durante la molienda constituyendo parte de lo que se conoce como salvado (Hoseney, 1991).

Endospermo: Se constituye por tres tipos de células: periféricas, prismáticas y centrales. Las células varían de tamaño y forma con su localización en el grano.

Las paredes celulares del endospermo están formadas por pentosanas, otras hemicelulosas y glucanas pero no por celulosa. El contenido y paredes celulares del endospermo, constituyen la harina. Las células están repletas de granos grandes de almidón incluidos en una matriz proteica. La mayor parte, aunque no toda, de la proteína es el gluten, las proteínas de reserva del trigo. Cuando madura el trigo, se sintetiza el gluten en los cuerpos proteicos. Sin embargo al madurar el grano, los cuerpos proteicos se comprimen unos contra otros formando una matriz como de barro o arcilla con lo que ya no son conspicuos los cuerpos proteicos.

El endospermo puede variar en textura (dureza) y en aspecto (calidad vítrea). La dureza es producida por la fuerza de unión entre la proteína y el almidón en el endospermo, fuerza que es



controlada genéticamente. La opacidad se da cuando en el grano existen cavidades aéreas difractando y difundiendo la luz. En los granos bien repletos la luz viaja a través del grano sin sufrir la difracción una y otra vez resultando un grano vítreo.

Germen: El germen de trigo abarca en volumen aproximadamente 2.5% al 3.55% del grano. El germen está constituido por dos partes principales: eje embrionario (raíz y tallo rudimentarios) y el escutelo que tiene el papel de almacén. El germen es relativamente rico en proteína (25%), azúcar (18%), aceite (16% del eje embrionario y 32% del escutelo es aceite) y cenizas (5%) no contiene almidón, pero es bastante rico en vitaminas B además de varias enzimas (Hoseney, 1991).

1.1.3 Composición Química del Trigo

El grano de trigo en sus tres partes morfológicamente diferentes: el endospermo, que representa la mayor parte del grano; la capa de salvado, que envuelve el grano; y el germen, que incluye el embrión y el escutelo. La composición química de las tres partes varía ampliamente como se puede observar en la tabla 1 (Bogdan y Dendy, 2003).

Tabla 1. Composición química del trigo (% en peso)

	Peso %	Almidón %	Proteína %	Lípidos %	Minerales %
Trigo	100	60-70	10-14	1.5-2.5	1.6-2.0
Completo					
Endospermo	82-85	70-85	8-13	1-1.6	0.3-0.8
Salvado	15	0	7-8	1-5	3-10
Germen	3	20	35-40	15	5-6

Fuente: Bogdan y Dendy, 2003

Hidratos de Carbono: Los hidratos de carbono se forman a partir de dióxido de carbono y agua durante la fotosíntesis. Estos sirven como estructura de soporte en la planta y la semilla, son la fuente de energía para muchas de las reacciones metabólicas y se depositan en la semilla para



suministrar energía durante el desarrollo de la nueva planta. Los mono y disacáridos se encuentran en el grano en muy pequeñas cantidades, fructosa 0,06%, glucosa 0,08%, galactosa 0,02%, sacarosa 0,54% y maltosa 0,05% siendo estos porcentajes en peso de materia seca (Hoseney 1994).

Almidón: Los granos de cereales almacenan energía en forma de almidón. El almidón es el hidrato de carbono mayoritario en el grano de trigo maduro, representando entre el 65-70% de la harina de trigo (suponiendo una tasa de extracción del 80% y una humedad del 14%). El almidón se acumula en forma de gránulos que se forman dentro de los amiloplastos (León, 2007).

Proteínas: Las proteínas son un factor determinante en la funcionalidad de la harina de trigo, pues son estas las que durante el amasado forman una red tridimensional continua llamada gluten capaz de retener al anhidro carbónico producto de la fermentación y por tanto determinan las características físicas del producto final (García, L. A., 2007).

Lípidos: En el grano de trigo se encuentran presentes distintos tipos de lípidos, tales como ácidos grasos, glicéridos simples, galactoglicéridos, fosfoglicéridos, esteroides, esfingolípidos, dioles, tocoferoles, carotenoides e hidrocarburos. Los lípidos tipo acil son los que se encuentran en mayor proporción; entre ellos predominan los triglicéridos que contienen ácido palmítico, esteárico, oleico, linoléico y α -linolénico, encontrándose los mono y diglicéridos en menor proporción. Los ácidos grasos saturados constituyen el 11-26% del total y los no saturados el 72-85% (Matz 1999).

Minerales: Los minerales están en muy pequeña proporción en el grano de trigo, y es aún menor su presencia en el endospermo (inferior al 1%). Los componentes mayoritarios de esta fracción son los fosfatos y sulfatos de potasio, magnesio y calcio. También se encuentran cantidades significativas de hierro, magnesio, zinc y cobre (Matz 1999).

1.1.4 Clasificación del Trigo

El trigo se clasifica de acuerdo a las características de su gluten: suave, fuerte y cristalino. El uso industrial de las diversas variedades de trigo depende del contenido y calidad de proteínas del gluten, las cuales proporcionan las propiedades de viscosidad y elasticidad a las masas elaboradas a partir de harinas (Salazar, 2000).

Las harinas de trigo para la elaboración de galletas provienen de variedades de gluten débil y tienen alto potencial de rendimiento en campo, poseen un menor contenido de proteína respecto a las variedades de trigo que se utilizan para la panificación y la elaboración de pastas. Estas últimas producen semolina, que son trigos con un alto contenido de proteína y contienen un pigmento amarillento, característica deseable para la elaboración de pastas. Los trigos panaderos son de gluten fuerte con un contenido de proteína mayor que los suaves (Solis, 2010).

El trigo es el cereal que tiene más sistemas de clasificación por su alta versatilidad y los distintos usos terminales, siendo los sistemas con más importancia de Estados Unidos, México, Canadá (Saldivar, 2008).

1.1.4.1 Clasificación de Trigo en México.

Los trigos en México se clasifican sobre la base de las propiedades del gluten del trigo, esto a diferencia de Estados Unidos y Canadá en donde los trigos se clasifican por sus hábitos de crecimiento. Los principales tipos de trigo que se cultivan en México, de acuerdo a su tipo de gluten, se dividen en 5 grandes grupos, siendo los de mayor demanda los del Grupo 1 y 3; habiendo sin embargo, mayor crecimiento en la producción de trigos cristalinos (Hernández, 2012).

Tabla 2. Clasificación de Trigo en México

<i>Trigo</i>	<i>Tipo de Gluten</i>	<i>Textura de Grano -Endospermo</i>	<i>Usos</i>
Grupo 1	Fuerte (muy elástico) y extensible.	Duro a semiduro.	Lo utiliza la industria mecanizada de la panificación, produciendo principalmente harina para pan de caja. Se le utiliza como mejorador de trigos débiles.
Grupo 2	Medio fuerte (elástico) y extensible.	Duro a semiduro.	Es para la industria del pan hecho a mano o semi-mecanizado; se le utiliza como mejorador de trigos débiles o trigos con gluten muy fuerte.
Grupo 3	Débil (ligeramente elástico) y extensible.	Suave (blando). No producen harinas panificables por sí solos; requieren mezclarse con trigos Grupo 1 y 2.	Se utilizan para la industria galletera y elaboración de tortillas, buñuelos y otros; aunque puede utilizarse en la panificación artesanal. Como corrector de trigos con gluten muy fuerte.
Grupo 4	Medio y tenaz (no extensible)	Duro a Semiduro.	No es panificable por su alta tenacidad. Se mezcla con trigos fuertes. Es utilizado para la industria de la repostería (pastelera y galletera).
Grupo 5	Fuerte, tenaz y corto (no extensible).	Es un grano muy duro y cristalino. Endospermo con alto contenido de pigmento amarillo (carotenoides)	No es panificable. Se usa para la industria de pastas alimenticias (espagueti, macarrones, sopas secas, etc.).

Fuente: (Hernández, 2012)

1.1.4.2 Clasificación de Trigo en Estados Unidos

La tabla 3 muestra la clasificación del Departamento de Agricultura (USDA), se dividen en seis clases, con variedades de invierno y primavera. La variedad es determinada por la dureza, el color del grano y su temporada de siembra. Cada clase de trigo tiene sus características propias, relativamente uniformes, relacionadas a la molienda, panificación u otros usos (Hernández, 2012).



Tabla 3. Clasificación de trigo en Estados Unidos

Trigo	Estados Productores	Usos
Hard Red Spring (HRS). Trigo Duro de Primavera.	Se siembra en los estados de Dakota del Norte, Dakota del Sur, Minnesota y Montana.	Este trigo es sembrado en primavera y es un importante trigo para panificación, que posee el más alto contenido proteico, usualmente 13 a 14% en adición a sus buenas características molineras y panificadoras. Las subclases se basan en el contenido de granos oscuros, duros y vítreos e incluyen el dark northern spring y red spring. Se utiliza para la fabricación de pan de molde, masas para pizza, croissants, pizza y panecillos.
Hard Red Winter (HRW). Trigo Duro Rojo de Invierno.	Es cultivado en Texas, Oklahoma, Kansas, Colorado y California.	Es un trigo importante que se usa para la panificación. El 40% de la producción de trigo de los E.U.A. es de este tipo y representa casi el 40% de las exportaciones. Tiene un alto contenido proteínico promedio de 9.5%, es rico en gluten con buenas cualidades para la molienda. No existe ninguna subclase para esta variedad. Se utiliza para la fabricación de pan con levadura de alta calidad y panecillos.
Hard White (HW).	Es cultivado en California, Idaho, Kansas y Montana.	Se siembra en otoño y primavera. Su contenido proteico es de 10 a 15%, y tampoco cuenta con subclases. Se utiliza en la fabricación de fideos, frituras, panes de levadura y panes planos.
Soft Red Winter (SRW).	Se cultiva en el oriente de los Estados Unidos.	Es un trigo de alto rendimiento pero bajo en proteínas, usualmente el 10%. Se siembra en otoño y es usado principalmente para pastelería, panes sin levaduras, galletas cracker y bocadillos (snacks). Comprende el 17% de la producción de E.U.A. y el 17% de las exportaciones.
Soft White (SW).	Se cultiva en Washington, Oregon, Idaho.	Es sembrado en otoño y primavera y es el preferido para panes sin levadura, pastelería, galletas y fideos chinos. Es un trigo bajo en proteínas, usualmente cerca del 10%. Las subclases son el soft white, white club y western white.

Fuente: (Hernández, 2012)



1.1.4.3 Clasificación de Trigo en Canadá

La comisión Canadiense de granos es el departamento federal responsable de establecer y mantener la calidad estándar de los granos canadienses. La comisión regula la industria granaria para proteger los derechos del productor y asegurar la integridad de la transacción comercial (Canadian Grain Commission, 2008).

En cuanto a su tipificación comercial el trigo canadiense se clasifica en las siguientes variedades mostradas en la tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de trigo en Canadá

Trigo	Cualidad
Canada Western Amber Durum (CWAD).	Es el segundo trigo más cultivado en el Oeste de Canadá. Sus mejores clases tienen más granos duros vítreos, especialmente desarrollados para producir un porcentaje alto de sémola, con gluten fuerte. Este trigo se utiliza principalmente para la elaboración de fideos y cuscus.
Canada Western Extra Strong Red Spring.	Es el trigo de uso general y es más duro que el Canada Western Red Spring. Es de media proteína y proporciona gran fuerza a la masa, así como una mayor estabilidad. Es utilizado para mezclas en pan de molde, bollos, y productos similares.
Canada Western Red Spring (CWRS).	Es la variedad de trigo más importante del oeste de Canadá, ya que constituye aproximadamente un 60% del total de acres sembrados. Su alto contenido proteínico es de 11.5 a 13.5%, por lo que resulta ideal para la molienda y panificación. Su atributo más importante es la calidad para la mezcla, uniformidad y disponibilidad. Es utilizada para la producción de pan tipo francés, fideos y harinas para pan sin levadura.
Canada Western Red Winter (CWRW)	Es un grano de media proteína. Es ideal para la elaboración de cierto tipo de fideos.

Fuente: (Hernández, 2012)

1.1.5 Producción de trigo

El trigo se cosecha en prácticamente todo el mundo, aunque en el hemisferio norte hay mejores condiciones para su cultivo. Los países que lo producen en mayor cantidad son China, India, Estados Unidos y Rusia. Entre ellos abarcan 70% de la producción mundial (Observatorio de precios, 2015), en la tabla 5 se muestra la producción de trigo de los principales países productores entre 2012 a 2014 según el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA).



Tabla 5. Proyección de Producción Mundial de Trigo 2016-2017

Proyección de Producción Mundial de Trigo 2016-2017 (Valores en toneladas métricas)
Unión Europea: 144,658,000
China: 128,850,000
India: 87,000,000
Rusia: 72,529,000
Estados Unidos: 62,859,000
Otros: 50,596,000
Australia: 35,000,000
Canadá: 31,700,000
Ucrania: 26,800,000
Pakistán: 25,600,000
Turquía: 17,250,000
Argentina: 16,000,000
Irán: 15,500,000
Kazajstán: 14,985,000
Egipto: 8,100,000
Uzbekistán: 7,200,000
Brasil: 6,730,000

Fuente: (Producción Mundial de Trigo, 2017).

1.1.6 Producción en México

El cultivo de trigo en México alcanza un valor de 12 mil mdp, cifra que le coloca como el 10º cultivo más importante, al contribuir con el 2.9% del valor de la producción agrícola. Entre 2011 y 2013 la superficie promedio dedicada al cereal alcanzó 660 mil hectáreas, con un volumen de producción de 3.4 millones de toneladas anuales y los principales estados productores de trigo son Sonora, Guanajuato y Baja California, que se encuentran del centro hacia el norte del país (Observatorio de precios, 2015).



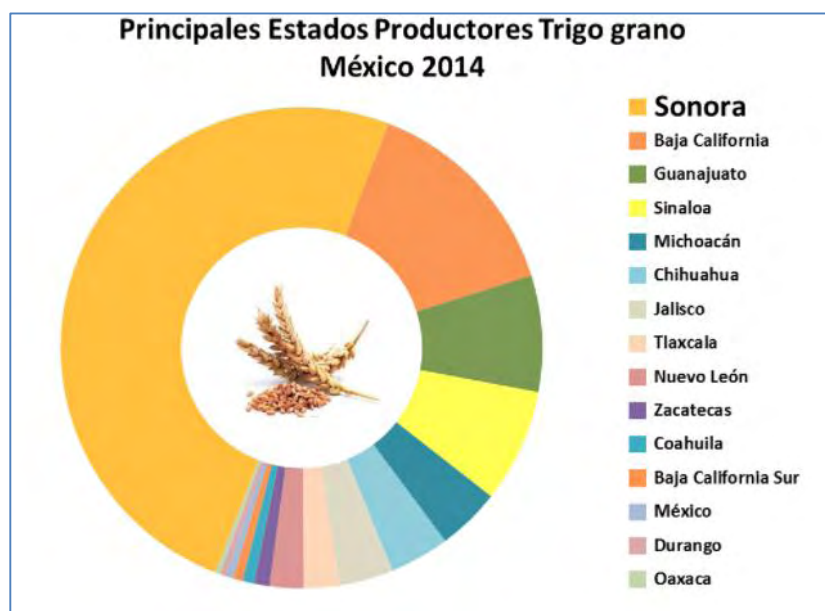


Figura 2. Principales estados productores de trigo en México 2014

Fuente: (Observatorio de precios, 2015) Según datos de SIAP 2015

1.1.7 Almacenamiento del Trigo

Los productores, luego de la cosecha de trigo, enfocan ahora sus esfuerzos en conservar de la mejor manera el material hasta su venta. De esta manera, y previo a los procesos de industrialización del cereal, el objetivo es minimizar las pérdidas de calidad durante las fases de almacenamiento, secado y transporte; las pérdidas de calidad durante el proceso de almacenamiento se reflejan en una baja eficiencia en el proceso industrial y en la disminución de calidad de harinas. Al momento del almacenamiento del grano tanto en bolsa plástica como silos y celdas existen tres conceptos que no deben descuidarse: baja humedad, baja temperatura y limpieza (Torre, 2013).

Se debe almacenar con una temperatura igual o inferior a la humedad de recibo, que es del 14% para trigo. Así, se genera en el interior del granel una humedad relativa por debajo del 70%, insuficiente para el desarrollo de hongos, la principal causa de deterioro; por encima de estos valores, se desarrollan y consumen la materia seca del grano. Este proceso no se puede frenar; solo nos permite ganar tiempo hasta que podamos secar o acondicionar el grano, en cuanto a la limpieza mientras mayor sea, mejor se desarrollará el proceso de su conservación.

El trigo con las altas temperaturas estivales durante su cosecha incrementan el riesgo de

deterioro, acelerando los procesos biológicos de descomposición y la actividad de insectos. Para el almacenamiento de granos en silos y celdas, el denominado “descorazonado de silos”, que consiste en extraer el centro o corazón de la masa de granos, eliminando la mayoría del material fino que normalmente se concentra en la columna central del silo. En esta línea, otras medidas que incrementan la eficiencia es no descuidar la aireación, y en aquellos casos en los que no se pueden alcanzar temperaturas que prevengan el desarrollo de insectos, se debe recurrir a una refrigeración (Torre, 2013).

1.1.8 Importancia del Trigo en la industria alimenticia

El trigo recorre un largo camino desde la producción del grano hasta la obtención de los diferentes tipos de productos farináceos elaborados con la harina que resulta de la operación de molienda. Los distintos eslabones que componen la cadena agroindustrial del trigo le agregan valor a la producción primaria. De esta manera, los productos que se obtienen en las sucesivas operaciones y posteriores procesos industriales de transformación satisfacen las demandas de consumidores tanto internos como externos. El trigo es el cereal producido en forma más extensa en el mundo. La mayor parte del trigo se destina a consumo humano; por lo tanto, su aporte a la ingesta calórica es significativo, particularmente en las Américas y el Medio Oriente (OEIDRUS, 2013).

Como grano entero el trigo se usa tostado o seco. Se reduce a polvo para hacer papillas, de esta manera el grano se mastica sin dificultades y tiene buen sabor, no se digiere completamente por su alto contenido en fibra insoluble y las capas del grano se adhieren de manera firme. Como harina de trigo se usa para la elaboración de pan, galletas, pasteles y similares, cereales para el desayuno, salsas, sopas y pastas alimenticias (Instituto de nutrición de centro América y Panamá, 2006).



1.2 Organismos genéticamente modificado

1.2.1 Definición de un organismo transgénico

Un organismo transgénico es un organismo genéticamente modificado que lleva incorporado uno o más genes provenientes de una especie diferente a la suya. Cualquier ser vivo al cual se le haya modificado su genoma, al añadir, eliminar, inactivar o sustituir algún gen se conoce como Organismo genéticamente modificado (OGM), este término se reserva solo en casos en que se ha producido una modificación planificada y realizada empleando técnicas de Ingeniería Genética (Morcillo O., 2013).

El conjunto de técnicas que permiten estas intervenciones sobre el genoma constituyen la ingeniería genética, sector mayor de las biotecnologías. La ingeniería genética lleva años aplicándose en el campo industrial para producir moléculas de uso terapéutico o industrial por microorganismos cultivados en laboratorios, bacterias o levaduras (Unesco, 2014).

Los cultivos transgénicos comercializados hasta el momento, y que son utilizados en la industria alimentaria, han sido modificados genéticamente en dos rasgos principales: la resistencia a insectos y la tolerancia a herbicidas, y en los últimos años se han obtenido plantas transgénicas con la intención de producir alimentos que sean mejores que los convencionales en su composición nutricional, proteínas o vitaminas (Fernández, 2009).

1.2.2 Métodos de transformación genética de plantas

Las técnicas de ingeniería genética y el uso de nuevos conocimientos científicos permiten modificar los organismos mediante intervenciones precisas, rápidas y controladas. Incluso, es posible transferir a las plantas información genética de organismos no emparentados. En la actualidad esta metodología es aplicada rutinariamente y son muchos los esfuerzos y los recursos que se invierten con el objetivo de optimizar las técnicas para trasladarlas a diferentes especies vegetales. La transformación genética ha sido adoptada como un método para mejorar o introducir nuevas características, y para entender el funcionamiento de las plantas. La transformación de plantas depende de la introducción estable de los transgenes dentro del genoma vegetal. Con el objeto de hacer más fácil y eficiente la transferencia de ADN hacia células o tejidos vegetales, se han desarrollado diferentes métodos de transformación genética,



los diferentes sistemas de transformación de plantas han sido desarrollados con el objeto de hacer más fácil y eficiente esta metodología. Estos métodos según Argenbio (2007) se dividen en:

- a) Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*: un vector biológico que participa de la transferencia.

- b) Métodos de transformación genética directos: por distintos mecanismos físicos se introduce el ADN en la célula.

Agrobacterium tumefaciens: Es un ingeniero genético por naturaleza, siendo el método más difundido para la transformación genética de plantas y la representación del método se puede observar en la figura 3, *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria que vive en el suelo e infecta a un amplio rango de plantas. Esta bacteria tiene como blanco de infección a las heridas en el tallo o raíces de la planta inmediatamente sobre el nivel del suelo, donde ataca a las células, causando su proliferación y formación de tumores. Esta enfermedad se conoce como “agalla de la corona”. El desarrollo de los tumores se debe a que *Agrobacterium* tiene la capacidad de transferir parte de su propio material genético a la planta hospedante. La capacidad patogénica de esta bacteria se asocia a la presencia de plásmidos Ti (inductor de tumor). Se ha demostrado que un fragmento de estos plásmidos, llamado ADN-T (ADN de transferencia), es transferido a la célula vegetal donde se integra al ADN cromosómico de la planta. La transferencia de ADN es inducida por la expresión de unos genes llamados vir que se encuentran en el plásmido Ti por fuera de la secuencia que se transfiere. Dentro del ADN-T se encuentran genes bacterianos que intervienen en la síntesis de fitohormonas que causan la proliferación celular. También genes que participan de la síntesis de una serie de compuestos denominados opinas, los que son secretados y utilizados como nutrientes por *Agrobacterium*. De esta forma la bacteria dirige genéticamente el metabolismo de la planta para su propio beneficio (ArgenBio, 2007).

Un método directo, físico es la biobalística, representado en la figura 3 de lado derecho. Esta técnica consiste en el disparo de partículas de oro o tungsteno, de aproximadamente 1µm de tamaño y que tienen aglomerado el ADN foráneo, sobre células, tejidos u órganos vegetales. Los disparos se producen mediante presión de helio o mediante descarga eléctrica de alto voltaje. Los

proyectiles alcanzan velocidades de varios cientos de metros por segundo que les permiten atravesar la pared celular y las membranas, lo que hace posible que el ADN que transportan, se manifieste en el genoma de las células vegetales (Siari, 2012).

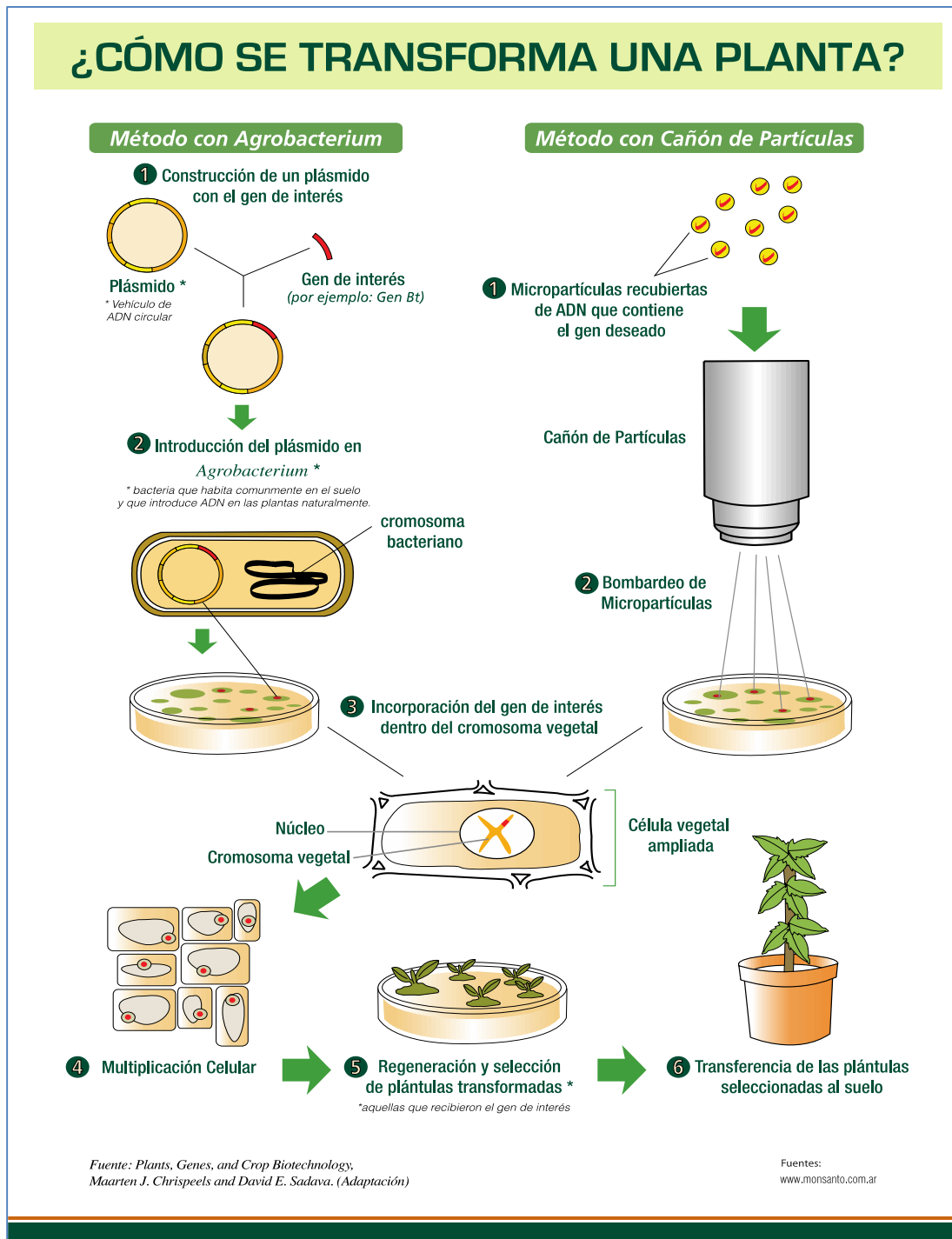


Figura 3. ¿Cómo se transforma una planta? Método de *Agrobacterium* y cañón de partículas

Fuente: (Monsanto, 2015)

1.2.3 Tecnología del ADN recombinante

La tecnología del ADN recombinante es un conjunto de técnicas moleculares para localizar, aislar, alterar y estudiar segmentos de ADN (Pierce, 2010). El término recombinante se utiliza porque a menudo el objetivo es combinar ADN de fuentes distintas. La tecnología de ADN recombinante también es denominada con frecuencia como ingeniería genética ó clonación de genes. Estas técnicas son metodologías ligeramente diferentes que están interrelacionadas. La tecnología de ADN recombinante se utiliza normalmente para hacer posible la clonación de genes, mientras que la ingeniería genética a menudo se basa en la tecnología del ADN recombinante y en la clonación de genes para modificar el genoma de un organismo (Pierce, 2010).

Los procedimientos básicos del ADN recombinante de acuerdo a Cultek (2006) son:

1. Los fragmentos de ADN se generan utilizando unas enzimas de restricción, que reconocen y cortan las moléculas de ADN por secuencias nucleotídicas específicas.
2. Los fragmentos producidos mediante la digestión con enzimas de restricción se unen a otras moléculas de ADN que sirven de vectores. Los vectores pueden replicarse autónomamente en una célula hospedadora y facilitan la manipulación de la molécula de ADN recombinante recién creada.
3. La molécula de ADN recombinante, formada por un vector que lleva un segmento de ADN insertado, se transfiere a una célula huésped. Dentro de esta célula, la molécula de ADN recombinante se replica, produciendo docenas de copias idénticas conocidas como “clones”.
4. Al replicarse las células huésped, las células descendientes heredan el ADN recombinante, creándose una población de células idénticas, que llevan todas la secuencia clonada.
5. Los segmentos de ADN clonados pueden recuperarse de las células huésped, purificarse y analizarse.
6. Potencialmente, el ADN clonado puede transcribirse, su ARNm puede traducirse, y el producto génico puede aislarse y examinarse.

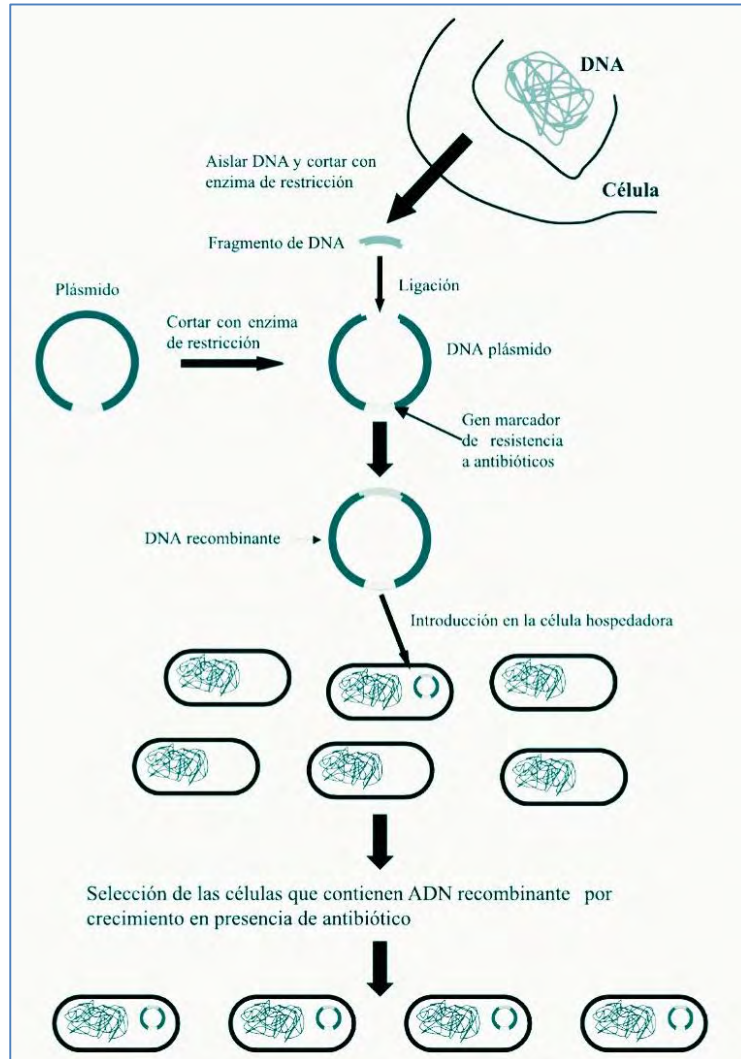


Figura 4. Representación de obtención de ADN recombinante

Fuente: (Morcillo O., 2013)

En la figura 4 se representa la obtención de ADN recombinante, en donde se lleva a cabo la inserción de un fragmento de ADN en un plásmido e introducción del plásmido recombinante en una célula bacteriana. Las bacterias que contienen el plásmido se seleccionan haciéndolas crecer en un medio que contenga un antibiótico. Solo sobrevivirán las bacterias portadoras del plásmido (Morcillo O., 2013).

1.2.4 Enzimas de restricción

El desarrollo fundamental que posibilitó la tecnología de ADN recombinante fue el

descubrimiento, a fines de la década de 1960, del plásmido de ADN y las enzimas de restricción (endonucleasas de restricción). El plásmido de ADN es una forma circular de ADN autorreplicante que los científicos pueden manipular para transportar y clonar otros trozos de ADN. Las enzimas de restricción, reconocen y establecen cortes en las cadenas dobles del ADN en secuencias de nucleótidos específicas. Estas enzimas son producidas en forma natural por las bacterias, que las utilizan en la defensa contra los virus. Una bacteria protege su ADN propio de una enzima de restricción mediante la modificación de la secuencia de reconocimiento de manera habitual por el agregado de grupos metilo (Thieman y Palladino, 2010).

1.2.5 Vectores de clonación

Un vector de clonación es una molécula de ADN replicante y estable a la cual puede adherirse un fragmento de ADN ajeno para introducirlo en una célula. Un vector de clonación eficaz tiene tres características importantes:

- 1) Un origen de replicación, que asegura que el vector se reproduzca dentro de la célula.
- 2) Marcadores de selección, que permiten seleccionar o identificar todas las células que contiene el vector.
- 3) Uno o más sitios de restricción únicos dentro de los cuales puede insertarse un fragmento de ADN.

Los sitios de restricción utilizados para la clonación deben ser únicos; si un vector se corta en múltiples sitios de reconocimiento y genera varias piezas de ADN, no habrá manera de que estas piezas vuelvan a reunirse después en el orden correcto (Pierce, 2010).

1.2.6 Promotor CaMV y el terminador T-NOS

Con frecuencia para expresar el transgen en una planta este se coloca detrás de un promotor, que permite su transcripción. La mayoría de las veces se usa el promotor CaMV del virus mosaico de coliflor y la secuencia de terminación de la transcripción TNOS y el terminador de la transcripción del gen de la nopalina sintetasa procede de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Ambos CaMV y TNOS son ampliamente utilizados para construir plantas transgénicas y la amplificación de estas secuencias específicas en un alimento, sin necesidad de conocer la



secuencia específica del gen introducido, nos indica que está fabricado o contiene una planta transgénica (Morcillo O., 2013).

El análisis funcional de un promotor requiere del conocimiento de secuencias de nucleótidos en la región regulatoria; una buena visión de esta construcción es realizada bajo tres aspectos: (a) el sujeto promotor tiene la función de análisis; (b) se reporta un gen; (c) se señala el término de la transcripción (Tagu, 2006).

1.2.7 Especificación de Trigo transgénico

El desarrollo de trigos transgénicos se ha manifestado con cierto retraso en comparación con otros granos y oleaginosas. Las razones son varias: la genética de esta planta es más compleja, su volumen de producción es reducido al considerar los requerimientos de exportación, las regulaciones de los países importadores no están suficientemente definidas y la competencia entre los países exportadores es más intensa y determinada por diversos sistemas de comercialización. A pesar de ello, en fechas recientes se han realizado trabajos de modificación genética a este importante cultivo. Por ejemplo, en Estados Unidos se comenzó a trabajar en la tolerancia a herbicidas, principalmente al glifosato, bajo el liderazgo de la compañía Monsanto. Otras investigaciones que han contado con la participación de centros públicos y el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) se basan en la resistencia al *Fusarium* y sequía. Sin embargo, las dificultades para aprobar el uso comercial de trigos genéticamente modificados han frenado su desarrollo, a pesar de que muchos grupos de interés, como la Asociación de Trigo Estadounidense o la Junta Canadiense del Trigo, han manifestado su deseo de contar con este tipo de productos. Así mismo, la actual crisis alimentaria, asociada al aumento de precios y a la escasez derivada por factores como la recomposición de los mercados y la presencia de fenómenos naturales, han reanimado la discusión en torno al uso de la biotecnología moderna en el trigo, lo que significa un aliciente para la investigación en el rubro (OEIDRUS Baja California, 2008).

La transformación de trigo usando biolística ha convertido en una tecnología robusta y es una plataforma que puede producir de forma rutinaria entre 5 y 20 plantas transgénicas independientes por 300 embriones inmaduros bombardeados. Es menos dependiente del genotipo

que los métodos basados en *Agrobacterium* y es generalmente más eficiente, aunque esto puede cambiar a medida que los protocolos de *Agrobacterium* relativamente más recientes sean ampliamente adoptados y optimizados. También es menos exigente con respecto a los requisitos de vectores: el gen rasgo está co-bombardado con un plásmido marcador separado, seleccionable. Sin embargo, los eventos de integración de ADN son a menudo más complejos y contienen más copias del transgén. En comparación con algunas especies, el trigo ofrece sólo unos pocos tejidos de explantes adecuados para la regeneración de cultivo de tejidos. El tejido diana más común usado es la superficie del escutelo del embrión de la semilla inmadura que es susceptible a la captación de ADN a través de ambos biolística y *Agrobacterium* y forma fácilmente callo embriónico (Centre for Crop Genetic Improvement, Rothamsted Research, Hertfordshire, UK, 2009).

1.2.8 Beneficios y desventajas de plantación de transgénicos

Gracias al mejoramiento genético convencional y a la constante liberación de variedades híbridas, la productividad mundial agrícola del siglo XX fue muy eficiente, particularmente a partir de la década de los cincuenta. Estas tecnologías contribuyeron, durante la segunda mitad del siglo pasado, al incremento de 70% de la producción mundial en trigo. Existe incertidumbre sobre la efectividad que tendrá la agricultura tradicional para producir los alimentos que demandará la humanidad, con el menor impacto ambiental posible, por un lado se considera, que aun existe capacidad productiva empleando los métodos convencionales de producción agropecuaria, y por otro lado se argumenta que siendo la agricultura una actividad extractiva, que altera y transforma los recursos naturales en alimentos, la limitación de estos recursos incidirá directamente en la productividad y, en consecuencia a su disponibilidad (Villalobos, 2008).

Se podría deducir que hay claros indicios de que la próxima generación de cultivos transgénicos se orientara en forma prioritaria a liberar organismos que beneficien al consumidor, a través de productos de mayor calidad nutricional, conocidos como cultivos biofortificados. Asociado a la mejora nutricional de los productos, la ingeniería genética permitirá el aumento de los rendimientos para contribuir a la seguridad alimentaria por medio del mejoramiento genético para la tolerancia a estrés abiótico como sequía, salinidad, metales pesados, acidez del suelo y resistencia a altas y bajas temperaturas (Villalobos, 2008).



La historia de la agricultura nos enseña que las enfermedades de las plantas, las plagas de insectos y las malezas se volvieron más severas con el desarrollo del monocultivo, y que los cultivos manejados intensivamente y manipulados genéticamente pronto pierden su diversidad genética. Dado estos hechos, no hay razón para creer que la resistencia a los cultivos transgénicos no evolucionará entre los insectos, malezas y patógenos como ha sucedido con los plaguicidas. No importa qué estrategias de manejo de resistencia se usen, las plagas se adaptarán y superarán las barreras agronómicas. Las enfermedades y las plagas siempre han sido amplificadas por los cambios hacia la agricultura homogénea (Altieri, 1999).

1.2.9 Países que producen trigo transgénico

Por ser aún muy controversial el tema de transgénicos, los países principales que han publicado de manera abierta la plantación y uso de trigo transgénico son Estados Unidos, Canadá y Australia, ya que estos países han confirmado su compromiso para apoyar la innovación y la aplicación de la biotecnología moderna en el trigo. Las organizaciones animan a los gobiernos productores de trigo y a los países importadores “a mantener los sistemas regulatorios basados en la ciencia, así como a mantener las políticas razonables de bajo nivel de presencia para minimizar las interrupciones comerciales”. Los grupos manifiestan que trabajarán en la “comercialización sincronizada de eventos biotecnológicos en el trigo en los tres países” (Grupo Agronegocios, 2014).

México en el 2009 empezó con la experimentación de trigo transgénico para consumo humano luego de que en agosto de ese año, la Secretaría de Agricultura (SAGARPA) diera luz verde a la solicitud de un centro de investigación para iniciar con la experimentación de este cereal del tipo harinero, según confirmó Fabrice Salamanca, presidente de Agrobio y es quien representa al organismo que agrupa a las principales empresas de biotecnología en el país como Monsanto y Syngenta, confirmó que la Secretaría de Agricultura ya autorizó al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), para que se iniciara con la experimentación de una variedad de trigo resistente a sequía (Fregoso, 2009).



SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) recibió y aprobó una solicitud de permiso para la liberación en ambiente, en programa experimental, del organismo genéticamente modificado (OGM) Trigo-NAS2 en el Estado de Morelos, otoño-invierno 2016-2017 (Servicio Nacional de Sanidad, 2016).

1.2.10 Productos comerciales elaborados con Trigo transgénico según Greenpeace

Greenpeace ha recolectado información durante el segundo semestre de 2010 y actualizada en el primer semestre del 2012, solicitándola directamente a más de 200 empresas. Sus resultados o conclusiones fueron clasificadas en secciones por colores verde y morada mostrados en la tabla 6, en la sección verde se incluyen los productos cuyos fabricantes proporcionaron a Greenpeace constancia escrita y pruebas tangibles de que no utilizan transgénicos ni derivados como ingredientes y en la sección morada se incluye a aquellos productos cuyos fabricantes de acuerdo a Martina Borghi (2015) en los estudios de Greenpeace:

- No han respondido a Greenpeace.
- No brindan garantías de que sus productos no contengan ingredientes transgénicos o sus derivados.
- No han expresado un compromiso claro y sin ambigüedades de que no usar transgénicos en sus productos.

Algunos productos de determinadas marcas que utilizan trigo transgénico según Greenpeace se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados de estudio de Greenpeace de marcas que utilizan o no trigo transgénico.

<u>Sopas y pastas</u>	<u>Pan y galletas</u>	<u>Harinas, tortillas y granos</u>
<ul style="list-style-type: none"> ✓ De Cecco ✓ Divella ✓ Eden Organic (0) ✓ Gallo ✓ Gullón ✓ La moderna ✓ Ricossa (0) ✓ Roland ✓ Santiveri ✓ Verde Valle 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Carla Catalán ✓ Ezequiel ✓ Glutino (Pan Crackers) ✓ Gullón ✓ Ki-An ✓ Manantial de las flores ✓ Pan del artesano ✓ Santiveri 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Del Jardín ✓ Dr Oetker ✓ Ezequiel ✓ Glutino ✓ Old fashioned cake & cookie ✓ Chocolate Chio Cookie & Cake mix ✓ Harina para hot cakes Aires de campo ✓ Hodgsn Mill ✓ Hot cakes Tres estrellas ✓ Loma Bonita ✓ Tortillas Ezequiel ✓ Tortilla Tlayacapan ✓ Verde Valle
<ul style="list-style-type: none"> • All Narutal (ConAgra Foods) • Chef Boyardee (ConAgra Foods) • Kraft • Maggi (Nestlé) • Maruchan • Rosa Blanca • Sopas Knorr (Unilever) 	<ul style="list-style-type: none"> • Bimbo • El globo (Bimbo) • Gamesa (Pepsico) • Kellog's • Lara (Bimbo) • Ricolino (Bimbo) • Marian • Marinela (Bimbo) • Nabisco (Kraft) • Oreo (Kraft) • Oroweat (Bimbo) • Wonder (Bimbo) 	<ul style="list-style-type: none"> • Great Value • Hot Cakes Aun Jemina • Hot cakes Pronto • Maizena (Unilever) • Maseca (Gruma) • Milpa Real (Bimbo) • Minsa • Tia Rosa (Bimbo)

Fuente: (Martina Borghi, 2015)

1.2.11 Regulación actual de OGM en México

Únicamente se tiene conocimiento que existe una ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados, decretada por el Congreso de los Estados Unidos Mexicanos, publicada en el Diario Oficial de la Nación el pasado 18 de marzo de 2005, cuya regulación corresponde a la Ley General de Salud, consta de 124 Artículos.

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



Para cumplir su objeto, la Ley de Bioseguridad De Organismos Genéticamente Modificados 2005 tiene como finalidades:

- I.** Garantizar un nivel adecuado y eficiente de protección de la salud humana, del medio ambiente y la diversidad biológica y de la sanidad animal, vegetal y acuícola, respecto de los efectos adversos que pudiera causarles la realización de actividades con organismos genéticamente modificados;
- II.** Definir los principios y la política nacional en materia de bioseguridad de los OGMs y los instrumentos para su aplicación;
- III.** Determinar las competencias de las diversas dependencias de la Administración Pública Federal en materia de bioseguridad de los OGMs;
- IV.** Establecer las bases para la celebración de convenios o acuerdos de coordinación entre la Federación, por conducto de las Secretarías competentes y los gobiernos de las entidades federativas, para el mejor cumplimiento del objeto de esta Ley;
- V.** Establecer las bases para el funcionamiento de la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados, a través de la cual las Secretarías que la integran deban colaborar de manera coordinada, en el ámbito de sus competencias, en lo relativo a la bioseguridad de los organismos genéticamente modificados;
- VI.** Establecer procedimientos administrativos y criterios para la evaluación y el monitoreo de los posibles riesgos que puedan ocasionar las actividades con organismos genéticamente modificados en la salud humana o en el medio ambiente y la diversidad biológica o en la sanidad animal, vegetal o acuícola;
- VII.** Establecer el régimen de permisos para la realización de actividades de liberación experimental, de liberación en programa piloto y de liberación comercial, de organismos genéticamente modificados, incluyendo la importación de esos organismos para llevar a cabo dichas actividades;
- VIII.** Establecer el régimen de avisos para la realización de actividades de utilización confinada de organismos genéticamente modificados, en los casos a que se refiere esta Ley;

- IX.** Establecer el régimen de las autorizaciones de la Secretaría de Salud de organismos genéticamente modificados que se determinan en esta Ley;
- X.** Crear y desarrollar el Sistema Nacional de Información sobre Bioseguridad y el Registro Nacional de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados;
- XI.** Determinar las bases para el establecimiento caso por caso de áreas geográficas libres de OGMs en las que se prohíba y aquellas en las que se restrinja la realización de actividades con determinados organismos genéticamente modificados, así como de cultivos de los cuales México sea centro de origen, en especial del maíz, que mantendrá un régimen de protección especial;
- XII.** Establecer las bases del contenido de las normas oficiales mexicanas en materia de bioseguridad;
- XIII.** Establecer medidas de control para garantizar la bioseguridad, así como las sanciones correspondientes en los casos de incumplimiento o violación a las disposiciones de esta Ley, sus reglamentos y las normas oficiales mexicanas que deriven de la misma;
- XIV.** Establecer mecanismos para la participación pública en aspectos de bioseguridad materia de esta Ley, incluyendo el acceso a la información, la participación de los sectores privado, social y productivo a través del Consejo Consultivo Mixto de la CIBIOGEM, y la consulta pública sobre solicitudes de liberación de OGMs al ambiente,
- XV.** Establecer instrumentos de fomento a la investigación científica y tecnológica en bioseguridad y biotecnología.

Nuestro país debe siempre tener presente un análisis de riesgo, el cual es una técnica aplicada en muchas áreas diferentes con el propósito de prevenir y minimizar efectos adversos y abarca tres etapas: la evaluación del riesgo, el manejo del riesgo y la comunicación del riesgo. La evaluación de los riesgos derivados del uso de OGMs debe considerar distintos ámbitos, particularmente el medio ambiente y la salud humana. Aunque comúnmente no se evalúan explícitamente los riesgos relacionados con actividades socioeconómicas y culturales, éstos también pueden jugar un papel importante en la toma de decisiones (Ortiz, 2002).



1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

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. El ADN, en cambio, puede haberse fragmentado durante el procesamiento en trozos pequeños pero esto no implica que no puedan ser detectados. Aunque el ADN también se degrada durante la esterilización por calor en el proceso de enlatado de alimentos, todavía es posible obtener pequeños fragmentos con suficientes diferencias de secuencias como para hacer posible la diferencia entre especies cercanas. El ADN utilizado en la identificación de especies es generalmente ADN mitocondrial, aunque también se utilizan secuencias de ADN procedentes de genes de la familia lactina. Ambos tipos de secuencias cumplen con las características necesarias para ser utilizados como indicativos de especie, al estar presentes en todas las especies y presentar una gran variabilidad entre las mismas (López, 2003).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde ADN, la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg^{+}), una solución amortiguadora o buffer y H_2O . Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados ampliaciones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios L., 2013).



1.3.1 Componentes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

El elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. Para entrar en contexto, es importante recordar que la molécula de ADN está formada por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina) que es complementaria con la base de otra cadenas, de tal forma, que el ADN se estructura en una doble hélice. La complementariedad entre las bases está dada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, generando estabilidad a la doble hélice, la carga eléctrica del ADN es negativa y está dada por los grupos fosfatos. En la PCR, el templado son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Por su parte, la ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. La enzima más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas. El rasgo que distingue a esta enzima bacteriana de otras ADN polimerasas de otros organismos es su capacidad para mantener su funcionalidad a temperaturas altas, por lo que se le considere una enzima termoestable, también hay otras enzimas que se utilizan como la Vent, obtenida de la bacteria *Thermococcus litoralis*. Normalmente, casi todas las enzimas que se venden comercialmente son eficientes y generalmente cuando fallan lo hacen por una manipulación incorrecta del usuario. Para que la enzima funcione con alta especificidad y la reacción transcurra exitosamente, también se necesita de primers, dNTPs, Mg⁺, buffer y H₂O (Tamay de Dios L., 2013).

Los primers son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia. Si no se respetan estas reglas, existe la posibilidad de la formación de dímeros de primers, es decir, de productos inespecíficos. Esto repercutiría en el rendimiento de la reacción, así como en la especificidad del producto esperado. Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada «forward» o sentido y otra «reward» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas



por la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (como sucede endógenamente). Con la finalidad de garantizar la formación de un complejo estable entre el templado y los primers, hoy en día existen programas informáticos para diseñar primers con alta especificidad, por lo que se evita la formación de productos inesperados. Incluso, hay laboratorios de biología molecular que se dedican a diseñarlos, sintetizarlos y validarlos para garantizar su especificidad, facilitándole el trabajo al usuario que sólo elige el de su interés y los manda a comprar. Por su parte, los dNTP's son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, por ello es importante que su concentración sea la adecuada ya que de lo contrario pueden afectar la función de la Taq polimerasa. Normalmente, se utilizan a una concentración que oscila entre 0.2 a 1.0 mM. El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8) cuya concentración final de trabajo debe ser 1X. También se usan otros buffers de composición distinta que son fácilmente comprados en el mercado. El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa; regularmente su concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM. En ocasiones ya viene incluido en el buffer, pero en otras se le tiene que agregar. El agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos (Tamay de Dios L., 2013).

1.3.2 Etapas de Reacción en Cadena de la Polimerasa

Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión mostradas en la figura 5.



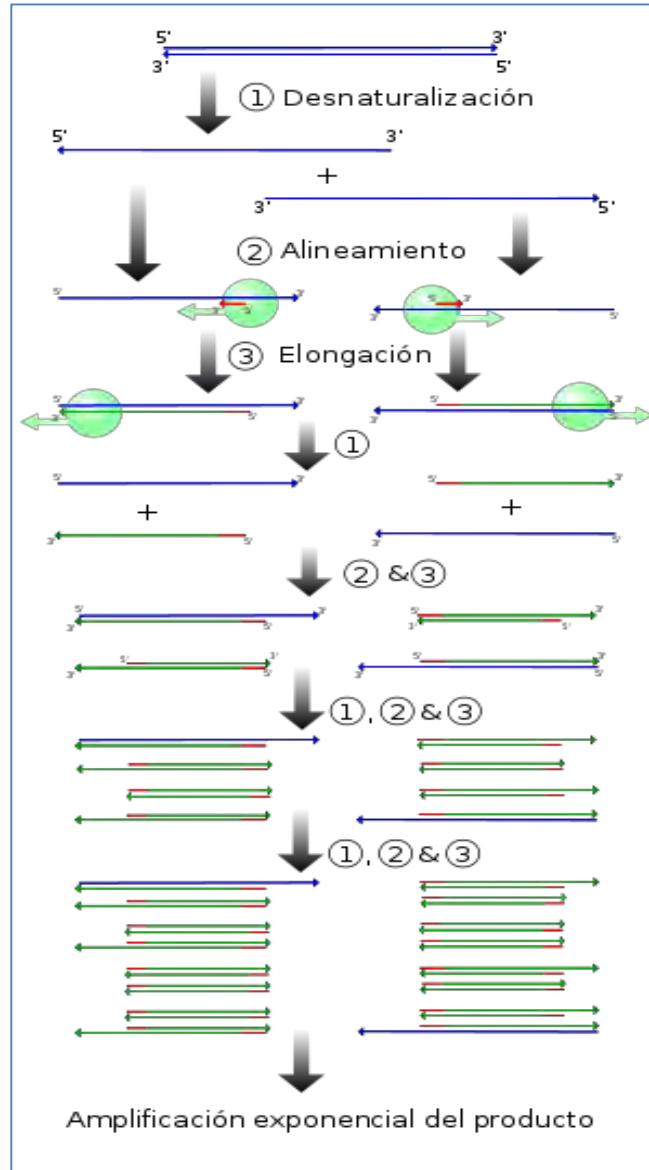


Figura 5. Esquema general de PCR

Fuente: (Retama, 2015)

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

que servirán como templado para el siguiente paso (Tamay de Dios L., 2013).

Hibridación. En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente (Tamay de Dios L., 2013).

Extensión. En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado las ampliaciones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador (Tamay de Dios L., 2013).

1.3.3 Ventajas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Rapidez y sencillez de uso: La PCR permite clonar ADN en pocas horas, utilizando equipos relativamente poco sofisticados. Una reacción de PCR típica consiste en 30 ciclos de desnaturalización, síntesis y reasociación. Cada ciclo dura típicamente de 3 a 5 minutos y se utiliza un termociclador que lleva un microprocesador para programar los cambios de temperaturas y el número de ciclos deseado. Esto supera ampliamente el tiempo requerido para la clonación en células, que suele ser de semanas, o incluso meses. Por supuesto, el diseño y síntesis de los oligonucleótidos cebadores también lleva tiempo, pero este proceso ha sido simplificado gracias a la aparición de programas informáticos para el diseño de los cebadores, y a la proliferación de casas comerciales especializadas en la síntesis de oligonucleótidos por encargo. Una vez que se pone a punto, la reacción puede ser repetida de forma sencilla (UNED, 2000).

Sensibilidad: La PCR puede amplificar secuencias a partir de cantidades ínfimas de ADN diana, incluso a partir de ADN contenido en una sola célula. Esta elevada sensibilidad ha



permitido el desarrollo de nuevos métodos para el estudio de la patogénesis molecular y la aparición de numerosas aplicaciones (ciencia forense, diagnóstico, estudios de paleontología molecular, etc) donde las muestras pueden contener muy pocas células. Sin embargo, el hecho de que el método tenga una sensibilidad tan elevada significa también que se deben extremar las precauciones para evitar la contaminación de la muestra con ADN extraño (UNED, 2000).

Robustez: La PCR permite la amplificación de secuencias específicas de material que contiene ADN muy degradado, o incluido en un medio que hace problemática su purificación convencional. Esto hace que el método resulte muy adecuado para estudios de antropología y paleontología molecular, por ejemplo para el análisis de ADN recuperado de individuos momificados y para intentar identificar ADN de muestras fósiles que contienen poquísimas células de criaturas extintas hace ya mucho tiempo. El método se ha empleado con éxito también para la amplificación de ADN de muestras de tejidos fijadas con formol, lo cual ha tenido importantes aplicaciones en patología molecular (UNED, 2000).

1.3.4 Limitantes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Necesidad de disponer de información sobre la secuencia del ADN diana: Para poder construir oligonucleótidos específicos que actúen como cebadores para la amplificación selectiva de una secuencia particular de ADN se necesita disponer de alguna información previa sobre la propia secuencia a amplificar. Esto implica, por regla general, que la región de interés ya haya sido parcialmente caracterizada, a menudo mediante la aplicación de métodos de clonación basados en sistemas celulares. Sin embargo, y para casos concretos, se han desarrollado varias técnicas que reducen o incluso hacen desaparecer esta necesidad de disponer de información previa sobre la secuencia del ADN diana (UNED, 2000).

Tamaño corto de los productos de la PCR: Una desventaja clara de la PCR como método de clonación de ADN ha sido el tamaño de las secuencias de ADN que permite clonar. A diferencia de la clonación de ADN en células, donde pueden clonarse secuencias de hasta 2 Mb, la información de que se dispone sobre la mayor parte de secuencias clonadas por PCR sitúa el tamaño de los fragmentos clonados entre 0 y 5 Kb, tendiendo hacia el extremo inferior. Los fragmentos pequeños se amplifican muy fácilmente, pero conforme aumenta su tamaño se hace más difícil obtener una amplificación eficiente. En la actualidad sin embargo ya es posible



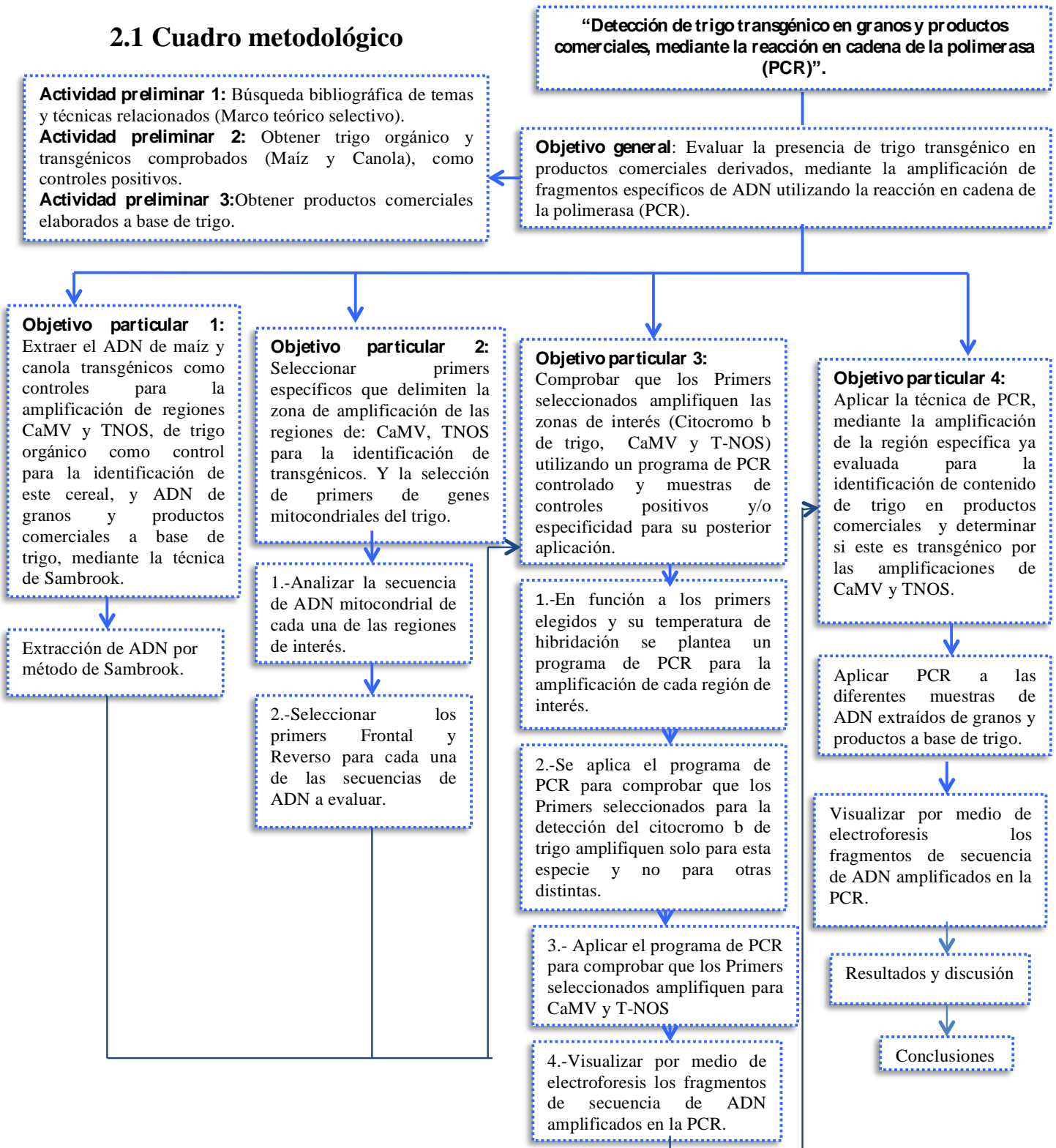
amplificar secuencias por PCR de tamaños entre 20 y 40 Kb (UNED, 2000).

Peligro de contaminación: La facilidad con que se amplifica el ADN exige evitar el peligro de contaminación inherente al poder multiplicador de la reacción. En un tubo en el que se ha realizado una reacción de PCR hay tal cantidad de ADN, que al salir caliente del termociclador y abrir este, el vapor alcanza el ambiente del laboratorio (UNED, 2000).



CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 Cuadro metodológico



Objetivo general:

Evaluar la presencia de trigo transgénico en granos y productos comerciales derivados, mediante la amplificación de fragmentos específicos de ADN utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Objetivo particular 1:

Extraer el ADN de maíz y canola transgénicos como controles para la amplificación de regiones CaMV y TNOS, de trigo orgánico como control para la identificación de este cereal, y ADN de granos y productos comerciales a base de trigo, mediante la técnica de Sambrook.

Objetivo particular 2:

Seleccionar primers específicos de bibliografías que delimiten la zona de amplificación de las regiones de: CaMV, T-NOS, para la identificación de transgénicos. Y la selección primers de genes mitocondriales del trigo.

Objetivo particular 3:

Comprobar que los Primers seleccionados amplifiquen las zonas de interés (Citocromo b de trigo, CaMV y T-NOS) utilizando un programa de PCR controlado para su posterior aplicación.

Objetivo particular 4:

Aplicar la técnica de PCR, mediante la amplificación de la región específica ya evaluada para la identificación de contenido de trigo en productos comerciales y determinar si este es transgénico.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

2.2.1 Material biológico para controles positivos y muestras a estudiar

Se utilizaron 11 muestras de granos recolectados en diversos puntos como mercados, supermercados, locales de la central de abastos y algunos estados de la República Mexicana mostrados en la tabla 7.

Tabla 7. Muestras de granos de trigo

No. Muestra	Muestra de granos	ID
1	Trigo “Mercado Martínez de la Torre CDMX”	T1
2	Trigo “Estado de Puebla”	T2
3	Trigo “Tienda Angel Central de abastos CDMX”	T3
4	Trigo “Estado de Hidalgo”	T4
5	Trigo “Mercado San Antonio CDMX”	T5
6	Trigo “Mercado del Carmen CDMX ”	T6
7	Trigo “Mercado de la Merced CDMX”	T7
8	Trigo “ El molino Central de abastos CDMX”	T8
9	Trigo “Tianguis Col. Roma CDMX”	T9
10	Trigo “Estado Morelia. Michoacán”	T10
11	Trigo “Mercado Coacalco Edo. México”	T11

Se utilizó un total de 22 muestras de productos procesados a base de trigo tanto nacionales (Tabla 8) como importados (Tabla 9), siendo estos productos populares y de fácil acceso al público en general.

Tabla 8. Muestras de productos nacionales a base de trigo

No. Muestra	Muestra de productos nacionales	ID
1	Harina Select	HS
2	Barrita Marinela	BM
3	Kinder Delice	KD
4	Cereal Hall Bran	CHB



5	Harina San Blas	HSB
6	Pan integral Bimbo	PIB
7	Pasta La moderna	PLM
8	Sopa Nissin	SN
9	Pasta Aurrera	PA
10	Sopa Maruchan	SM
11	Barra Multigrano Bimbo	BMB
12	Pasta Itali	PI
13	Napolitano Marinela	NM
14	Tortilla harina Edo. Tlaxcala	THT

Para la obtención de las muestras procesadas a base de trigo importadas, fueron obtenidas en lugares populares de nuestro país, y en la ciudad de Seattle E.U., siendo productos básicos, económicos y de fácil acceso.

Tabla 9. Muestras de productos importados a base de trigo

No. Muestra	Muestra de productos importados	ID
1	Galleta china de la suerte	GCS
2	Galleta Grandma	GG
3	Fideo Chino	FCH
4	Harina Taiwan	HTO
5	Harina Hong Kong	HHK
6	Muffin Seattle	MS
7	Cereal Special K Seattle	CSK
8	Cereal Raisin Bran Seattle	CRB

Se utilizaron muestras de maíz y canola modificados genéticamente y una muestra de trigo orgánico como muestras de control positivo (Tabla 10).

Tabla 10. Muestras de controles internos

No. Muestra	Muestra control	ID
1	Grano de maíz transgénico	MT+
2	Semilla canola transgénico	CT+
3	Grano de trigo orgánico	TO+

Las muestras genéticamente modificadas ya han sido estudiadas y comprobadas con anterioridad en el Laboratorio de Biotecnología de la UIM FESC, siendo estas portadores de los genes de interés CaMV y TNOS.

Tabla 11. Muestras para especificidad de primers de trigo

No. Muestra	Muestras para especificidad de primers	ID
1	Zanahoria	ZA
2	Papa	PA
3	Jitomate	JI
4	Leche	LE
5	Carne de cerdo	CC
6	Carne de Res	CR
7	Papaya	PA

En la tabla 11 se observan las muestras que se utilizaron para hacer la especificidad de primers,

2.2.2 Extracción de ADN

A todas las muestras biológicas obtenidas, como productos, granos y controles, se les extrajo su ADN empleando el protocolo de Sambrook (2001), basado en la disolución del tejido de la muestra usando detergentes y proteinasas, extracción de proteínas y polisacáridos con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico y la precipitación del ADN con etanol.

Reactivos:

- ◆ Muestras de material biológico
- ◆ Etanol frío
- ◆ Mezcla Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico
- ◆ Enzima proteinasa K
- ◆ Solución de lisis (Tris base 50mM, pH=8, EDTA 0.1 M, SDS 0.5%)
- ◆ H₂O libre de nucleasas

Material y equipo:

- ◆ Mortero de porcelana
- ◆ Balanza Analítica Electrónica *Symmetry Cole-Parmer PR 410*
- ◆ Agitador Vortex, *Genie K-55-G*
- ◆ Centrífuga *Mini Spin plus Eppendorf modelo F-45-12-11*
- ◆ Juego de micropipetas
- ◆ Thermomixer compact, Eppendorf.

Método:

Disgregación del tejido:

1. Se trituró una pequeña porción de la muestra en un mortero de porcelana.
2. Se pesaron 125µg de la muestra en un tubo Eppendorff debidamente etiquetado.
3. Se adicionaron 1250µl de solución de Lisis.
4. Se agitó con vortex por 5 a 10 segundos hasta ser homogénea la mezcla.
5. Se adicionó un volumen de 7µl de enzima proteasa previamente concentrada a 20mg/ml.
6. Posteriormente, los tubos que contenían la mezcla se incubaron a 50°C en Thermomixer, por 2 horas.



7. Se desactivó la enzima manteniendo la temperatura en el Thermomixer a 60°C por una hora adicional.

Extracción de proteínas y polisacáridos:

8. Se adicionaron al tubo con la muestra, 250 µl de la mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.
9. Se agitó el tubo con la mezcla varias veces suavemente.
10. Después se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min.
11. Estando las fases separadas, se recuperó la fase acuosa superior que contenía el ADN, con extremo cuidado para evitar que se mezclara con cualquiera de las otras fases.
12. Se trasladó la fase recuperada a 1 tubo eppendorff nuevo de 2ml de capacidad.

Precipitación de ADN

13. Se adicionaron 1500µl de etanol frío a cada uno de los tubos con la muestra.
14. Se mezcló suavemente el tubo con la muestra.
15. Posteriormente se centrifugó a 10,000rpm, durante 10 min.
16. Se decantó el etanol y se secó en Thermomixer a 35°C, el ADN se visualizó pegado al tubo como una ligera mancha blanca transparente.
17. Una vez que el etanol fue completamente evaporado, se adicionaron 50µL de H₂O libre de nucleasas para resuspender el ADN agitando suavemente el tubo hasta su completa disolución.

**Nota: Cuando la solución presenta partículas insolubles, se reintenta la extracción de proteínas y polisacáridos con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, y se vuelve a lavar con etanol.

2.2.3 Cuantificación de ADN

Cuantificación de ADN de las muestras biológicas por medición de absorbancia, este método es útil para detectar cualquier compuesto que absorbe luz significativamente a 260 nm, ya que se presentan ácidos nucleicos altamente puros, lo cual incluye, por ejemplo: ADN, ARN, EDTA y Fenol. La relación de absorbancia 260nm se utiliza como prueba de contaminación de una preparación de ADN y ARN con proteína, puesto que los aminoácidos aromáticos absorben la luz a 280nm. En este caso, sólo un nivel significativo de proteína en la preparación puede causar un cambio significativo en la relación de absorbancia en ambas longitudes de onda.

Para cuantificar la cantidad de ADN, las lecturas se tomaron a 260 y 280 nm. La lectura de 260nm permite conocer la concentración de ácidos nucleicos que contiene la muestra analizada. La relación entre las lecturas a 260 y 280nm proporciona un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos, las preparaciones puras de ADN tiene valores de 1.8, mientras que valores 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 1.8 entonces no puede cuantificar el ADN presente en la muestra (Sambrook y Russell, 2001).

Se utilizó durante la experimentación el ADN a una concentración aproximada de 60 ng/μL y este se deberá diluir con H₂O Libre de nucleasas de acuerdo a:

$$V_1 + C_1 = V_2 + C_2 \dots \dots \text{ec. 1}$$

Donde:

V₁: Volumen inicial (50 μL)

C₁: Concentración inicial

V₂: Volumen final (50 μL)

C₂: Concentración final

Reactivos:

- ◆ ADN de muestras de material biológico
- ◆ H₂O libre de nucleasas

Equipos:

- ◆ Espectrofotómetro, *Abccesolab NanoDrop ND-1000 A113*
- ◆ Juego de micropipetas
- ◆ Tubos *ependorf*

Método:

1. Se encendió la computadora
2. Se abrió el programa de Nanodrop, representado con un icono ND-1000.
3. De la barra desplegada, se seleccionó el botón “Nucleic Acid”.

Calibración del equipo

1. Se colocaron 2 μ L de agua libre de nucleasas en el pequeño orificio que se encuentra en la base del equipo, teniendo cuidado con la gota que se formó en el centro.
2. Se bajó el brazo del equipo.
3. En la pantalla de la computadora se presionó el icono de “OK”. Se escuchó un ruido como un ligero golpe, al escuchar el segundo golpe la prueba finalizó.
4. Se levantó el brazo del equipo.
5. Para comprobar su calibración, el equipo no debía mostrar ninguna lectura, en el programa.
6. Se debe remover el agua del espectrofotómetro con un pedazo de papel limpio.

Muestra Blanco

7. Se volvió a colocar un volumen de 2 μ L de agua libre de nucleasas, se bajó el brazo del equipo.
8. En la pantalla de la computadora en el apartado de “Sample ID” se escribió “Blanco”, posteriormente se dió clic en el icono de “Blank”.
9. Se esperó a que la prueba finalizara, se levantó brazo del equipo y se limpió, se esperó que los resultados mostrados estuvieran en cero.

Análisis de muestras

10. Se colocaron 2 μ L de la muestra de interés, se bajó el brazo del equipo.

11. En la pantalla de la computadora en el apartado de “Sample ID” se escribió el nombre de la muestra, y se dio clic en el icono donde dice “Measure”.
12. Al concluir la prueba, apareció una serie de datos en la pantalla de la computadora, los datos de interés son “280/260, 260/230 y ng/μL”
13. Se levantó el brazo del equipo y se limpió.
14. Se repitieron los pasos 10 a 14 para el análisis de cada muestra a cuantificar.
15. Al concluir la cuantificación de las muestras de interés, se apretó al icono donde dice “Exit” y por ultimo “Esc” para finalizar el programa.

2.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Etapas y ciclos de la reacción

La programación del termociclador se efectúa de acuerdo a la temperatura media de los cebadores (“PRIMERS”) y la enzima del kit utilizado, los tiempos y números de ciclo son según la referencia bibliográfica base o los resultados obtenidos según la experimentaciones previas en el laboratorio (recomendaciones experimentales).

Siendo las etapas de acuerdo (Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, 2010) y representadas en la figura 6:

1. **Desnaturalización:** Es necesario que el ADN se desnaturalice, es decir, que las dos cadenas de ADN se separen y se lleva a cabo elevando la temperatura a alrededor de 94°C.
2. **Hibridación:** Consiste en un descenso de la temperatura para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al DNA molde. Temperaturas habituales en esta fase oscilan entre 35 y 60°C.
3. **Elongación o extensión:** En esta etapa la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores. La temperatura a la que se lleva a cabo esta fase depende de la enzima polimerasa empleada; si se utiliza Taq polimerasa la temperatura de elongación suele ser de 72°C.

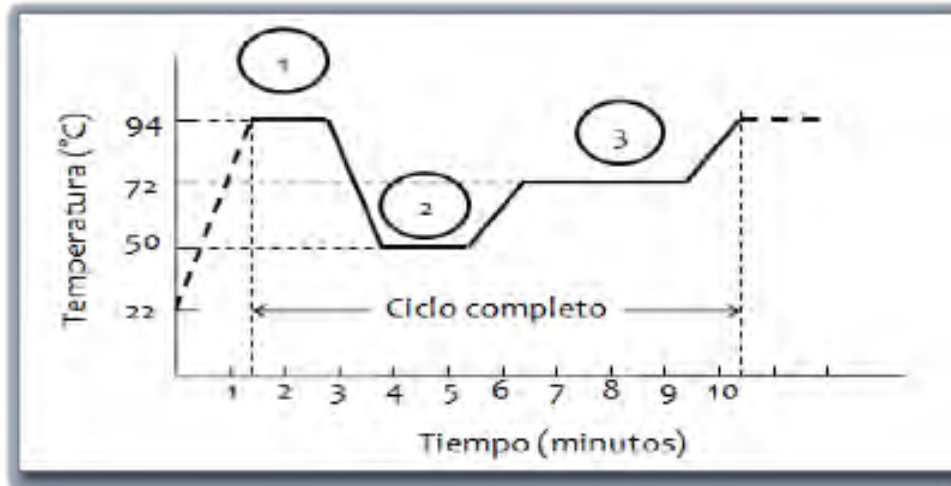


Figura 6. Etapas y condiciones estándar de un ciclo de PCR

Fuente: El Sanhoty y col., 2006

La duración de cada etapa debe corregirse para incluir el tiempo necesario en que la mezcla alcance la temperatura fijada, tiempo que depende de muchos factores (fuente de calor, volumen de la reacción, material del tubo, etc.). La reacción de PCR se ha automatizado: existen aparatos (termocicladores) que pueden programarse para que modifiquen de forma cíclica las condiciones de la reacción de modo que la muestra pueda atravesar repetidamente las tres etapas del proceso de amplificación (Perera y col., 2003).

Es fundamental la estandarización de las concentraciones de los componentes principales de la reacción (primers y ADN). Los primers deben ser solubilizados a una concentración de 250 μL , mientras que el ADN requiere una concentración baja aprox. [60 $\text{ng}/\mu\text{L}$].

. Reactivos:

- ◆ Kit “Phire Plant Direct” para especificidad (Comprobación de especie *Triticum* en granos y productos).
- ◆ Kit “Master mix” detección de promotores transgénicos.
- ◆ Primers específicos de trigo.
- ◆ Primers específicos de CaMV.
- ◆ Primers específicos de T-NOS.

Materiales y equipo:

- ◆ Termociclador, *Apollo ATC401 CLP*.
- ◆ Juego de micro pipetas.
- ◆ Tubos *ependorf*.
- ◆ Agitador Vortex.
- ◆ Microcentrifuga.

Preparación de la reacción

La preparación de las muestras para la reacción se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo que preció el kit para PCR.

Tabla 112. Kit "Master Mix" Componentes

Kit "MASTER MIX"	1X
Master mix	6.25 μ L
Primer F	0.25 μ L
Primer R	0.25 μ L
H ₂ O Libre de nucleasas	5.0 μ L
Total:	11.75 μ L
Se adiciona 0.75 μ L de ADN respectivo y 0.75 μ L de H ₂ O Libre de nucleasas para la muestra blanco que no contiene ADN, para un total de 12.5 μ L por muestra.	

En la tabla 12 se especifican los componentes del Kit "Mater mix", utilizado con primers CaMV, TNOS para detección de promotores transgénicos y las cantidades usadas para una muestra para realizar la PCR específica.

Tabla 13. Kit "Phire plant direct"

KIT "Phire Plant"	1X
2X Phire Plant PCR Buffer	10µL
Primer F	0.5µL
Primer R	0.5µL
Phire Hot Start II ADN Polymerase	0.4 µL
H ₂ O Libre de nucleasas	7.1µL
Total:	18.5µL
Se adiciona 1.5µL de ADN respectivo y 1.5µL de H ₂ O Libre de nucleasas para la muestra blanco que no contiene ADN, para un total de 20µL por muestra.	

En la tabla 13 se especifican los componentes del Kit "Phire plant direct" "Utilizado para especificidad de *Triticum* spp en granos y productos comerciales y las cantidades usadas para una muestra para realizar la PCR específica.

1. Se preparó según lo especificado en los Tablas 12 y 13, de acuerdo al número de muestras con las que se trabajó en cada corrida y una muestra blanco en cada experimentación, en un tubo eppendorf con todas las cantidades requeridas. (No añadiendo ADN).
2. Se mezcló en la microcentrífuga y repartió equitativamente entre el número de muestras en tubos eppendorf previamente etiquetados para su identificación.
3. Se agregó a cada tubo su correspondiente de ADN de las muestras, recordando que siempre se debe tener una muestra blanco, es decir sin adición de ADN.
4. Se homogeneizó cada tubo con muestra en vortex y microcentrífuga con lapsos cortos.
5. Se colocó cada tubo con muestra en el termociclador.
6. Se programó el termociclador con las condiciones respectivas y se inició la prueba.

2.2.5 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis es una técnica bioquímica estándar para la separación de moléculas sobre la base del tamaño y la carga eléctrica. Hay varios tipos diferentes de electroforesis; para separar las moléculas de ADN se utiliza electroforesis en gel. El gel es sometido al paso de corriente a través de él. Dado que el grupo fosfato de cada nucleótido de ADN posee una carga negativa, así los fragmentos de ADN migran hacia el extremo positivo del gel y la movilidad de estos dependerá de su tamaño (Perera y col., 2003).

Reactivos

- ◆ Agarosa, *Gibco ERL*.
- ◆ Tris acetato y EDTA (TAE) 1X como solución buffer, pH=8.
- ◆ Bromuro de etidio en concentración (BrET) de 10mg/ml.
- ◆ Marcador de peso molecular, Promega.
- ◆ Tinte cargador azul/naranja 6X, Promega.
- ◆ Muestras de las reacciones de PCR.

Materiales y equipo

- ◆ Fuente de poder, Bio-Rad PowerPac 200
- ◆ Cámara y Cassete de electroforesis, Apollo 75.710
- ◆ Micropipetas
- ◆ Parafilm
- ◆ Transiluminador de luz UV marca Claver Scientific LTD.
- ◆ Equipo de fotografía para luz UV marca Kodak digital Science.

Método:

1. Se pesó agarosa para preparar un gel de acuerdo al tamaño del amplificado, la concentración requerida varió siendo 1.25g a 2% para muestras de trigo y 1.5g a 3% para CaMV y TNOS, solubilizándolos en 50 ml de amortiguador TAE 50x, ya que es la

capacidad estándar de la cámara de electroforesis utilizada en el laboratorio.

2. Se calentó un poco para que la agarosa se disolviera por lapsos cortos, evitando que esta ebullición y se evaporaran los componentes.
3. Se agitó suavemente, esperando que la mezcla enfriara sin gelificar.
4. Se agregó una gota de Bromuro de Etidio (BrEt) y se agitó suavemente para disolver.
5. Se transfirió la solución de agarosa a la charola de electroforesis y colocaron los peines respectivos, para la formación de pozos.
6. Cuando el gel de agarosa solidificó y se retiraron los peines respectivos.
7. El gel se colocó en la charola en la cámara de electroforesis.
8. Se agregó a la cámara la cantidad necesaria de amortiguador TAE 1X, para cubrir el gel en su totalidad.
9. Se colocaron sobre un trozo de parafilm 5µl de cada muestra a leer, con 3 µl de azul de bromofenol y 3 µl de Bromuro de Etidio (BrEt) diluido, mezclándolos perfectamente con ayuda de la micropipeta.
10. Se utilizó marcador de peso molecular que siempre se colocó en el primer pozo de cada fila del gel, mezclándolo con 1.6µl de marcador con 3 µl de azul de bromofenol y 3 µl de BrEt diluido
11. Se transfirió cada muestra totalmente mezclada a uno de los pozos del gel de agarosa, tomando en cuenta que en el primer pozo siempre se colocó el marcador de peso molecular para el análisis de los resultados.
12. Se encendió la fuente de poder programando el voltaje a 60V, hasta que el marcador llegara a 1cm aproximadamente del borde de los pozos contiguos o el final del gel.
13. Se apagó la fuente de poder y se retiró cuidadosamente el gel.

2.2.6 Análisis de los resultados de electroforesis

Método:

- Se esperó a que se le quitara al gel el exceso de TAE 50x, con extremo cuidado de no romperlo o dañarlo.
- Se colocó el gel cuidadosamente dentro del transiluminador, se cerró la puerta encendiendo el equipo.
- Se encendió la luz UV enfocando el gel y se tomó la fotografía respectiva.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 OBJETIVO PARTICULAR 1

Extracción del ADN de maíz y canola transgénicos como controles para la amplificación de regiones CaMV y TNOS, de trigo orgánico como control para la identificación de este cereal, y ADN de granos y productos comerciales a base de trigo, mediante la técnica de Sambrook.

3.1.1 Extracción y cuantificación de ADN de controles positivos y control interno

El primer procedimiento de la experimentación fue obtener las muestras los controles positivos de CaMV con maíz transgénico y TNOS con canola transgénica, como se mencionó con anterioridad. Estos controles se encuentran en el Laboratorio de biotecnología, y han sido estudiados y comprobados, Como control interno se utilizaron granos de trigo orgánico, los cuales fueron obtenidos en una tienda que vende productos orgánicos llamada Green Corner, la cual garantiza la calidad y obtención rudimentaria de sus productos y asegura que no usan plantas o productos transgénicos y/o químicos adicionales que alteren y afecten la composición natural de los alimentos.

Para la extracción de ADN se empleó el protocolo de Sambrook antes descrito y se cuantifico la concentración de ADN obtenida de cada muestra a través del NanoDrop ND-1000.

Tabla 14. Concentraciones de ADN de los controles positivos de maíz y canola transgénicos y como control interno trigo orgánico.

No. Muestra	Muestra control	ID	260/280 Inicial	ng/ μ L Inicial	260/280 Final	ng/ μ L Final
1	Grano de maíz transgénico	MT+	1.94	2,815.4	1.90	83.2
2	Semilla canola transgénico	CT+	1.83	1,973.4	1.80	67.1
3	Grano de trigo orgánico	TO+	1.81	234.7	1.79	63.9

En la tabla 14 se muestran las concentraciones iniciales y finales obtenidas de ADN de las semillas de los controles, las concentraciones iniciales fueron muy altas y se tuvieron que diluir aproximadamente hasta 60 ng/μL para poder trabajar con ellas y no afectar la hibridación de los primers al realizar la PCR.

3.1.2 Extracción y cuantificación de ADN de granos de Trigo

Posteriormente se extrajo el ADN de las 11 muestras de granos de trigo, las cuales se consiguieron en diversos puntos comerciales y Estados de la República Mexicana, obteniendo las concentraciones de ADN mostradas en la tabla 15, cuantificadas en el NanoDrop ND-1000.

Tabla 15. Concentraciones de ADN de granos de trigo

No. Muestra	Muestra de granos	ID	260/280 Inicial	ng/μL Inicial	260/280 Final	ng/μL Final
1	Trigo “Mercado Martínez de la Torre CDMX”	T1	1.88	3,899.5	1.83	45.2
2	Trigo “Estado de Puebla”	T2	2.09	1,474.3	1.90	60.7
3	Trigo “Tienda Angel Central de abastos CDMX”	T3	2.04	2,106.0	1.96	61.3
4	Trigo “Estado de Hidalgo”	T4	1.84	3,891.6	1.84	49.6
5	Trigo “Mercado San Antonio CDMX”	T5	1.90	919.6	1.93	49.5
6	Trigo “Mercado del Carmen CDMX ”	T6	1.86	2,007.1	1.84	56.1
7	Trigo “Mercado de la Merced CDMX”	T7	1.81	1,039.3	1.71	52.8
8	Trigo “ El molino Central de abastos CDMX”	T8	1.96	586.7	1.92	63.2
9	Trigo “Tianguis Col. Roma CDMX”	T9	2.01	2,199.8	2.00	54.6
10	Trigo “Estado Morelia. Michoacán”	T10	1.87	1,073.5	1.89	65.1
11	Trigo “Mercado Coacalco Edo. México”	T11	1.36	134.9	1.43	60.7

También las concentraciones iniciales obtenidas de ADN de los granos de trigo, fueron muy altas y se diluyeron aproximadamente hasta 60 ng/μL con agua libre de nucleasa. Se puede observar que la relación 260/280 da valores variables a 1.8 que es el valor ideal para indicar que no existe contaminación significativa de proteínas o de ARN, aunque los valores son variables e indica la presencia de proteínas son cercanos al valor ideal y se pudo trabajar con estas concentraciones obtenidas de ADN, para demostrarlo se realizó una corrida en gel de agarosa al 1% a 60V para ver la pureza y comportamiento del ADN obtenido de los granos de trigo.

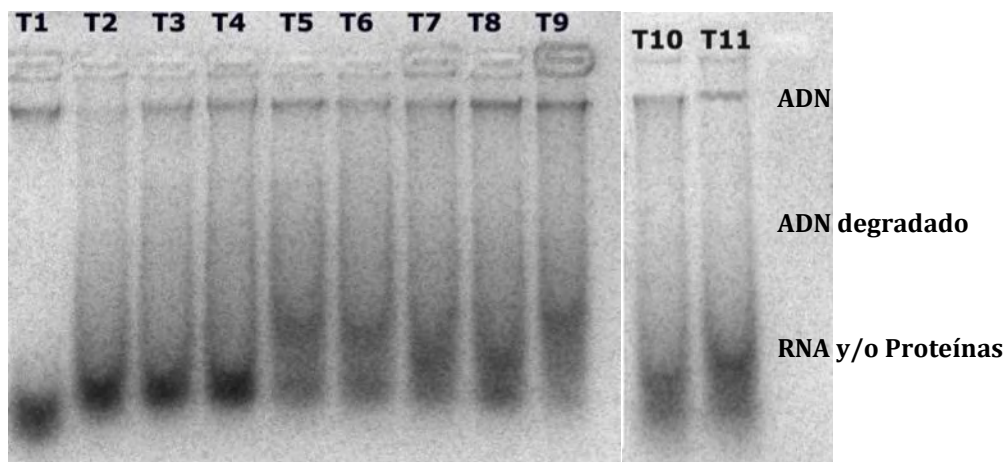


Figura 7. Gel de agarosa al 1% y 60V para electroforesis de pureza de ADN de granos de Trigo, con (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11) .

En la figura 7 se puede observar que el ADN se extrajo de forma exitosa, la franja negra superior es el ADN extraído, seguida por un barrido siendo este el ADN degradado y quedando en la parte inferior una saturación de pigmentos, los cuales representan presencia de ARN y/o proteínas. En la muestra T2 no se muestra mucho ADN contenido pudiendo ser por la concentración de proteínas presente, pero a pesar de la baja concentración se trabajó con esta muestra, ya que al cuantificarlo en el NanoDrop ND-1000 y como se mostró en la tabla 15 se obtuvieron resultados adecuados.

3.1.3 Extracción y cuantificación de ADN de productos procesados nacionales e importados

Las muestras de productos procesados a base de trigo, se eligieron dos grupos de muestras siendo productos nacionales e importados, tomando en cuenta que son productos de fácil acceso al público en general, y son productos populares.

En las muestras de galletas, panes o pastelillos al realizar la extracción de la técnica de Sambrook de ADN, en la etapa de extracción de proteínas y polisacáridos, de la fase acuosa superior que contenía el ADN, esta contuvo un poco de restos de muestra orgánica y la primer fase recuperada se trasladó a 1 tubo eppendorff nuevo de 2ml de capacidad y se hizo un lavado adicionando de 250 µl de la mezcla de fenol cloroformo alcohol isoamilico agitando ligeramente el tubo con la muestra y después se centrifugaron por 10 minutos más, separando la fase acuosa superior sin restos orgánicos y se continuo con el proceso antes descrito de la extracción de ADN.

Tabla 16. Concentraciones de ADN de muestras de productos nacionales a base de trigo

No. Muestra	Muestra de productos nacionales	ID	260/280 Inicial	ng/µL Inicial	260/280 Final	ng/µL Final
1	Harina Select	HS	1.77	1,164.4	1.79	87
2	Barrita Marinela	BM	1.53	1,259.7	1.48	96.4
3	Kinder Delice	KD	1.62	987.4	1.56	63.9
4	Cereal Hall Bran	CHB	1.65	1,920.1	1.57	59.8
5	Harina San Blas	HSB	1.82	1,916.2	1.7	72.3
6	Pan integral Bimbo	PIB	1.79	1,724.7	1.66	57.4
7	Pasta La moderna	PLM	1.7	4,892.1	1.73	52.3
8	Sopa Nissin	SN	1.49	651.2	1.49	58.2
9	Pasta Aurrera	PA	1.91	672.5	1.83	60.8
10	Sopa Maruchan	SM	1.91	461.2	1.89	68.9
11	Barra Multigrano Bimbo	BMB	1.9	2,837.7	1.87	70.2
12	Pasta Itali	PI	1.95	561.3	1.87	64.3
13	Napolitano Marinela	NM	2.27	703.5	1.98	59.3
14	Tortilla Harina Fido Tlaxcala	THT	1.77	1,689.1	1.83	53.4

La tabla 16 muestra las concentraciones iniciales obtenidas de ADN al cuantificarlas en el NanoDrop ND-1000 fueron altas y se diluyeron hasta 60 ng/μL aproximadamente para poder trabajar con en ellas. De acuerdo a la relación 260/280 siendo 1.8 que es el valor ideal para indicar que no existe contaminación significativa de proteínas o de ARN, y los valores menores de 1.8 nos indica que pudo existir contaminación de proteínas de la muestra o a los componentes de la técnica para la extracción de ADN que no se eliminaron en su totalidad.

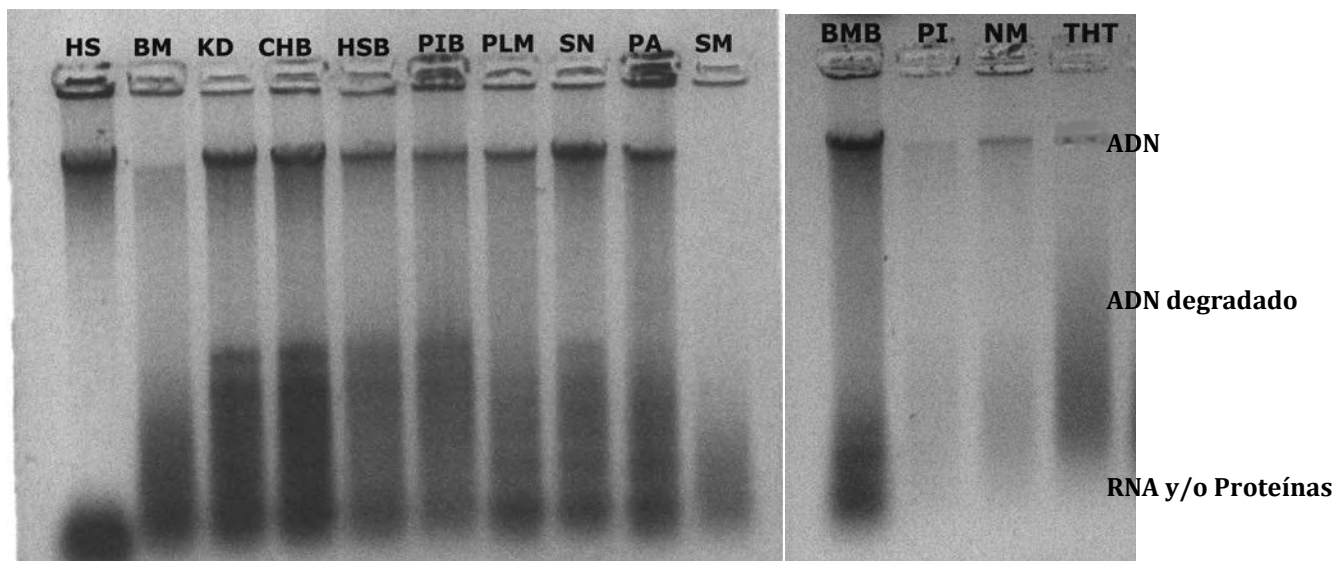


Figura 8. Gel de agarosa al 1% y 60V para electroforesis de pureza de ADN de productos nacionales a base de trigo, con (HS) Harina Select, (BM) Barrita Marinela, (KD) Kinder Delice, (CHB) Cereal Hall Bran, (HSB) Harina San Blas, (PIB) Pan integral Bimbo, (PLM) Pasta La moderna, (SN) Sopa Nissin, (PA) Pasta Aurrera, (SM) Sopa Maruchan, (BMB) Barra Multigrano Bimbo, (PI) Pasta Itali, (NM) Napolitano Marinela, (THT) Tortilla harina Edo. Tlaxcala.

En la figura 8, se puede observar el comportamiento del ADN de los productos nacionales, en un gel agarosa al 1% corrido a 60V, observando que la franja negra superior es el ADN extraído, seguida por un barrido siendo este el ADN degradado y quedando en la parte inferior una saturación de pigmentos que representan presencia de ARN y/o proteínas. En las muestras identificadas como BM, PI, NM y THT no se muestra mucho ADN contenido pudiendo ser por la concentración de proteínas presente, pero al cuantificarlo en el NanoDrop ND-1000 se obtuvieron concentraciones de ADN adecuadas para trabajar con dichas muestras.

Tabla 17. Concentraciones de ADN de muestras de productos importados a base de trigo.

No. Muestra	Muestra de productos importados	ID	260/280 Inicial	ng/ μ L Inicial	260/280	ng/ μ L Final
1	Galleta china de la suerte	GCS	1.83	1794.1	1.80	60.3
2	Galleta Grandma	GG	1.67	1470.3	1.59	87.4
3	Fideo Chino	FCH	1.80	2352.7	1.83	70.5
5	Harina Taiwan	HTO	1.89	2970.4	1.79	84.7
6	Harina Hong Kong	HHK	1.64	860.6	1.57	73.2
7	Muffin Seattle	MS	1.7	1497.2	1.66	69.8
8	Cereal Special K Seattle	CSK	1.65	841.3	1.66	96.9
9	Cereal Raisin Bran Seattle	CSB	1.58	1425.4	1.62	49.8

En la tabla 17 se muestran las concentraciones de ADN obtenidas de muestras de productos importados a base de trigo, las concentraciones iniciales se diluyeron con agua libre de nucleasas hasta 60 ng/ μ L aproximadamente para poder trabajar con ellas, se observa que la relación 260/280 da valores variables pero no tan alejados de 1.8 tanto inicial como final, siendo este el valor ideal para indicar que no existe contaminación significativa de proteínas o de ARN y se pudo trabajar con estas concentraciones de ADN de las muestras de productos.

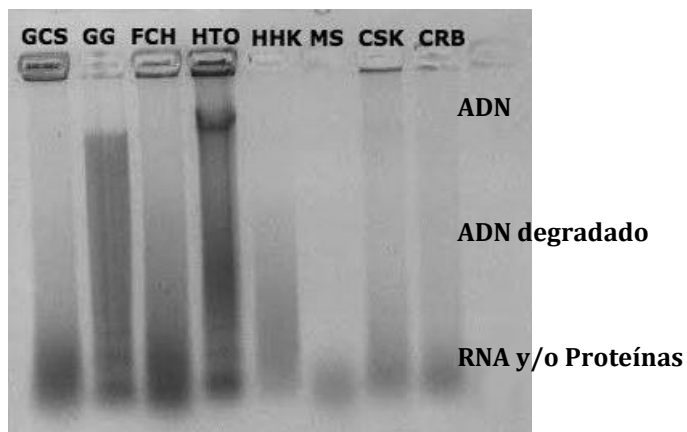


Figura 9. Gel de agarosa al 1% y 60V para electroforesis de pureza de ADN de productos importados a base de trigo, con (GCS) Galleta china de la suerte, (GG) Galleta Grandma, (FCH) Fideo China, (HTO) Harina Taiwan, (HHK) Harina Hong Kong, (MS) Muffin Seattle, (CSK) Cereal Special K Seattle, (CSB) Cereal Raisin Bran Seattle.

Para ver la pureza y comportamiento del ADN obtenido de los productos importados se realizó una corrida en gel de agarosa al 1% a 60V mostrado en la figura 9 y se puede observar el comportamiento del ADN en la imagen no se observan con claridad las franjas negras superiores del ADN extraído en comparación con el gel de agarosa de ADN de las muestras de productos nacionales; exceptuando la muestra HTO en donde se encuentra saturado el ADN extraído en la parte superior, pero en la mayoría de las muestras se observa un barrido siendo este el ADN degradado y quedando en la parte inferior una saturación de pigmentos que representan presencia de ARN y/o proteínas siendo más significativo en la muestra FCH, esta imagen nos demostró que el ADN no es muy puro siendo un barrido de bajo peso molecular, esto se pudo deber a que estos productos fueron sometidos a tratamientos severos en su elaboración, como altas temperaturas de cocción; pero al cuantificar el ADN en el NanoDrop ND-1000 se obtuvieron resultados variables pero aceptables mostrados en la tabla 17, decidiendo que se trabajaría así con estas muestras.

3.1.4 Extracción y cuantificación de ADN de muestras para especificidad de primers de Trigo

Se realizó la extracción de ADN de varias muestras de vegetales, frutos y cárnicos para evaluar y determinar la especificidad de los primers de trigo que se investigaron en este trabajo, cuantificando el ADN obtenido en el NanoDrop ND-1000 y diluyendo las concentraciones de ADN obtenidas con agua libre de nucleasa, los resultados se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Concentraciones de ADN de muestras para uso de especificidad de primers de trigo.

No. Muestra	Muestras especificidad de primers	ID	260/280 Inicial	ng/ μ L Inicial	260/280	ng/ μ L Final
1	Zanahoria	ZA	1.82	3035.2	1.61	80.7
2	Papa	PA	1.9	3091	1.61	94.7
3	Jitomate	JI	1.99	3607.1	1.6	55.5
4	Leche	LE	1.91	403.9	1.62	80.7
5	Carne de cerdo	CC	1.85	324	1.61	83.4
6	Carne de Res	CR	1.99	467.6	1.62	97.5
7	Papaya	PA			1.77	45.9

3.2 OBJETIVO PARTICULAR 2

Seleccionar primers específicos de bibliografías que delimiten la zona de amplificación de las regiones de: CaMV, T-NOS, para la identificación de transgénicos. Y primers de genes mitocondriales del trigo.

3.2.1 Primers promotor CaMV y terminador TNOS

La selección de primers que amplificaron la zona de CaMV 35S y T-NOS fue basado en el artículo de Karamollaoglu y col., (2009) “QCM-based ADN biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs)”; la secuencia de los primers utilizados para los promotores de transgénicos y su tamaño de amplificado en pares de bases (pb) se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Secuencia de primers utilizados para detección de secuenciación de promotor CaMV y terminador TNOS

	Primers (5' → 3')	Tamaño de amplificado
Promotor CaMV 35S (Virus del Mosaico de la coliflor)	F: GCTCCTACAAATGCCATCA	195 pb
	R: GGATAGTGGGATTGTGCGTC	
Terminador T-NOS (Terminador de la nopaline Sintetasa)	F: GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	180 pb
	R: TTATCCTAGTTTGCGCGCTA	

Se utilizó una temperatura media de 60°C la cual permitió la adecuada hibridación de los primers tanto del CaMV como del TNOS

3.2.2 Primers de trigo Citb

Tabla 20. Secuencia de primers para detección de citb de trigo

	Primers (5' → 3')	Tamaño de amplificado	T _m
Trigo	F: CGGTGCGAAACTTGA ACTAC	640pb	58°C
	R: CAGTCCTAGGGAATTTGTTC		

Los primers de trigo que se utilizaron para este proyecto ya se habían diseñado en una investigación anterior (Magaly, 2010), basándome en esta investigación se decidió trabajar con los primers de trigo del citb comprobando su especificidad y calidad, en la tabla 20 se muestra la secuencia de los primers, su tamaño de amplificado en pares de bases (pb) y la temperatura media.

3.3 OBJETIVO PARTICULAR 3

Comprobar que los Primers seleccionados amplifiquen las zonas de interés (Citocromo b de trigo, CaMV y T-NOS) utilizando un programa de PCR controlado para su posterior aplicación.

3.3.1 Diseño de programa de PCR para identificación de trigo

Se diseñó el programa de PCR a base de Tm establecidas de los primers de Trigo y a base de las especificaciones del Kit “Phire Plant Direct”, representado con sus etapas y especificaciones en la figura 10.

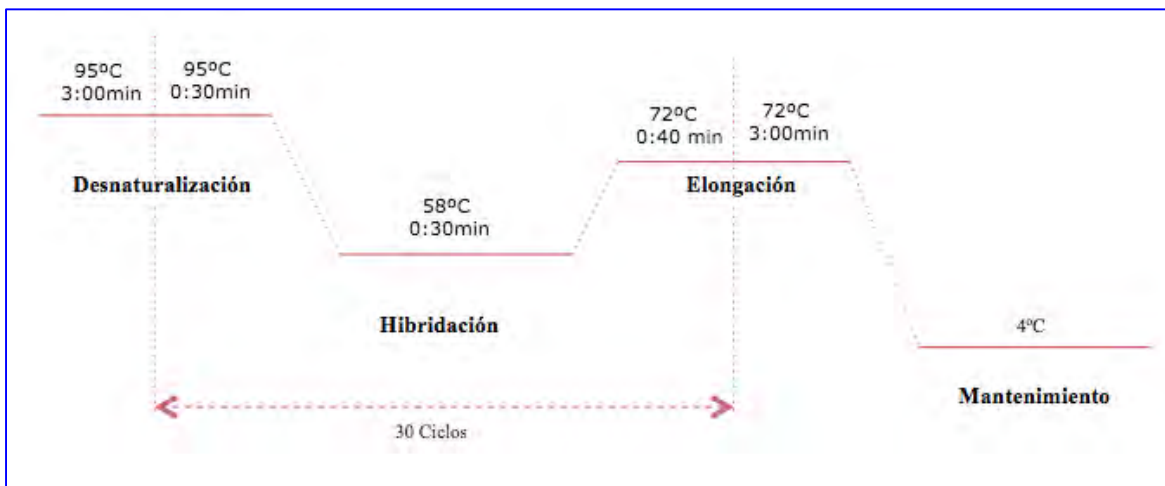


Figura 10. Programa de PCR para especificidad de trigo

3.3.2 Prueba de especificidad de primers de Trigo

Se realizó una prueba con los primers de Trigo, realizando una PCR con el Kit “Phire Plant Direct” para comprobar su especificidad.

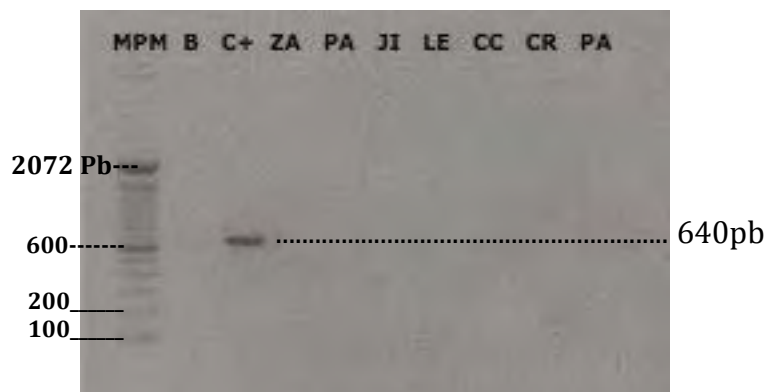


Figura 11. Gel de agarosa al 2% y 60V para electroforesis de especificidad de primers de trigo con (MPB) Marcador de Peso Molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de Trigo orgánico, (ZA) Zanahoria, (PA) Papa, (JI) Jitomate, (LE) Leche, (CC) Carne de cerdo, (CR) Carne de Res, (PA) Papaya.

En la figura 11 se puede observar que nuestros primers de Trigo son específicos, cumpliendo en su totalidad con el objetivo de solo amplificar la zona de interés hibridando únicamente con la especie de trigo, ya que no hubo interacción con las demás especies de vegetales, frutos y proteínas; el amplificado tuvo un tamaño de 640pb siendo el esperado para el trigo, y en el carril de blanco se observa que no hubo contaminación presente que pudiera alterar el resultado y comprobando que el programa de PCR es el adecuado para realizar la experimentación.

Se utilizó como muestra nuestro control interno de trigo orgánico, comprobando así que nuestro control es efectivo y que los primers seleccionados son adecuados para la detección de trigo en granos y productos comerciales.

3.3.3 Diseño de programa de PCR para identificación de promotor CaMV y terminador TNOS

Se diseñó el programa de PCR a base de T_m establecidas de los primers del promotor CaMV y el terminador TNOS y a base de las especificaciones del Kit “Master mix” representado con sus etapas y especificaciones en la figura 12.

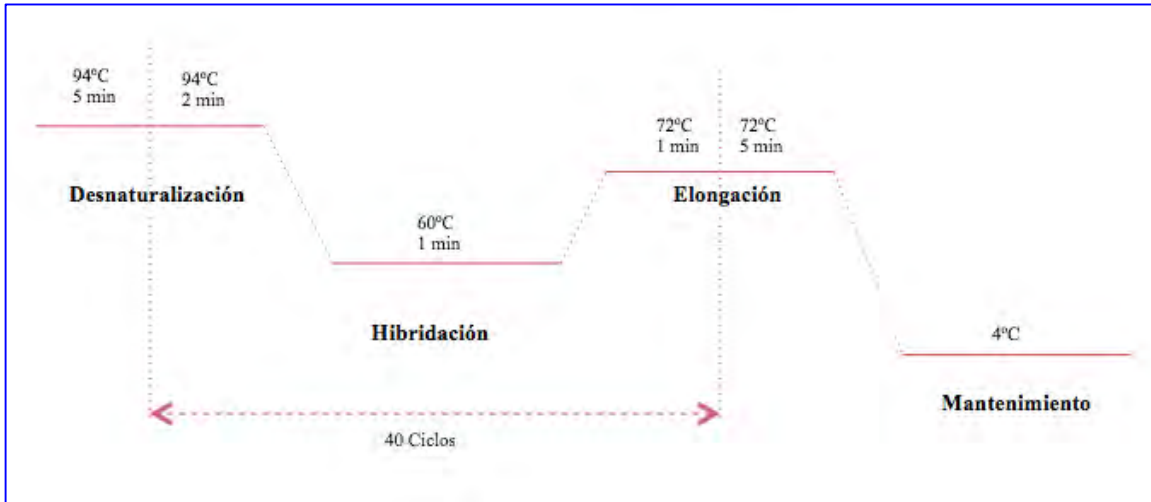


Figura 12. Programa de PCR para promotor CaMV y terminador TNOS

El programa fue diseñado a base del promedio de T_m de los primers específicos de CaMV y TNOS y a base de las especificaciones del Kit “Master mix”.

3.3.4 Prueba de amplificación de CaMV y TNOS

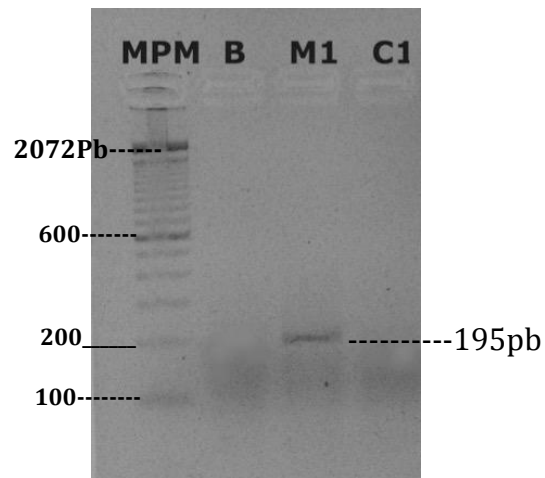


Figura 13. Gel de agarosa al 3% a 70 V para electroforesis de amplificación de primers de CaMV, (MPM) Marcador de peso molecular, (B) Blanco, (M1) Maíz transgénico, (C1) Canola transgénica.

Se observa en la figura 13 que se los primers de CaMV si hibridaron correctamente con la muestra de Maíz, amplificando la zona de interés con 195pb respectivos para CaMV, siendo las temperaturas y tiempos adecuados del programa de PCR.

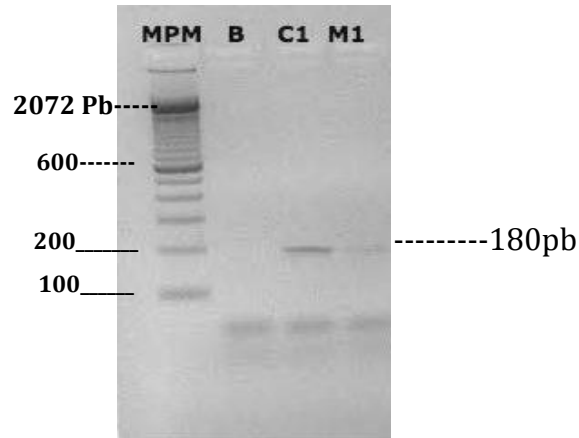


Figura 14. Gel de al 3% a 70V para electroforesis de amplificación de primers de TNOS con (MPM) Marcador de peso molecular, (B) Blanco, (M1) Maíz transgénico, (C1) Canola transgénica.

Se observa en la figura 14 que los primers de TNOS hibridaron correctamente con la muestra de Canola y Maíz, mostrando mayor interacción con la canola, la cual será utilizada como nuestro control para el terminador TNOS amplificando a 180pb con las temperaturas y tiempos adecuados del programa de PCR.

3.4 OBJETIVO PARTICULAR 4

Aplicar la técnica de PCR, mediante la amplificación de la región específica ya evaluada para la identificación de contenido de trigo en productos comerciales y determinar si este es transgénico.

3.4.1 Prueba de especificidad en granos de trigo

Como primer paso se identificó la especificidad de Trigo en las 11 muestras de granos con los primers de Trigo, los cuales fueron comprobados que son específicos para la especie.

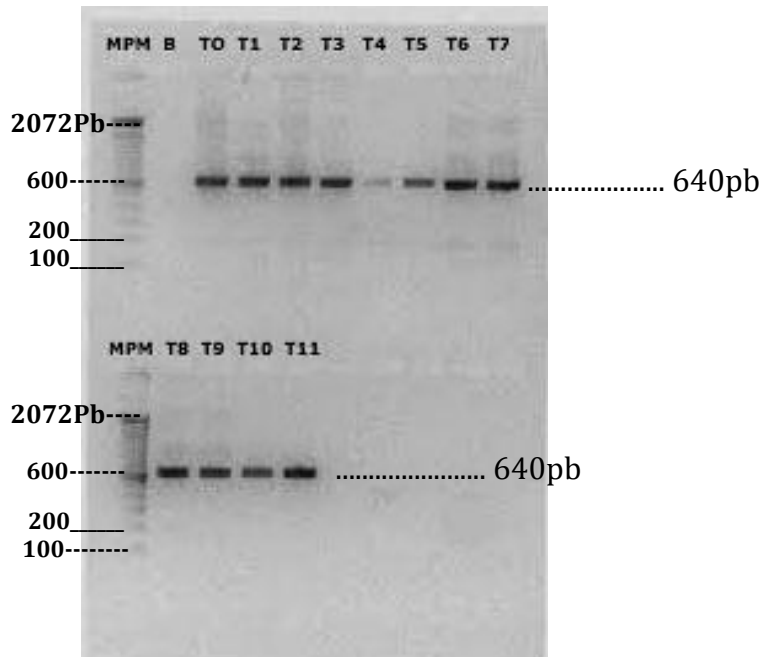


Figura 15. Gel de agarosa al 2% y 60V para electroforesis de especificidad de trigo en granos con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene, (C+) Control positivo con ADN de Trigo orgánico, (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11) ADN de muestras de granos de trigo diversas.

En la figura 15 se puede observar claramente la especificidad de todos los granos como muestras de trigo amplificando a 640pb. Se observa que en la muestra T4 hay un ligero amplificado marcado, esto se pudo deber a un error experimental al realizar la adición de ADN de la muestra estando esta en menor concentración que las demás o el ADN pudo estar contaminado con restos de proteínas.

3.4.2 Prueba de especificidad de trigo en productos comerciales

Se realizó la especificidad de trigo en los productos nacionales y productos importados, teniendo como control interno el trigo orgánico.

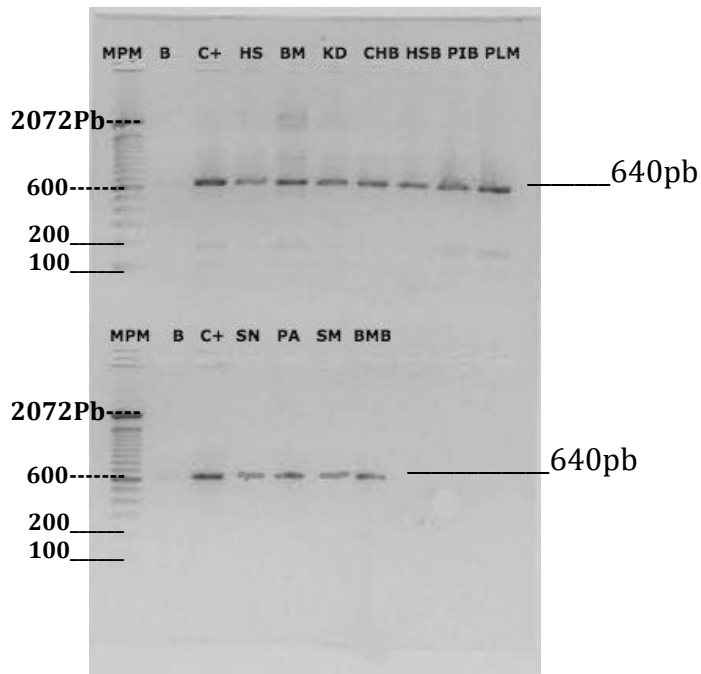


Figura 16. Gel de agarosa al 2% y 60V para electroforesis de especificad de trigo en productos nacionales a base de trigo, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de Trigo orgánico, (HS) Harina Select, (BM) Barrita Marinela, (KD) Kinder Delice, (CHB) Cereal Hall Bran, (HSB) Harina San Blas, (PIB) Pan integral Bimbo, (PLM) Pasta La moderna, (SN) Sopa Nissin, (PA) Pasta Aurrera, (SM) Sopa Maruchan, (BMB) Barra Multigrano Bimbo.

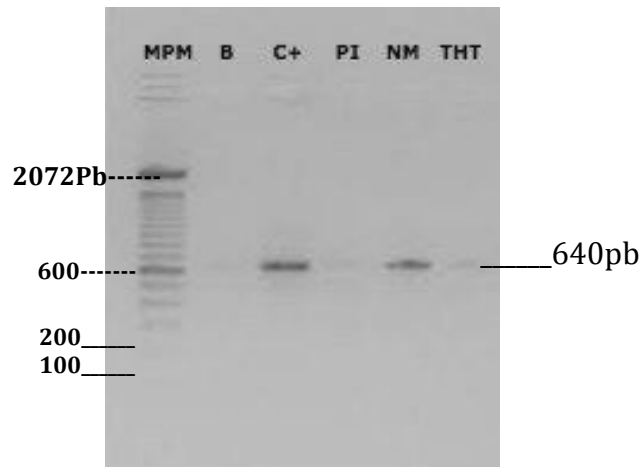


Figura 17. Gel de agarosa al 2% y 60V Electroforesis de especificidad de trigo en productos nacionales a base de trigo, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de Trigo orgánico, (PI) Pasta Itali, (NM) Napolitano Marinela, (THT) Tortilla de Harina edo. Tlaxcala.

En las figuras 16 y 17 se observa que la PCR para especificidad de trigo se llevó de manera adecuada ya que en el carril de blanco no amplificó nada, lo cual indica que no hubo contaminación de las muestras y la presencia de trigo amplificó de manera correcta lo cual se

demonstró con nuestro control positivo, siendo este el trigo orgánico y a su vez las muestras a estudiar amplificaron justo en el tamaño esperado (640pb) a nivel del C+, observando un ligero amplificado para las muestras PI y THT, lo cual pudo haber sido provocado por el proceso que tuvieron estos productos degradando el ADN del trigo o que el ADN de estas muestras pudo haber estado contaminado con proteínas.



Figura 18. Gel de agarosa al 2% y 60V para electroforesis de especificidad de trigo en productos importados, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de Trigo orgánico, (GCS) Galleta china de la suerte, (GG) Galleta Grandma, (FCH) Fideo China, (HTO) Harina Taiwan, (HHK) Harina Hong Kong, (MS) Muffin Seattle, (CSK) Cereal Special K Seattle.

Al realizar especificidad de trigo se observa que se llevó a cabo la PCR de manera exitosa por no haber amplificado visible en el carril de la muestra blanco y al amplificar el C+ que significa que existe la presencia de trigo en la mayoría de las muestras, y se puede observar que hay un amplificado muy tenue en la muestra GCS y nulo en la muestra MS, pudiendo ser provocado por la pureza del ADN o la degradación del ADN de trigo por el proceso al que fue sometido el producto como altas temperaturas o la interacción de algún ingrediente que lo haya degradado.

3.4.3 Amplificación de promotor CaMV en granos y productos comerciales a base de trigo

Después de realizar la detección de trigo en las diferentes muestras de granos y productos comerciales se llevó a cabo la PCR en las muestras pero ahora utilizando los primers que detectan la presencia del promotor de CaMV, el cual si se detecta en las muestras se puede garantizar que estas son transgénicas, pero no se especifica a qué tipo de gen transgénico

corresponde.

El gel de electroforesis en el que se corrieron las muestras después de la PCR se realizó al 3% debido a que cuando el peso molecular del ADN es pequeño se requiere de una concentración mayor del gel de agarosa para tener una mejor migración de las moléculas, deben amplificar a 195 pb en el caso de tener la presencia del virus del Mosaico de la coliflor (CaMV).

Para llevar a cabo la PCR para identificación del promotor CaMV se utilizaron los primers frontal y reverso específicos para este gen, utilizando como control positivo el Maíz transgénico ya evaluado.

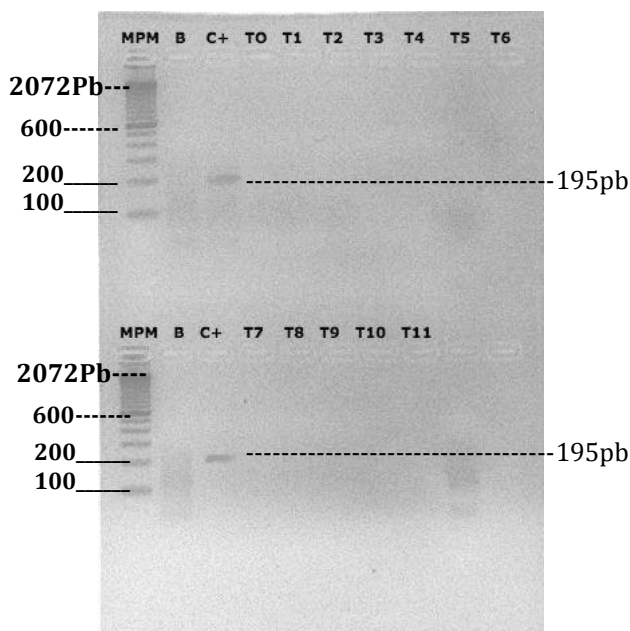


Figura 19. Gel de agarosa al 3% y 60V para electroforesis de CaMV en granos de trigo, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de Maíz transgénico para CaMV, (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11) ADN de muestras de granos de trigo diversas.

En la figura 19 se observa la electroforesis de la PCR realizada que amplificó de manera correcta. No existió una hibridación específica en la muestra blanco, quedando teóricamente vacía, en la muestra de control positivo se observa la amplificación de 196pb del promotor CaMV, pero en la muestras de granos de trigo que se evaluaron no hay amplificado de CaMV, lo cual nos indica que este promotor no ha sido usado en estos granos.

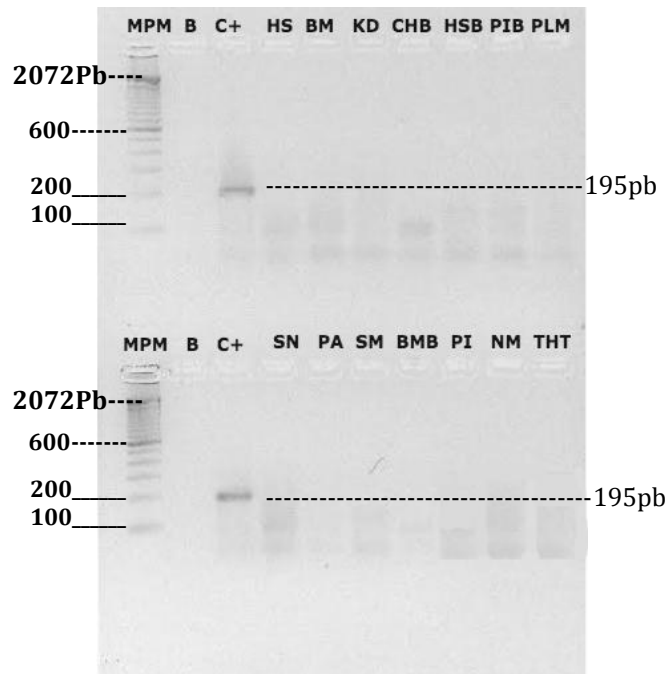


Figura 20. Gel de agarosa al 3% y 60V para electroforesis de CaMV en productos nacionales, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de Maíz transgénico para CaMV, (HS) Harina Select, (BM) Barrita Marinela, (KD) Kinder Delice, (CHB) Cereal Hall Bran, (HSB) Harina San Blas, (PIB) Pan integral Bimbo, (PLM) Pasta La moderna, (SN) Sopa Nissin, (PA) Pasta Aurrera, (SM) Sopa Maruchan, (BMB) Barra Multigrano Bimbo, (PI) Pasta Itali, (NM) Napolitano Marinela, (THT) Tortilla harina Edo. Tlaxcala

En la figura 20 nuevamente se observó la electroforesis de la PCR realizada para la identificación de CaMV en productos nacionales a base de trigo, en la prueba se puede ver que amplifico de manera correcta no existiendo una hibridación en la muestra blanco, quedando teóricamente vacía, en la muestra de control positivo se observa la amplificación del promotor CaMV con 195pb, pero en los productos a base de trigo evaluados no hay amplificado de CaMV, lo cual nos indica que este promotor no ha sido usado en el trigo usado para su elaboración. Los barridos degradados que se muestran pueden ser restos de proteínas.

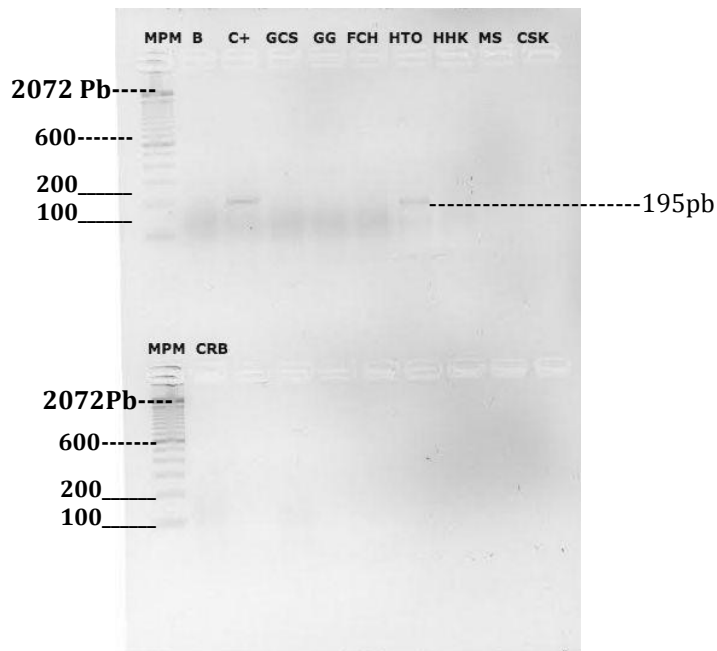


Figura 21. Gel de agarosa al 3% y 60V para electroforesis de CaMV en productos importados, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de Maíz transgénico para CaMV, (GCS) Galleta china de la suerte, (GG) Galleta Grandma, (FCH) Fideo China, (HTO) Harina Taiwan, (HHK) Harina Hong Kong, (MS) Muffin Seattle, (CSK) Cereal Special K Seattle, (CSB) Cereal Raisin Bran Seattle.

En la figura 21 se evaluaron las muestras de productos importados para identificar si contenían el promotor CaMV, llevándose a cabo la PCR de manera correcta ya que la muestra blanco no presenta algún amplificado, y en nuestro control positivo amplificó el gen de interés y en la muestra HTO que es una Harina de trigo importada de Taiwan se observa el amplificado de 195pb correspondiente al promotor CaMV indicando así la presencia de trigo transgénico en este producto y se espera que amplifique también con TNOS.

3.4.4 Amplificación de terminador TNOS en granos y productos comerciales a base de trigo

Para finalizar esta investigación se llevó a cabo la PCR en las muestras pero ahora utilizando los primers que detectan la presencia del terminador TNOS, y si este es detectado en las muestras se puede garantizar que estas son transgénicas, pero no se especifica a que tipo de gen transgénico corresponde.

El gel de electroforesis en el sé que se corrieron las muestras después de la PCR se realizó al 3%, deben amplificar a 180 pb en el Terminador de la nopaline sintetasa (T-NOS).

Se llevó a cabo la PCR para la detección del terminador TNOS utilizando los primers frontal y reverso específicos para este gen, teniendo como control positivo la canola transgénica.

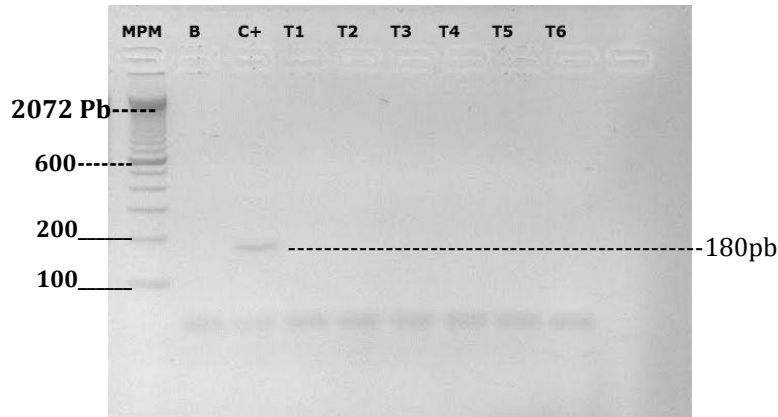


Figura 22. Gel de agarosa al 3% y 60V para electroforesis de TNOS en granos, en con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de canola transgénica para TNOS, (T1, T2, T3, T4, T5, T6) ADN de muestras de granos de trigo diversas.

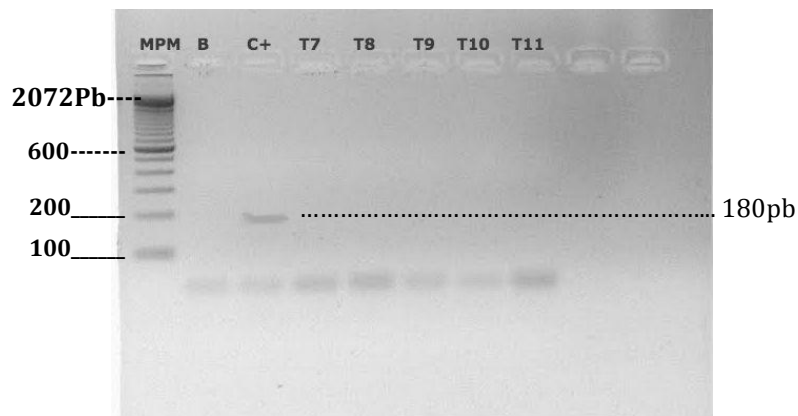


Figura 23. Gel de agarosa al 3% y 60V para electroforesis TNOS en granos, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de canola transgénica para TNOS, (T7, T8, T9, T10, T11) ADN de muestras de granos de trigo diversas.

En las figuras 22 y 23 se muestra la electroforesis realizada después de la prueba de PCR para la amplificación del terminador TNOS a las 11 muestras de granos de trigo, en el cual se observan que la experimentación se llevó a cabo sin presencia de contaminación, ya que en nuestro carril blanco no se presenta algún amplificado, y en el carril de nuestro control positivo

usando el ADN de la canola, se muestra el amplificado de 180pb que corresponde al terminador TNOS el cual no se manifiesta en las muestras de granos de trigo, la ausencia de este indica que no se usó este terminador en estos granos.

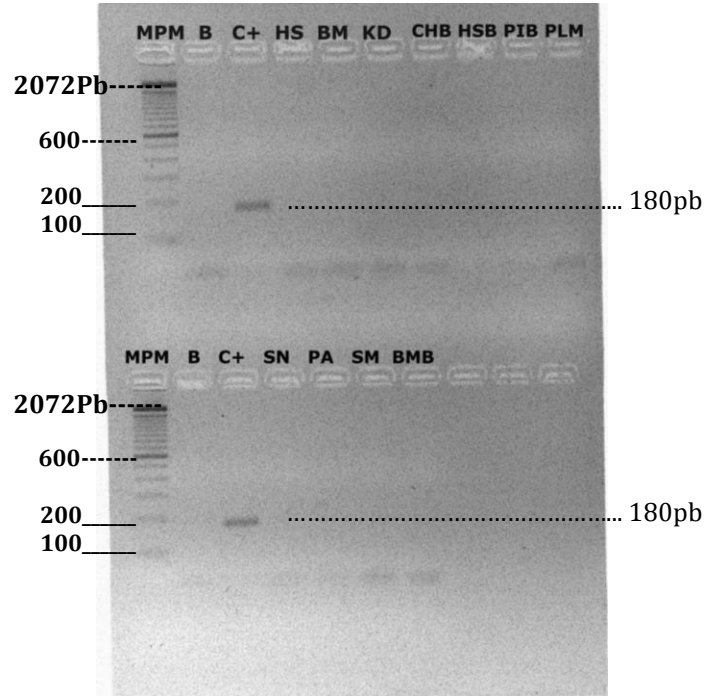


Figura 24. Gel de agarosa al 3% y 60V para electroforesis de TNOS en productos nacionales, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de canola transgénica para TNOS, (HS) Harina Select, (BM) Barrita Marinela, (KD) Kinder Delice, (CHB) Cereal Hall Bran, (HSB) Harina San Blas, (PIB) Pan integral Bimbo, (PLM) Pasta La moderna, (SN) Sopa Nissin, (PA) Pasta Aurrera, (SM) Sopa Maruchan, (BMB) Barra Multigrano Bimbo.

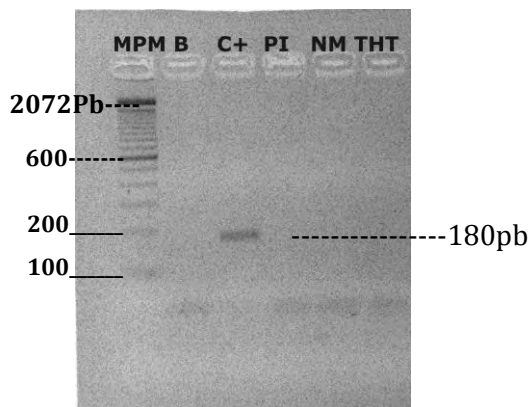


Figura 25. Gel de agarosa al 3% y 60V para electroforesis de TNOS en productos nacionales, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de canola transgénica para TNOS, (PI) Pasta Itali, (NM) Napolitano Marinela, (THT) Tortilla harina Edo. Tlaxcala.

En las figuras 24 y 25 se observa la electroforesis en gel de agarosa realizada a las muestras de ADN de productos comerciales nacionales a base de trigo, estas imágenes nos indican que la PCR fue efectuada de manera adecuada ya que nuestro blanco no tiene presencia de algún amplificado, y el carril de nuestro control positivo amplificó de manera correcta los 180pb esperados del terminador TNOS, el cual tampoco amplificó para ninguna de los 14 muestras, indicando así que este terminador no fue usado en el trigo que contienen estos productos.

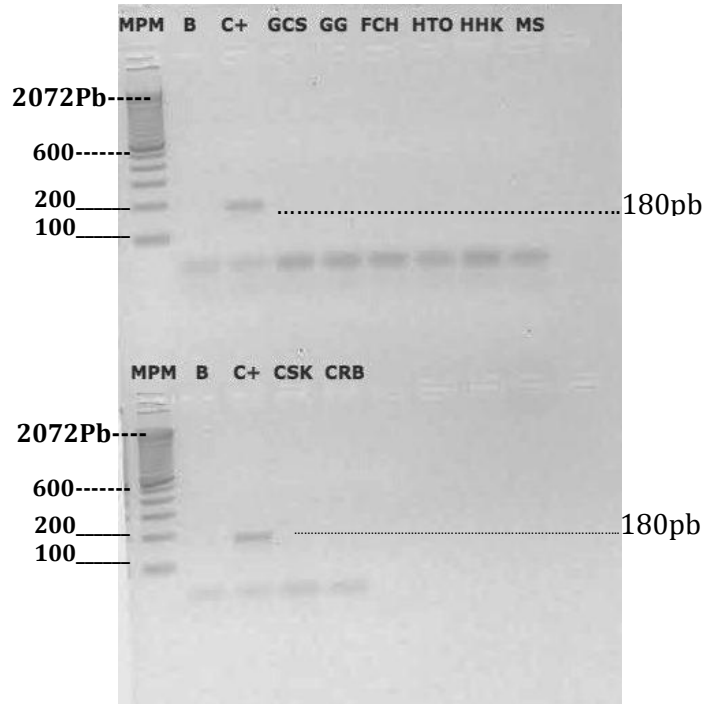


Figura 26. Gel de agarosa al 3% y 60V para electroforesis para TNOS en productos importados, con (MPB) Marcador de peso molecular 1000pb, (B) Muestra blanco que no contiene ADN, (C+) Control positivo con ADN de canola transgénica para TNOS, (GCS) Galleta china de la suerte, (GG) Galleta Grandma, (FCH) Fideo China, (HTO) Harina Taiwan, (HHK) Harina Hong Kong, (MS) Muffin Seattle, (CSK) Cereal Special K Seattle, (CSB) Cereal Raisin Bran Seattle.

Por último se puede observar la electroforesis realizada en la figura 26 a los productos comerciales importados a base de trigo en el cual se muestra que se realizó la PCR de manera adecuada sin presencia de contaminación amplificando los 180pb esperados del TNOS, en esta prueba se esperaba que amplificara la muestra HTO la cual es Harina de Trigo importada de Taiwan, desafortunadamente no existe presencia de este terminador, indicando así que en esta y en las muestras restantes de los productos no se utilizó TNOS como terminador para la inserción de un gen diferente al trigo.

CONCLUSIONES

La metodología desarrollada para la extracción de ADN por método Sambrook, es adecuada para granos de trigo y para productos a base de trigo teniendo cuidado con la presencia de residuos de proteínas de los ingredientes adicionales al producto, se mejora la extracción con un lavado adicional agregando 250 µl de la mezcla de fenol cloroformo alcohol isoamilico, mezclando y centrifugando por 10 minutos y separando la fase acuosa superior sin restos orgánicos y/o se recomienda adecuar la técnica según las necesidades del ADN a extraer, cuantificando el ADN extraído con equipos especializados como el Nanodrop ND-1000 A113 o con apoyo de una electroforesis con gel de agarosa.

El desarrollo experimental mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de trigo en granos y productos derivados de este fue adecuada, ya que los primers demostraron ser específicos hibridando únicamente con el ADN de este cereal, determinando la especificidad de trigo en los 11 granos y 22 productos evaluados. La metodología y programas de PCR pueden ser utilizados para investigaciones que requieran la identificación de trigo, demostrando así las ventajas de la técnica de PCR.

Respecto a la metodología para la detección de organismos genéticamente modificados fue ideal, ya los fragmentos del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) siendo el promotor más utilizado en plantas y del Terminador de la nopaline sintetasa (T-NOS) amplificaron de manera correcta en los controles de Maíz y Canola transgénicos, de los 11 granos y 22 productos derivados de trigo evaluados únicamente tuvo presencia el promotor CaMV en una harina de trigo de Taiwán indicada con la nomenclatura HTO, la cual fue conseguida en una mercado de origen chino ubicado en la colonia Tabacalera de la CDMX, la harina es de la marca “Uni-President”, este mercado está abierto al público y abastece a los restaurantes de comida china populares de la zona, este producto es utilizado para el famoso capeado de alimentos, elaboración de pastas entre otros usos, indicando así que el consumo de trigo transgénico no es publicado de manera abierta a pesar de que existe la “Ley de Bioseguridad de organismos genéticamente modificados” que exige que en el etiquetado se especifique si algún ingrediente del producto esta modificado genéticamente, pero esta ley no se cumple.

En México se consumen alimentos comerciales con residuos transgénicos que carecen de etiquetas que informen acerca de esos residuos y no existe la regulación adecuada a los productos que se importan a nuestro país.

A pesar de tener técnicas para la identificación de promotores y terminadores como CaMV y TNOS entre otros, no es fácil determinar cuál es el gen insertado en la planta para hacerla transgénica. Es indispensable seguir el monitoreo de trigo y otras especies de cereales, frutos y verduras importantes en nuestro país, para la identificación con otros promotores y terminadores, para tener actualización de la presencia de transgénicos y de las leyes de bioseguridad que omiten los productores o la falta información a nosotros los consumidores.

Por la importancia de consumo del trigo a nivel mundial, actualmente se celebra la llegada próxima de un trigo transgénico libre gluten en España y en México según SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, 2016) se encuentra en fase experimental la plantación de trigo transgénico en Tlaltizapán, Morelos, esta planta cuenta con una mejor producción de biomasa y mejor respuesta ante el estrés por salinidad y sequía proveniente de Australia.

El mejoramiento de plantas transgénicas puede ser favorable para adición de nutrimentos, resistencia a las condiciones climáticas y herbicidas, teniendo énfasis en que se regule de manera estricta y correcta apegados a las leyes existentes y modificando estas sin beneficiar solo a particulares, y sin afectar la tierra, sin extinguir especies originales de granos o teniendo consecuencias en su consumo.

El desarrollo de técnicas y experimentación realizadas en esta investigación pueden ser de ayuda para determinar metodologías confiables para llevar a cabo la “Ley de Bioseguridad de organismos genéticamente modificados” y/o para continuar con la investigación de diversos alimentos transgénicos que aún no se hacen públicos, porque aún no se ha demostrado la seguridad de estos al 100% y así también se protegen las especies nativas de granos y cereales principalmente ya que son para consumo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Aguilar, A. R. (2010). Situación actual del trigo. Distrito Federal: SAGARPA.
- 2 Altieri, M. A. (1999). Riesgos ambientales de los cultivos transgénicos: una evaluación agroecológica. (M. A. Altieri, Ed. 14) Red, Gestión de Recursos Naturales.
- 3 ArgenBio. (2007). Por qué biotecnología. Recuperado el Diciembre de 2016, de <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/>
- 4 Bogdan, J. D. (2003). Cereales y productos derivados química y tecnología. Zaragoza, Editorial Acribia.
- 5 Bolivar Zapata, F. (2011). Por un uso responsable de los Organismos Genéticamente Modificados. Distrito Federal: Academia Mexicana de ciencias.
- 6 Canadian Grain Commission. (Julio de 2008). Canadian Grain Commission. Recuperado el 02 de Septiembre de 2014, de Canadian Grain Commission: <http://www.grainscanada.gc.ca/index-eng.htm>
- 7 Centre for Crop Genetic Improvement, Rothamsted Research, Hertfordshire, UK. (2009). Transgenic wheat barley and oats (1ª edición ed., Vol. 1). (H. D. Shewry, Ed.) UK, Hertfordshire, UK: Humana Press.
- 8 Cultek, S. (2006). www.cultek.com. Obtenido de Tecnología del ADN Recombinante: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/ADNrecombinante/Tecnica%20ADN%20recombinante.pdf>
- 9 El-Sanhoty, R., Shahwan, T., Fawzy, R.M., (2006). Application of artificial neural networks to develop a classification model between genetically modified maize (BT- 176) and conventional maize by applying lipid analysis data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 628-636.
- 10 Fernández, M. (2009). Alimentos transgénicos: ¿Qué tan seguro es su consumo? *Revista Digital Universitaria*, 10 (3), 15.
- 11 Fregoso, J. (14 de Septiembre de 2009). CNN Expansión. (J. Fregoso, Productor) Recuperado el Agosto de 2014, de Luz verde para el trigo transgénico : <http://www.cnnexpansion.com/actualidad/2009/09/14/luz-verde-para-el-trigo-transgenico-1>
- 12 Gobierno de Chihuahua. (2010). Análisis de competitividad del Trigo. Gobierno de Chihuahua, Agricultura, México.
- 13 Greenpeace. (08 de Enero de 2009). Consecuencias del uso de Transgénicos. Recuperado el 20 de Marzo de 2015, de [greenpeace.org](http://www.greenpeace.org): <http://www.greenpeace.org/argentina/es/campanas/bosques/transgenicos/consecuencias-del->

uso-de-trans/

- 14 Grupo Agronegocios. (16 de Junio de 2014). Grupo Agronegocios. Recuperado el Septiembre de 2014, de Foro Agronegocios: <http://www.agronegocios.pe/tecnologia/item/4002-productores-agricolas-de-ee-uu-canada-y-australia-a-favor-de-trigo-transgenico>
- 15 Hareland, G. (2003). Effects of pearling on falling number and a amilase activity of preharvest sprouted spring wheat. . En Cereal chemistry (págs. 232-237).
- 16 Henan Kingman M&E Complete Plant Co.,Ltd (KMEC). (2016). KMEC. Recuperado el 10 de Abril de 2017, de Cómo producir harina de gran calidad: <http://www.molinoharnero.com/faq/como-producir-harina-calidad.html>
- 17 Hernández, G. (2012). CANIMOLT. Recuperado el Agosto de 2014, de Cámara Nacional de la Industria Molinera de Trigo : <http://www.canimolt.org/trigo/el-trigo-en-mexico>
- 18 Hosney RR. 1994. Protein of cereals. En: Principles of Cereal Science and Technology, American Association of Cereal Chemists Inc. St. Paul, Minnesota, Pág 65-79.
- 19 Hosney, C. (1991). Principios de la ciencia y tecnología de los cereales. Zaragoza: Acribia, S. A.
- 20 Instituto de nutricion de centro America y Panama. (2006). Selecccion, sepracion y conservacion de alimentos. Cereales y sus productos, 2. America, Panama.
- 21 Karamollaoglu, I., Avni, O.H., Mutlu, M., (2009). QCM-based ADN biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs). Biochemical Engineering Journal, 44, 142 – 150.
- 22 Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. (2005). Secretaria de Salud. Recuperado el Diciembre de 2016, de Secretaria de Salud: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/ley180305.html>
- 23 Lluch, J. M. (2001). Cultivos Herbaceos extensivos: Cereales (1er Edición ed., Vol. I). (J. M. Lluch, Ed., & J. M. Lluch, Trad.) Valencia, Valencia, España: Universidad politécnica de Valencia.
- 24 López, M., Mallorquín, P y Vega M. (2003). Tecnologías Moleculares de Trazabilidad Alimentaria. Informe de Vigilancia tecnológica. Sector Agroalimentario. Genoma España/CIBT-FGUAM.
- 25 Magaly, F. N. (2010). Propuesta de un protocolo para detectar posibles adulteraciones con Soya y Trigo en leches y quesos comerciales en México aplicando el método de PCR. Tesis Licenciatura, UNAM, Ingeniería en Alimentos, México.

- 26 Martina Borghi, P. T. (2012). Guía de transgénicos y consumo responsable. Septiembre, GREENPEACE.
- 27 Martínez, L. (13 de Marzo de 2014). Elaboran pan de trigo transgénico apto para celíacos. (L. Martínez, Productor, & Muy interesante España) Recuperado el 15 de Marzo de 2015, de Muy interesante: <http://www.muyinteresante.es/salud/articulo/elaboran-pan-de-trigo-transgenico-apto-para-celiacos-841394709066>
- 28 Matz S. 1999. Bakery Technology and Engineering, 3° Edition. Editado por Matz, S. PanTech Internarional, USA.
- 29 Monsanto. (2015). Cisan.org.ar. Obtenido de http://www.cisan.org.ar/cisan_imagenes/notas/infografias/Trans_planta.pdf
- 30 Morcillo O., C. E. (2013). Biotecnología y Alimentación. MADRID: UNED.
- 31 Muñoz, D. H. (2006). Situación actual y perspectivas del trigo. México, Baja California, México: OEIDRUS.
- 32 Observatoriodeprecios.com.mx. (2015). Recuperado el Diciembre de 2016, de Observatorio de Precios : <http://observatoriodeprecios.com.mx/index.php/precios-productos/productos-agropecuarios/trigo/2798-la-caida-del-precio-del-trigo-grano-no-mejorara-en-el-ultimo-trimestre-del-2015>
- 33 OEIDRUS Baja California. (2005). SAGARPA. Recuperado el 25 de AGOSTO de 2014, de <http://www.oeidrus-bc.gob.mx/sispro/trigobc/Descargas/ElCultivoTrigo.pdf>
- 34 OEIDRUS Baja California. (Agosto de 2008). SAGARPA. Recuperado el Agosto de 2014, de <http://www.oeidrusbc.gob.mx/sispro/trigobc/Descargas/BiotecnologiaTrigo.pdf>
- 35 OEIDRUS. (08 de Septiembre de 2013). CADENA AGROINDUSTRIAL DE TRIGO. CADENA AGROINDUSTRIAL DE TRIGO. México, Baja California. Recuperado el 08 de Agosto de 2014, de [Oeidrus: http://www.oeidrusbc.gob.mx/sispro/trigobc/Descargas/ElCultivoTrigo.pdf](http://www.oeidrusbc.gob.mx/sispro/trigobc/Descargas/ElCultivoTrigo.pdf)
- 36 Ospina, M. J. (2002). Características físico mecánicas y análisis de calidad de granos (Vol. I). Colombia, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- 37 Perera J., Tormo A. y García J. L. (2003). Ingeniería genética, preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA. Síntesis, Madrid España. Vol. 1: 40-48, 223-229.
- 38 Pierce Benjamín A. (2010). Genética, un enfoque conceptual. 3a ed. Médica panamericana, Madrid España. P.p. 505-515
- 39 Producción Mundial de Trigo. (2017). Trigo Producción Mundial 2016/2017. Recuperado el

24 de Abril de 2017, de Producción Mundial de Trigo:
<https://www.produccionmundialtrigo.com/>

- 40 Retama. (03 de 11 de 2015). Blog de ciencia y divulgación científica. (wikicommons, Productor) Recuperado el Diciembre de 2016, de <https://divulgadorherbivoro.wordpress.com/2015/03/11/funcionamiento-de-la-pcr-y-la-qpcr>
- 41 Rivas, C. (2010). Plantas y cultivos transgénicos. UNED, Departamento biotecnología. España: UNED.
- 42 Salazar, Z. A. (2000). Calidad industrial de trigo para su comercialización.
- 43 Saldivar, S. R. (2008). Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. (1er edición ed., Vol. I). (S. R. Saldivar, Ed.) México, Monterrey, México: AGT EDITOR S.A.
- 44 Sambrook, J., Russel, D. (2001). Molecular Cloning. A laboratory manual. E.U.A. Cold Spring Harbor Laboratory press.
- 45 Servicio Nacional de Sanidad, I. y. (2016). SENASICA. Obtenido de https://www.gob.mx/senasica/documentos/solicitud-de-permiso-de-liberacion-de-trigo-geneticamente-modificado-solicitud-016_2016
- 46 Siari, C. N. (14 de Diciembre de 2012). Métodos de transformación: Fusión de protoplastos, biobalística y microinyección. Recuperado el Diciembre de 2016, de Fisiología Vegetal: <http://fisiolvegetal.blogspot.mx/2012/12/metodos-de-transformacionfusion-de.html>
- 47 Solis, M. E. (2010). Variedades de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) para el Bajío. Folleto técnico Núm. 07.
- 48 Sustentable, O. e. (01 de Agosto de 2008). OEIDRUS. Recuperado el 08 de Septiembre de 2014, de [oeidrus: http://www.oeidrus-bc.gob.mx/sispro/trigobc/Descargas/BiotecnologiaTrigo.pdf](http://www.oeidrus-bc.gob.mx/sispro/trigobc/Descargas/BiotecnologiaTrigo.pdf)
- 49 Tagu, D., Moussard, C., (2006). Techniques for Molecular Biology. Science Publishers. United States of America. P.p. 25-37
- 50 Tamay de Dios L., I. C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Medigraphic , 70-78.
- 51 Thieman William J., Palladino Michael A. (2010). Introducción a la biotecnología. Pearson, Madrid, España.
- 52 Torre, D. d. (2011 de Febrero de 2013). Los cuidados del almacenamiento del trigo y cebada. Los cuidados del almacenamiento del trigo y cebada. Argentina.
- 53 UNED. (mayo de 2000). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Reacción en cadena

de la polimerasa (pcr) .

- 54 Unesco. (10 de Septiembre de 2014). ¿Por qué los OGM? Recuperado el 10 de Septiembre de 2014, de ¿Por qué los OGM?: <http://www.unesco.org/most/Dp1es.pdf>
- 55 Villalobos, V. M. (2008). Los transgénicos: Oportunidades y amenazas (1º Edición ed., Vol. 1º). (V. M. A., Ed.) Madrid, Madrid, España: Mundi-Prensa.