



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“Identificación de variedades modificadas genéticamente en plátano (*Musa spp.*) y productos comerciales de este, mediante la técnica de PCR”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERA EN ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**KARINA YESSELY DE JESÚS GÓMEZ**

**ASESOR: Dr. José Francisco Montiel Sosa**

**COASESOR: M. en M. Josefina Moreno Lara**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO**

**2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA **CORTAZAR FIGUEROA**  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

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

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

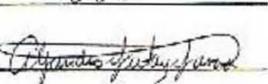
Identificación de variedades modificadas genéticamente en plátano (*Musa spp.*) y productos comerciales de este, mediante la técnica de PCR.

Que presenta la pasante: Karina Yessely De Jesús Gómez  
Con número de cuenta: 413087214 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 02 de Abril de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. Susana Patricia Miranda Castro	
SECRETARIO	I.A. Miriam Alvarez Velasco	
1er. SUPLENTE	M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza	
2do. SUPLENTE	Q.F.B: Alejandro Gutiérrez García	

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

***“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”.***

***(Albert Einstein).***

## DEDICATORIAS

A mis papás, Lydia y José, por siempre creer en mí, darme su amor y apoyo en todo momento. Me siento muy feliz y quiero agradecerles por nunca dejarme sola, por guiarme y contribuir a todas mis buenas decisiones, gracias por enseñarme a tener bondad y a ser cada día una mejor persona, por demostrarme que cuando se quiere algo se puede luchar hasta conseguirlo y por motivarme a perseguir mis sueños e ideales, no cabe duda que son mi mayor inspiración y ejemplo a seguir. Gracias por cada esfuerzo que han realizado para que salgamos adelante y por formar esta bonita familia.

A Naye, por ser mi hermana y mi mejor amiga, gracias por siempre estar cuando te necesito, por escucharme y apoyarme, por cada consejo que me has dado y cada momento que hemos compartido desde pequeñas. Estoy muy orgullosa de ti y de todo lo que estás logrando, verte crecer personal y profesionalmente es una gran satisfacción, siempre has sido un ejemplo para mí.

**GRACIAS** por nunca dejarme sola, este logro en realidad nos pertenece a los 4, es el resultado de trabajo, disciplina, esfuerzo, motivación y voluntad, y ustedes son parte fundamental de ello.

Finalmente quiero dedicarles esta tesis a mis abuelitos por darme a unos papás maravillosos; les prometí que lo lograría y a pesar de que no todos se encuentran aquí sé que desde el cielo me siguen cuidando y están muy orgullosos, los llevo en mi corazón.

**¡LOS AMO MUCHO!**

## AGRADECIMIENTOS

A la vida por permitirme llegar hasta aquí con salud y poder compartir esta etapa de mi vida al lado de las personas que más amo.

Al Dr. José Francisco Montiel Sosa por todo el apoyo para la realización de este proyecto, por la confianza y los conocimientos que me ha transmitido.

A la M. en M. Josefina Moreno Lara por ser parte importante y esencial en el desarrollo de este proyecto, por su apoyo incondicional, por su paciencia, entrega y dedicación, por compartir sus conocimientos conmigo. La estimo y admiro mucho.

A la Dra. Susana Patricia Miranda Castro por ser una excelente profesora y persona, por todo el apoyo que me ha brindado, por su tiempo y la confianza que ha puesto en mí.

A la M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza por estar al pendiente durante el desarrollo del proyecto, por apoyarme y asesorarme en todo momento, le tengo un grato cariño.

A la I.A Miriam Álvarez Velasco y al Q.F.B Alejandro Gutiérrez García por sus observaciones y consejos, por apoyarme y por el tiempo que han brindado a la revisión de esta tesis.

A la I.A Mayra Vaely Coronel Flores por guiarme y por su apoyo incondicional en el planteamiento de este proyecto, por ser una excelente profesora.

A todos los profesores que han contribuido a mi formación profesional a lo largo de mi vida académica.

A mis padrinos Ernestina y Vicente, por ser como mis segundos padres, por ver por mi bienestar, brindarme su cariño y apoyo, por estar siempre presentes en los momentos más importantes de mi vida. Los quiero y admiro mucho.

A toda mi familia por su apoyo y cariño, por creer en mí y motivarme a seguir adelante, los quiero.

A mis amigos que se han convertido en parte esencial de mi vida:

A Bibi, Cyn y Bianca por su amistad sincera desde el inicio de la carrera, por ser mis mejores amigas, por sus consejos y palabras de aliento, por todas esas sonrisas y la confianza que han puesto en mí.

A Aline por escucharme y estar cuando más lo necesitaba, por tantas risas y locuras que pasamos juntas, por todos los consejos y la motivación.

A Miztli por brindarme su amistad incondicional desde el primer día que lo conocí, por apoyarme y ser una excelente persona, por la confianza y todos los buenos momentos.

A Mayorga por ser un buen amigo, por creer en mí y enseñarme a ser fuerte, por permitirme conocerlo de manera transparente.

A Dano por su amistad incomparable y todos los momentos vividos, por estar siempre, por escucharme, cuidarme y apoyarme, por motivarme a continuar y nunca dejarme caer, por siempre tener una sonrisa para alegrar mi día.

A Saúl porque a pesar de la distancia nuestra amistad continua, por escucharme, confiar y creer en mí, por motivarme a seguir adelante ante cualquier situación, por ser un excelente amigo y persona.

**GRACIAS** a todos por hacer de esta etapa algo extraordinario, son los primeros años de una gran amistad. Los valoro y los adoro mucho.

Finalmente y de manera especial quiero agradecer a la máxima casa de estudios, la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por permitirme formar parte de ella y darme todas las herramientas necesarias en cuestión de conocimientos y valores para mi formación profesional. Es un orgullo ser egresada de esta excelente institución.

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE CUADROS.....	XII
RESUMEN.....	13
INTRODUCCIÓN .....	14
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.....	16
1.1 Generalidades del plátano .....	16
1.1.1 Definición y características del plátano .....	16
1.1.2 Taxonomía.....	17
1.1.2.1 Taxonomía de plátanos comestibles .....	17
1.1.3 Morfología .....	21
1.1.3.1 Descripción morfológica de la planta de plátano.....	21
1.1.4 Composición química y valor nutritivo del plátano.....	23
1.1.5 Variedades de plátano existentes en México .....	24
1.1.6 Producción mundial de plátano.....	25
1.1.7 Producción de plátano en México.....	26
1.1.8 Importancia del plátano en alimentos .....	28
1.1.9 Productos comerciales elaborados a base de plátano.....	29
1.1.10 Plagas y enfermedades en plátano .....	31
1.2 Biotecnología e ingeniería genética .....	37
1.2.1 Importancia de la biotecnología en los alimentos.....	38
1.2.2 Organismos Genéticamente Modificados .....	39
1.2.2.1 Ingeniería genética: ADN Recombinante.....	40
1.2.2.2 Cultivos genéticamente modificados.....	46
1.2.2.3 Promotores.....	48
1.2.2.4 Plátano genéticamente modificado.....	50
1.2.3 Regulaciones de Organismos Genéticamente Modificados.....	52
1.2.3.1 Regulaciones Internacionales .....	52
1.2.3.2 Regulaciones en México.....	53
1.2.4 Debate sobre los alimentos genéticamente modificados .....	56
1.2.5 Técnicas de análisis basadas en la detección de ADN.....	59

1.2.6	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	60
1.2.6.1	Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	60
1.2.6.2	Etapas de la PCR .....	61
1.2.6.3	Componentes de la PCR .....	62
1.2.6.4	Aplicaciones de la PCR .....	63
1.2.6.5	Ventajas y desventajas de la PCR.....	65
1.2.6.6	Análisis del producto de una PCR .....	65
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....		67
2.1	Cuadro metodológico .....	67
2.1.1	Descripción del cuadro metodológico .....	68
2.2	Materiales y métodos .....	70
2.2.1	Material Biológico .....	70
2.2.2	Diseño de primers .....	71
2.2.3	Extracción de ADN.....	72
2.2.4	Cuantificación de la concentración y pureza del ADN.....	75
2.2.5	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	76
2.2.6	Electroforesis en gel de agarosa.....	81
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		83
3.1	Objetivo particular 1 .....	83
3.2	Objetivo particular 2 .....	90
3.3	Objetivo particular 3 .....	92
3.4	Objetivo particular 4 .....	93
3.5	Objetivo particular 5 .....	96
CONCLUSIONES .....		109
GLOSARIO .....		112
REFERENCIAS.....		116
ANEXOS .....		126

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de plátano.....	16
Figura 2. Esquema de una planta típica de plátano.....	21
Figura 3. Producción mundial del plátano 2000-2014 (Miles de toneladas). ....	26
Figura 4. Volumen de la producción en México 2006-2015 (Miles de toneladas).....	26
Figura 5. Plantas de plátano afectadas por <i>Cosmopolites sordidus</i> .....	32
Figura 6. (a) Adulto de picudo amarillo (b) Adulto de picudo rayado.....	33
Figura 7. Cultivo de plátano severamente afectado por el nematodo <i>R. similis</i> .....	34
Figura 8. Estados de avance de la sintomatología ocasionada por la Sigatoka negra.....	35
Figura 9. Quemazón de hojas, síntoma avanzado de mal de Panamá.....	37
Figura 10. Plásmido Ti de <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> .....	42
Figura 11. Mecanismo molecular de transferencia de genes a través de <i>Agrobacterium</i> .....	43
Figura 12. Transferencia de ADN mediada por microinyección. ....	44
Figura 13. Método de electroporación. ....	45
Figura 14. Bombardeo de microproyectiles de un tejido vegetal.....	46
Figura 15. Representación esquemática de las secuencias de un promotor. ....	48
Figura 16. % Permisos de liberación por cultivo (2005-2015). ....	56
Figura 17. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa. ....	61
Figura 18. Material necesario para electroforesis en gel de agarosa.....	66
Figura 19. Esquema representativo de las fases formadas en la extracción de ADN al utilizar éter saturado con agua y NaCl 50 M.....	74
Figura 20. Programa de PCR para la detección de plátano.....	78
Figura 21. Programa de PCR directa para el promotor <i>Arabidopsis</i> .....	80
Figura 22. Programa de PCR directa para los promotores CaMV y T-NOS. ....	80
Figura 23. Gel de agarosa al 2.5% a 60 V para la amplificación de una muestra de plátano fresco (T <sub>1</sub> ) utilizando primers de plátano .....	83
Figura 24. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la amplificación de 3 muestras de plátano fresco (M <sub>1</sub> , Mo <sub>1</sub> y D <sub>1</sub> ) utilizando primers de plátano .....	85
Figura 25. Gel de agarosa al 2.5% a 60 V para la amplificación de 2 muestras de plátano fresco (M <sub>1.1</sub> y M <sub>1.2</sub> ) utilizando primers de plátano.....	86
Figura 26. Gel de agarosa al 2.5% a 60 V para la amplificación de 4 muestras de plátano fresco (M <sub>2</sub> , Mo <sub>2</sub> , D <sub>2</sub> y T <sub>2</sub> ) utilizando primers de plátano.....	87
Figura 27. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la amplificación de 4 muestras de plátano fresco (M <sub>3</sub> , Mo <sub>3</sub> , D <sub>3</sub> y T <sub>3</sub> ) utilizando primers de plátano.....	88

Figura 28. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la amplificación de 3 muestras de plátano fresco (M <sub>3.1</sub> , M <sub>3.2</sub> y T <sub>3.1</sub> ) utilizando primers de plátano .....	88
Figura 29. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la amplificación de planta de <i>Arabidopsis</i> utilizando primers del promotor <i>Arabidopsis</i> .....	89
Figura 30. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la prueba de especificidad de primers de plátano. ....	91
Figura 31. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la prueba de especificidad de primers de CaMV y T-NOS.....	93
Figura 32. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección de plátano en muestras de ADN de P <sub>1</sub> a P <sub>7</sub> .....	95
Figura 33. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección de plátano en muestras de ADN de P <sub>8</sub> a P <sub>12</sub> .....	96
Figura 34. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del promotor CaMV en 7 muestras de plátano fresco (T <sub>1</sub> , M <sub>1</sub> , M <sub>O1</sub> , D <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> , M <sub>2</sub> y M <sub>O2</sub> ).....	97
Figura 35. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del promotor CaMV en 5 muestras de plátano fresco (D <sub>2</sub> , T <sub>3</sub> , M <sub>3</sub> , M <sub>O3</sub> y D <sub>3</sub> ).....	98
Figura 36. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del promotor CaMV en productos comerciales que contienen plátano (P <sub>1</sub> a P <sub>7</sub> ).....	99
Figura 37. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del promotor CaMV en productos comerciales que contienen plátano (P <sub>8</sub> a P <sub>12</sub> ).....	100
Figura 38. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del terminador T-NOS en 6 muestras de plátano fresco (T <sub>1</sub> , M <sub>1</sub> , M <sub>O1</sub> , D <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> y M <sub>2</sub> ).....	101
Figura 39. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del terminador T-NOS en 6 muestras de plátano fresco (M <sub>O2</sub> , D <sub>2</sub> , T <sub>3</sub> , M <sub>3</sub> , M <sub>O3</sub> y D <sub>3</sub> ) .....	101
Figura 40. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del terminador T-NOS en productos comerciales que contienen plátano (P <sub>1</sub> a P <sub>6</sub> ).....	102
Figura 41. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del terminador T-NOS en productos comerciales que contienen plátano (P <sub>7</sub> a P <sub>12</sub> ).....	103
Figura 42. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del promotor <i>Arabidopsis</i> en 6 muestras de plátano fresco (T <sub>1</sub> , M <sub>1</sub> , M <sub>O1</sub> , D <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> y M <sub>2</sub> ).....	104
Figura 43. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del promotor <i>Arabidopsis</i> en 6 muestras de plátano fresco (M <sub>O2</sub> , D <sub>2</sub> , T <sub>3</sub> , M <sub>3</sub> , M <sub>O3</sub> y D <sub>3</sub> ) .....	105
Figura 44. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del promotor <i>Arabidopsis</i> en productos comerciales que contienen plátano (P <sub>1</sub> a P <sub>5</sub> ) .....	106

Figura 45. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del promotor *Arabidopsis* en productos comerciales que contienen plátano (P<sub>6</sub> a P<sub>12</sub>) ..... 107

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Posición del género <i>Musa</i> entre las monocotiledóneas. ....	17
Cuadro 2. Características de los híbridos desarrollados por la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. ....	20
Cuadro 3. Composición química del plátano fresco por cada 100 g de porción comestible.....	23
Cuadro 4. Clones de musáceas cultivadas en México.....	25
Cuadro 5. Principales entidades productoras en México. ....	27
Cuadro 6. Producción mensual en México (%). ....	28
Cuadro 7. Métodos de transformación del ADN. ....	41
Cuadro 8. Promotores constitutivos. ....	50
Cuadro 9. Permisos de liberación por cultivo .....	56
Cuadro 10. Muestras de variedades de plátano fresco. ....	70
Cuadro 11. Muestras de productos comerciales que contienen plátano.....	71
Cuadro 12. Primers de plátano.....	77
Cuadro 13. Componentes para preparar la reacción de PCR. ....	77
Cuadro 14. Primers de los promotores CaMV y T-NOS. ....	78
Cuadro 15. Primers de promotor de <i>Arabidopsis</i> .....	79
Cuadro 16. Componentes para preparar la reacción de PCR directa. ....	79
Cuadro 17. Concentración y pureza de muestras de ADN de plátano fresco. ....	84
Cuadro 18. Concentración y pureza de muestras de ADN para especificidad de primers de plátano.....	90
Cuadro 19. Concentración y pureza de muestras de ADN para control positivo y especificidad de primers de CaMV y T-NOS.....	92
Cuadro 20. Concentración y pureza de muestras de ADN de productos comerciales que contienen plátano. ....	94
Cuadro 21. Resumen de resultados de la detección de OGM en plátano fresco.....	107
Cuadro 22. Resumen de resultados de la detección de OGM en productos comerciales que contienen plátano. ....	108

## RESUMEN

El plátano es uno de los cultivos alimenticios más importantes del mundo y es ampliamente consumido por personas de todos los grupos de edad, sin embargo, es vulnerable a factores de estrés biótico y abiótico que limitan su producción. La introducción de características apropiadas mediante ingeniería genética para la resistencia biótica y tolerancia abiótica a las plantas de plátano puede reducir las pérdidas que se producen debido a plagas y enfermedades, así mismo, se puede mejorar la calidad nutritiva, contribuyendo a una mayor seguridad alimentaria.

El objetivo principal de este trabajo fue aplicar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers de los promotores CaMV y *Arabidopsis*, y del terminador T-NOS para detectar plátano modificado genéticamente.

Se analizaron 12 muestras de plátano fresco de distinta procedencia y 12 muestras de productos comerciales que contienen plátano en su composición. Por medio de programas bioinformáticos se diseñaron primers específicos de plátano y del promotor *Arabidopsis* y se seleccionaron bibliográficamente los primers para detectar CaMV y T-NOS. La extracción de ADN de las muestras se llevó a cabo empleando el protocolo clásico de Sambrook y el método de Cheng con modificaciones experimentales. Se realizó PCR para la identificación de plátano en las muestras y para detectar organismos genéticamente modificados. Los resultados de la PCR fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa y visualizados en el trasluminador de luz ultravioleta.

Los resultados obtenidos confirman la presencia de organismos genéticamente modificados en algunas muestras de plátano fresco y productos comerciales, de las cuales, ninguna declara la presencia de material transgénico en su etiqueta.

## INTRODUCCIÓN

El plátano es uno de los cultivos más importantes en el mundo por constituir el alimento básico de millones de personas y una importante fuente de ingresos para los países productores. Ocupa el segundo lugar de la producción en frutas tropicales, porque es básico en la alimentación, su precio bajo, sabor agradable, combinaciones múltiples en la preparación de alimentos, genera sensación de saciedad, su valor nutritivo es alto y aporta potasio, hierro y vitamina K (COVECA, 2010). En México, en el 2013, la superficie sembrada dedicada a este cultivo alcanzó 75 mil hectáreas, con una producción de 2.1 millones de toneladas (FND, 2014).

Se han logrado avances significativos en la biotecnología del plátano, esto incluye el desarrollo de la metodología para la producción de plantas transgénicas, la clonación y caracterización de los genes asociados con el desarrollo y maduración del fruto; a pesar de ello, los informes sobre los plátanos transgénicos con características agronómicas mejoradas han sido limitados. Los investigadores también están examinando métodos que podrían aumentar el contenido proteico. El mejoramiento genético en el plátano tiene por objetivo el desarrollo de híbridos resistentes a las principales plagas y enfermedades. También se intenta que las variedades mejoradas tengan la habilidad de prosperar bajo condiciones de crecimiento adversas, buen desempeño agronómico, pureza, viabilidad y sanidad. De esta forma se reduce la dependencia del cultivo a los fertilizantes y se contribuye al desarrollo sostenible de la producción y productividad (McKeon, 2003).

En general, la gravedad y la aparición de brotes de plagas y daños a las plantas dependen de varios factores atenuantes como lo son: las condiciones ambientales y la variedad de plátano (Nelson, 2006). En los últimos años la producción mundial de plátano se ha visto afectada por numerosas enfermedades tales como la Sigatoka negra y amarilla (causadas por *Mycosphaerella spp.*) y el Mal de Panamá causada por el hongo *Fusarium oxysporum f.sp.cubense* (Nain et.al, 2002), las cuales provocan grandes pérdidas en la producción y ameritan el uso de diversos tipos de funguicidas e insecticidas, perjudiciales para el ambiente y relativamente costosos (Valerio y De García, 2008). Ante epidemias como la enfermedad de la Sigatoka negra, se propone ahora como solución la ingeniería genética (Bash, 2015).

La investigación está enfocada específicamente a la detección de plátano modificado genéticamente en variedades de plátano fresco y en productos que lo contienen, empleando uno de los métodos más sensibles utilizados actualmente: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dicho método permite la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de nucleótidos por medio de iniciadores. En el caso de las plantas transgénicas, se utilizan iniciadores que detecten las secuencias utilizadas para la inserción del transgen en el genoma de la planta. Tal es el caso del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S CaMV), el terminador de la nopalina sintetasa (T-NOS) y la octopina sintetasa (OCS) (Magaña et.al, 2003).

En los países europeos, Japón y Nueva Zelanda, el etiquetado de productos derivados de organismos genéticamente modificados (OGM), es obligatorio cuando contiene más de 1 % de material modificado. Aunque en México y otros países no hay obligatoriedad de etiquetado de transgénicos, la comercialización internacional exige rastreabilidad de los productos que se importan o exportan (Magaña et.al, 2003), así mismo, el etiquetado de los productos es prescindible ya que cada persona tiene derecho a elegir que consume.

Debido a que el plátano es uno de los frutos más consumidos en México por la mayoría de la población, es importante conocer si aquellos que son distribuidos dentro del país han sido modificados genéticamente, de igual manera, es de gran relevancia el encontrar metodologías que permitan detectar organismos genéticamente modificados en productos comerciales que contengan plátano; por lo que este trabajo puede servir posteriormente para la realización de otras investigaciones.

## CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Generalidades del plátano

#### 1.1.1 Definición y características del plátano

Los plátanos (*Musa spp.*) son frutos provenientes de plantas monocotiledóneas perennes que crecen bien en regiones tropicales y subtropicales húmedas (Pillay et.al, 2007). Perrier et.al. (2011) sugieren que “los plátanos fueron domesticados hace al menos 4000 años en el sur de Asia y Melanesia”. En México inició su cultivo comercial en el Siglo XIX. La palabra plátano proviene del griego *πλατανος* (*platanos*), y del latín *platanus*. La raíz *πλατος* (*platos* = plano, ancho) se refiere a la que sus hojas son anchas y planas (Figura 1). La palabra banana proviene del árabe *ب نانة* (*banānah*), que significa dedos. En muchos lugares a un racimo de plátanos se le llama una *mano*, y en árabe se le dice *dedo* a cada uno de sus plátanos (SIAP, 2012).



Fuente: SIAP, 2012.

**Figura 1. Planta de plátano.**

En México el término plátano se usa tanto para los bananos como para los plátanos, pero en otros países se hace una distinción en base a la manera de consumirlo; los bananos son los que se consumen como fruta fresca y los plátanos son los que se consumen cocinados, por tener más harina (Ramírez et.al, 2011). Actualmente el plátano es considerado uno de los cultivos más importantes en el mundo, junto con el arroz y el trigo. Son consumidos extensivamente en los trópicos, donde se cultivan y en las zonas templadas es apreciado por su sabor, gran valor nutritivo y por la disponibilidad durante todo el año. Tan solo en el Centro y Oeste de África constituye la fuente principal de alimentación de 270 millones de personas (INIFAP, 2005).

### 1.1.2 Taxonomía

En el Cuadro 1 se muestra que el plátano pertenece a la familia de las *musáceas* y al género *musa*, el cual es de gran importancia ya que sus especies llevan inflorescencias más o menos arqueadas hacia el suelo: horizontales, subhorizontales, en sentido oblicuo o verticalmente; sus frutos dispuestos “en manos” son numerosos y están dispuestos en dos filas. Estos plátanos silvestres no han sido de gran utilidad, pero son interesantes para los estudios taxonómicos y genéticos (Champion, 1978).

**Cuadro 1. Posición del género *Musa* entre las monocotiledóneas.**

Orden	Familias	Subfamilias	Géneros
<b>ESCITAMÍNEAS</b>	<b>Musáceas</b>	<b>Musoideae</b>	<b>Musa</b>
			<i>Enseto</i>
		<b>Strelitzoideae</b>	<i>Ravenala</i>
			<i>Phenacospermum</i>
			<i>Strelitzia</i>
		<b>Heliconoideae</b>	<i>Heliconia</i>
	<b>Lowiáceas</b>		<i>Orchidantha</i>
	<i>Cingiberáceas</i>		
	<i>Amarantáceas</i>		
	<i>Cannáceas</i>		

Fuente: Champion, 1978.

#### 1.1.2.1 Taxonomía de plátanos comestibles

Las dos especies dentro del género *Musa* más importantes son *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, las cuales han contribuido a la aparición de los plátanos de frutos sin pepita y comestibles, debido a diversos procesos genéticos. De acuerdo a su nivel de ploidía, los cultivares sólo pueden ser diploides, triploides o tetraploides.

Del total de 200-300 clones que se cree que existen más de la mitad son triploides, y la mayoría restante son diploides, siendo escasos los cultivares tetraploides (Robinson y Galán, 2012). Simmonds (1973) afirma que “se pueden distinguir cultivares triploides, derivados del cruce entre *Musa Acuminata* (AA) y *Musa Balbisiana* (BB) que dan origen a las musáceas comestibles más importantes”.

### Diploides

#### **Grupo genómico AA**

Comprende todas las variedades que tienen dos juegos de cromosomas heredados de *Musa acuminata*. Cultivares AA a menudo se llaman diploides comestibles para distinguirlos de las especies silvestres, que también son diploides. Sus frutos son generalmente muy dulce. La mayoría de los cultivares de este grupo no han sido clasificados en subgrupos (ProMUSA, 2016).

#### **Grupo genómico AB**

Este grupo incluye todos los cultivares que tienen dos juegos de cromosomas, uno donado por *Musa acuminata* y el otro por *Musa balbisiana* (ProMUSA, 2016).

### Triploides

#### **Grupo genómico AAA**

Incluye todos los cultivares que tienen tres juegos de cromosomas heredados de *Musa Acuminata* (ProMUSA, 2016). Incompatibilidad cromosómica entre las diferentes subespecies implicadas se cree que han dado lugar a la aparición de los cultivares triploides (Perrier et.al, 2011). El grupo genómico AAA, es el grupo que más se cultiva de plátanos comestibles, el cual incluye plátanos Cavendish y Gros Michel.

Cabe destacar, que no todos los plátanos de este grupo son tipos de postres dulces, todo va depender de la región en la que se encuentren, por ejemplo, en algunas regiones como antiplanos de África Oriental, son tipos de cocción (ProMUSA, 2016).

#### ***Subgrupo Cavendish***

Es el que más se cultiva, ya que incluye las variedades que dominan el comercio internacional del banano (por ejemplo, Gran Enano, Williams y Valery). Pertenece al subgrupo del genoma AAA; los plátanos triploides se deriva de un cruce entre dos diploides ( $2n$  los padres), uno que normalmente transmite una copia ( $n$ ) de su genoma diploide, mientras que el otro contribuyeron ambas copias ( $2n$ ), un fenómeno conocido como la restitución meiótica (Hippolyte et.al, 2012).

#### ***Subgrupo Gros Michel***

Subgrupo el cual dominó el comercio internacional durante la primera parte del siglo XX. A finales de 1950 fue sustituido por cultivares Cavendish debido a su susceptibilidad

al marchitamiento por *Fusarium*, el cual fue reportado por primera vez de estar en Centroamérica en la década de 1890. Se compone esencialmente de cultivares que divergieron entre sí a través de diversas mutaciones (ProMUSA, 2016).

### **Grupo genómico AAB**

Este grupo comprende todas las variedades que tienen dos juegos de cromosomas donados por *Musa acuminata* y uno por *Musa balbisiana*. Entre sus subgrupos se encuentran: Iholena, Maoli-Popoulu, Mysore, Plantain y Pome, siendo los más importantes el Plantain y el Iholena (ProMUSA, 2016).

#### ***Subgrupo Plantain***

Este subgrupo comprende aproximadamente más de 100 cultivares. El genoma de los cultivares de plátano AAB, denota que tienen tres juegos de cromosomas y que son híbridos de *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* en una proporción de aproximadamente dos a uno (ProMUSA, 2016).

#### ***Subgrupo Iholena***

El subgrupo fue domesticado en la región del Pacífico y lleva el nombre hawaiano de su variedad más representativa. El nombre se refiere al color de la pulpa del fruto, es decir, la *Iho* significa núcleo o corazón y *lena* significa amarillo o amarillo-naranja (Kepler y Rust, 2011). Debido al color del fruto se puede decir que tiene un alto contenido en carotenoides pro-vitamina A (ProMUSA, 2016).

### **Grupo genómico ABB**

Grupo que comprende todas las variedades que tienen un juego de cromosomas donados por *Musa acuminata* y dos por *Musa balbisiana* (ProMUSA, 2016).

#### **Tetraploides**

En 1959 la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) inició el programa de mejoramiento genético de musáceas con la United Fruit Company (FHIA, 2017). El Programa se concentró en el desarrollo de diploides mejorados con características agronómicas adecuadas de producción y resistencia a las enfermedades, así como a obtener híbridos tetraploides a partir de cruzamientos (Cuadro 2). Estos híbridos actualmente se cultivan en algunos países (FHIA, 2017).

### Grupo AAAA

Se han obtenido plantas tetraploides de *M. acuminata* por medio del cruzamiento entre donantes de polen diploides AA y plantas madre triploides AAA que no son totalmente partenocárpicas ni estériles, sino capaces de producir una o dos semillas por racimo (Robinson y Galán, 2012).

### Grupos AB BB, AAAB y AAB B

La mayoría de los tetraploides han sido obtenidos en diferentes programas de mejora, confiriéndoles diversas características (Robinson y Galán, 2012).

**Cuadro 2. Características de los híbridos desarrollados por la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola.**

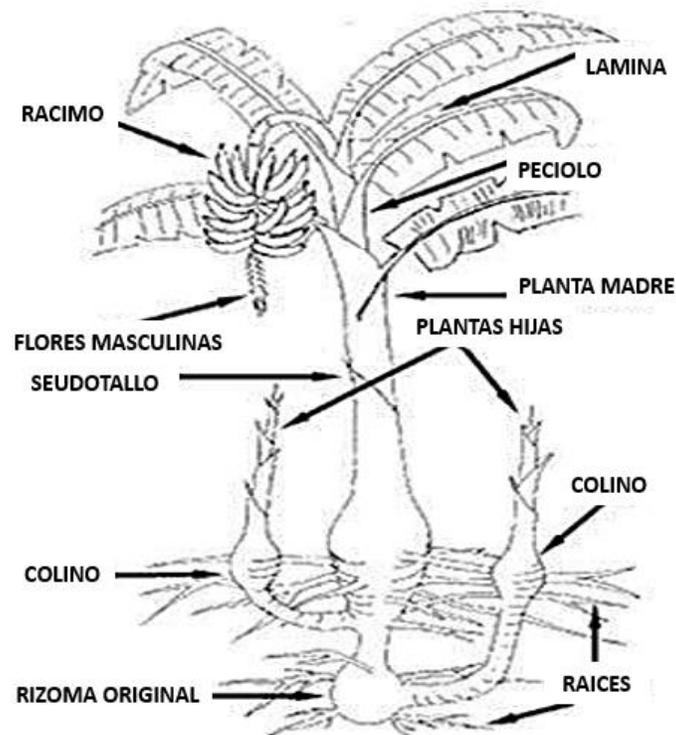
Híbrido	Genealogía	Características
FHIA- 01 (AAAB)	Prata Anã (AAB) × SH-3142 (AA)	Resistencia a la Sigatoka negra, marchitez de <i>Fusarium</i> y nematodos, y condiciones desfavorables temperatura.
FHIA-02 (AAAA)	Williams (AAA) × SH-3393 (AA)	Alta resistencia a la Sigatoka negra, presentan la misma altura de planta de “Valery”, con racimos pequeños.
FHIA-03 (AABB)	SH-3386 (ABB) × diploide SH-3320 (AA)	Presenta baja estatura, racimos que alcanzan los 50 kg y resistencia a la enfermedad del moko y a la sequía.
FHIA-15 (AAAB)	Descendiente del híbrido Maqueño Highgate (AAA) (mutante de Gros Michel), Prata Anã híbrido (AAB)	Resistencia a la raza 1 del <i>Fusarium</i> , presenta tolerancia a la Sigatoka negra. Buenas características del racimo y del fruto.
FHIA-17 (AAAA)		
FHIA-18 (AAAB)		
FHIA-21 (AAAB)	Híbrido de plátano francés (AAB)	Resistencia a la Sigatoka negra y producir racimos más grandes que los otros cultivares.
FHIA-23 (AAAA)	Híbrido Highgate (AAA)(mutante de Gros Michel)	Buenas características del racimo. Resistencia a la raza 1 de marchitez de <i>Fusarium</i> y tolerante a la Sigatoka negra.
AVP-67 (AAAB)	Cruces de plátano tipo francés (AAB) y Maqueño (ABB)	Resistente a la raza 1 la enfermedad de Panamá y tiene tolerancia a la Sigatoka negra.
SH-3640	Prata Anã (AAB) × SH-3393	Alta producción y resistencia a la Sigatoka negra.

Fuente: Mohandas y Ravishankar, 2016.

### 1.1.3 Morfología

Los plátanos son grandes plantas herbáceas que pueden conferir el aspecto de un árbol. La mayoría de los tipos comerciales crecen entre 2 y 5 metros. Hay dos fases principales visibles en el desarrollo de la planta de banano: una fase vegetativa que se caracteriza por la aparición de las hojas, y una fase reproductiva durante el cual emerge la inflorescencia (Turner et al, 2007).

La planta de plátano consiste de manera general, de uno o más falsos tallos (las partes erectas que se asemejan a troncos), un rizoma subterráneo y un sistema de raíces fibrosas (Figura 2) (Crane y Balerdi, 2015).



Fuente: Crane y Balerdi, 2015.

*Figura 2. Esquema de una planta típica de plátano.*

#### 1.1.3.1 Descripción morfológica de la planta de plátano

La planta de plátano está compuesta de la siguiente manera:

##### **Sistema radicular**

El sistema radicular se encarga de absorber y conducir el agua, y de transferir los nutrientes del suelo hacia la planta (ProMUSA, 2017a).

### **Rizoma**

El rizoma es un tallo subterráneo con numerosos puntos de crecimiento (meristemas) a partir de los cuales surgen los falsos tallos, las raíces y los tallitos donde surgirán las flores y frutos (Crane y Balerdi, 2015).

### **Seudotallo**

La parte de la planta que se asemeja a un tronco es, en realidad, un falso tallo denominadoseudotallo, y está formado por un conjunto apretado de vainas foliares superpuestas. Es muy carnoso, bastante fuerte y está formado principalmente por agua. (ProMUSA, 2017a).

### **Raíces**

Las raíces principales, emergen de la superficie externa del cilindro central, son gruesas y carnosas y se ramifican lateralmente en raíces de cabellera que posee pelos radiculares. La mayoría de las mismas exploran el suelo en una profundidad de 20-30cm y en un radio de 2-3m bajo la mayor parte de las condiciones de suelos (Galan, 1992).

### **Hojas**

Las hojas del plátano están formadas por una estructura tubular llamada vaina, un pecíolo grueso y un limbo o lámina (Crane y Balerdi, 2015). La hoja es el principal órgano fotosintético de la planta (ProMUSA, 2017a), está formada por el meristemo apical en el rizoma y emerge desde el centro delseudotallo como un cilindro laminado, la también llamada hoja de cigarro. El tiempo necesario para desplegar varía, si se tiene condiciones climáticas favorables, se tarda aproximadamente siete días, pero puede tomar hasta 15 a 20 días en condiciones muy pobres (ProMUSA, 2017b).

### **Inflorescencia**

Las inflorescencias emergen del centro de los falsos tallos a los 10-15 meses de haberse sembrado; en este momento, de 26 a 32 hojas deben haber surgido. Las flores se disponen en forma de espiral a lo largo del eje de la inflorescencia en grupos de 10 a 20 y están cubiertas por brácteas (hojas modificadas) carnosas de color púrpura verdoso. Las brácteas se caen a medida que el desarrollo de las flores progresa. Las primeras flores que emergen son femeninas. En variedades comestibles, los ovarios crecen rápidamente sin polinización

y se transforman en grupos de frutos llamados “manos”. A pesar de que la mayoría de las variedades producen frutos sin semillas, algunas son fértiles y producen semillas. La parte masculina de la inflorescencia y/o las flores masculinas pueden estar ausentes o reducidas grandemente (Crane y Balerdi, 2015).

## Frutos

Los plátanos son polimórficos, pudiendo contener de 5-20 manos, cada una con 2-20 frutos; siendo de color amarillo verdoso, amarillo, amarillo-rojizo o rojo. El tamaño del fruto empieza a incrementarse a partir del momento en que se levanta la bráctea y alcanza su máximo valor, tanto en longitudes externa (32.5cm) como interna (25cm) y perímetro (17.3cm), entre los 4 y 4.5 meses de iniciado el proceso (Rimache, 2008).

### 1.1.4 Composición química y valor nutritivo del plátano

En el Cuadro 3 se muestra la composición química del plátano fresco:

*Cuadro 3. Composición química del plátano fresco por cada 100 g de porción comestible.*

Componente	Contenido en gramos (g)
Agua	75.1
Proteínas	1.2
Lípidos	0.3
Hidratos de carbono	20
Fibra	3.4
Minerales	0.4

Fuente: Moreiras et.al, 2013.

El agua, es el componente químico de mayor abundancia. Al ir madurando el plátano, el peso de la pulpa se incrementa debido a un aumento en la cantidad de agua. Este aumento se debe en mayor grado al flujo de líquido de la cáscara a la pulpa por diferencia de presión osmótica y en menor grado a la formación química como producto de la oxidación de los hidratos de carbono (Mondragón, 2001). En el plátano inmaduro el hidrato de carbono mayoritario es el almidón (MAPAMA, 2013), compuesto en mayor grado por amilopectina; también se tienen en menor proporción sacarosa y fructosa. A medida que el plátano madura, el almidón se hidroliza y como producto final se tiene glucosa (Mondragón, 2001). Es una fruta suave y bastante digerible siempre que esté maduro (MAPAMA, 2013), ambos

factores se deben a la presencia de azúcares simples. La pectina es otro componente del tejido de la fruta. Cuando está verde, se encuentra en forma de protopectina, que con el proceso de maduración se convierte en pectina y finalmente en ácido péctico. Los pigmentos presentes son la clorofila, xantofilas y carotenos, flavonas y antocianinas (Mondragón, 2001). Las proteínas y los lípidos se encuentran en menor proporción, la proteína del plátano está compuesta de albúmina, globulina, glutelina, prolamina y enzimas como proteasas, catalasa, invertasa y amilasa, mientras que los lípidos están compuestos por una mezcla de ácidos, entre ellos, el palmítico, el oleico, el linoleico y el linolénico (Mondragón, 2001).

Tiene un elevado valor energético (1.1-2.7kcal/100g), siendo una importante fuente de vitaminas (Rimache, 2008), encontrándose en mayor proporción el ácido ascórbico y en pequeñas cantidades la tiamina, riboflavina, niacina, vitamina E y el ácido pantoténico (Mondragón, 2001). También cuenta con numerosas sales minerales, entre ellas las de hierro, fósforo, potasio y calcio (Rimache, 2008).

### **1.1.5 Variedades de plátano existentes en México**

En el Cuadro 4 se pueden observar los principales clones de plátano que se cultivan en México, sus sinonimias, así como el grupo y subgrupo al que pertenecen. Las variedades de plátano macho, dominico, tabasco y morado han contribuido como material biológico en este trabajo, según Mondragón (2001) algunas características con las que se pueden identificar son:

**Macho:** Es el plátano de tamaño más grande, suele consumirse cocido, cuando se encuentra de color negro.

**Dominico:** Suele medir de 6 a 8 cm aproximadamente. Es el más dulce de los plátanos que puede ser consumido como postre.

**Tabasco:** Es el plátano típico de cáscara y pulpa de color amarillo. Adquirió su nombre debido al lugar en donde se cultiva en México. Mide de 15 a 30 cm.

**Morado:** Su nombre se debe al color de su cáscara. El color de su pulpa es rosa y el sabor es similar al plátano tabasco. Puede consumirse como postre o cocido.

*Cuadro 4. Clones de musáceas cultivadas en México.*

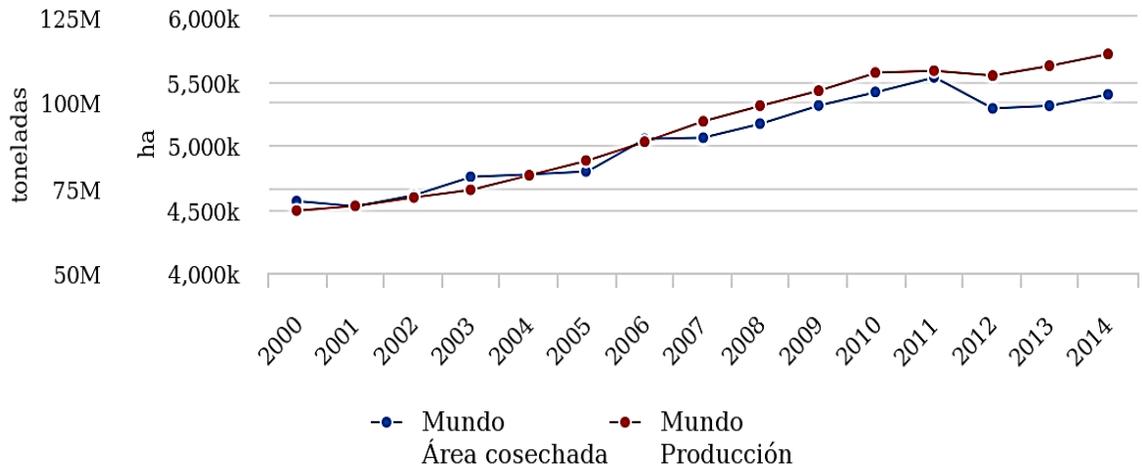
<b>Clon</b>	<b>Sinonimias</b>	<b>Grupo</b>	<b>Subgrupo</b>
Enano gigante	Gran Enano, Pineo Gigante, Giant Cavendish	AAA	Cavendish
Manzano	Piña, Silo Fig	AAB	-
Pera o cuadrado	Pera, Cuadrado, Cuatro Filos, Cachaco, Topocho Verde, Bluggoe	ABB	-
<b>Macho</b>	<b>Bellaco, Criollo, Harton, Tipo Horn Plantain</b>	<b>AAB</b>	<b>Plantain</b>
Datil o ciento en boca	Datil, Dominicó, Bocadillo, Sucrier	AA	-
Rombon	Rambao	AA	Cavendish
<b>Roatan</b>	<b>Tabasco, Cuyaco, Gros Michel</b>	<b>AAA</b>	-
Enano Chaparro	Enano Mil, Enano, Pigmeo, Pineo Enano, Dwarf Cavendish	AAA	Cavendish
Valery	Robusta	AAA	Cavendish
<b>Morado</b>	<b>Tafetán, Red</b>	<b>AAA</b>	-
Morado Verde	Norteño, Indio, Guayabo, Injerto, Green Red	AAA	-
<b>Dominico</b>	<b>Hembra, Marqueño, Tipo French Plantain</b>	<b>AAB</b>	<b>Plantain</b>
Seda	Maritu, Tornasol o Rosa de Oro	AAB	-

(-) Sin subgrupo.

Fuente: INIFAP, 2005.

### 1.1.6 Producción mundial de plátano

Según la FAOSTAT (2017) del año 2000 al 2011 la producción mundial de plátano aumento de manera considerable, pasando de 68, 225,889 toneladas a 109, 195,060 toneladas anuales. En el año 2012 debido a problemas climatológicos que enfrentaron algunos importantes países productores, como son Ecuador y la India, la producción mundial se redujo a 107,796,724 toneladas. Para el año 2013 y 2014 volvió a existir un incremento, alcanzando las 114, 113,151 toneladas anuales (Figura 3).



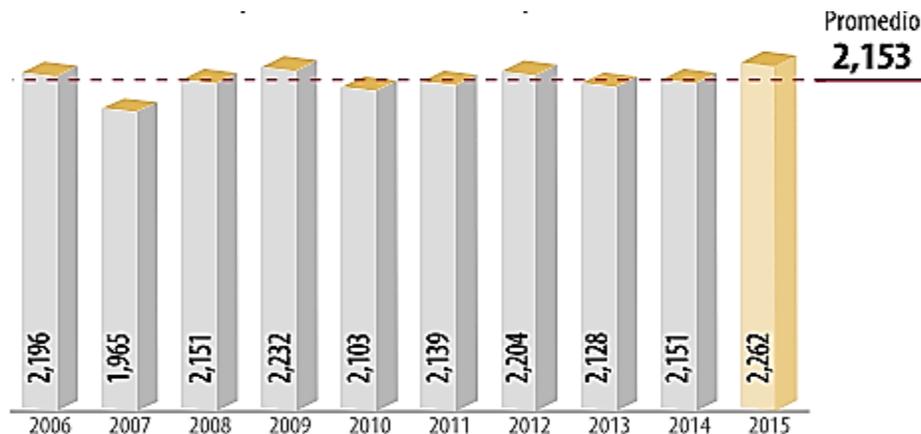
Fuente: FAOSTAT, 2017.

**Figura 3. Producción mundial del plátano 2000-2014 (Miles de toneladas).**

En el 2016 existió una producción mundial de 107.4 millones de toneladas, de las cuales los plantíos de India aportan una cuarta parte, colocándolo en el 1er país productor de plátano a nivel mundial, seguido de China y Filipinas.

### 1.1.7 Producción de plátano en México

En los platanales mexicanos se obtiene un volumen que contribuye con el 2% del total mundial del fruto, siendo el 12° productor con 2, 127,772 toneladas. La producción de plátano en México creció 270 mil toneladas de 2013 a 2016, lo que representa un incremento de 12.9 por ciento en cuatro años (Figura 4) (SIAP, 2016).



Fuente: SIAP, 2016.

**Figura 4. Volumen de la producción en México 2006-2015 (Miles de toneladas).**

Su producción se localiza en el sur del país, aunque se cultiva en 16 entidades federativas. Chiapas, Tabasco y Veracruz aportan en conjunto 72% del volumen total del cosechado. El consumo anual per cápita de este fruto es de 15.1kg. En el Cuadro 5 se muestran las 10 principales entidades productoras (SIAP, 2016).

*Cuadro 5. Principales entidades productoras en México.*

Rank	Entidad Federativa	Volumen (toneladas)
	<b>Total nacional</b>	<b>2,262,028</b>
1	Chiapas	708,701
2	Tabasco	600,290
3	Veracruz	318,726
4	Colima	179,820
5	Jalisco	135,817
6	Michoacán	121,297
7	Oaxaca	64,390
8	Guerrero	58,741
9	Nayarit	35,965
10	Puebla	27,558
	Resto	10,724

Fuente: SIAP, 2016.

Entre las variedades existentes en el país destacan el enano gigante (63% del volumen total) y macho (16%). Otras variedades cultivadas son el Tabasco, Criollo, Dominicó, Valery, Pera, Manzano y Morado. El plátano se encuentra disponible los doce meses del año y tiene una distribución más o menos homogénea (Cuadro 6); sin embargo, el precio tiende a aumentar a principios de año, ya que se presenta el menor porcentaje de producción (FND, 2014). Las exportaciones de plátano mexicano siguen en ascenso; en 2015 el volumen de exportación fue de casi 441 mil toneladas con un valor de 181.2 millones de dólares.

Los principales importadores del fruto nacional son Estados Unidos, España y Holanda; el primero de ellos adquirió 334 mil toneladas. China, Argentina y Ucrania son los mayores importadores y pudieran ser compradores potenciales de México (SIAP, 2016).

**Cuadro 6. Producción mensual en México (%).**

Mes	Producción mensual nacional (%)
Enero	7.0
Febrero	6.8
Marzo	7.7
Abril	8.1
Mayo	9.5
Junio	9.1
Julio	8.4
Agosto	10.1
Septiembre	7.8
Octubre	8.5
Noviembre	9.3
Diciembre	7.7

Fuente: SIAP, 2016.

### 1.1.8 Importancia del plátano en alimentos

Los plátanos se encuentran entre los quince principales cultivos a nivel mundial en superficie, rendimiento y calorías. El conjunto diverso de grupos de cultivares que componen los plátanos son una fuente de ingresos, suministro de alimentos y la diversidad alimentaria para millones de hogares rurales y urbanos de las regiones tropicales y subtropicales. El plátano es un cultivo semi-perenne con un ciclo de cultivo de casi un año de duración en condiciones óptimas e incluso más tiempo con temperaturas más bajas o más errático suministro de agua. (Calberto et.al, 2015).

Contiene vitamina A, tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6 y fibra; además, otros minerales necesarios para nuestro metabolismo, como calcio, fósforo y magnesio. La fibra del plátano favorece la flora bacteriana benéfica y estimula la digestión. Su pulpa es rica en carbohidratos y en aminoácidos como la lisina, leucina y valina, entre otros. Es, sin duda, un alimento energético de bajo costo, ya que, dependiendo de la variedad, la pulpa contiene de 60 a 80 por ciento de almidón. Los efectos benéficos de comer plátano son múltiples; es recomendable en casos de artritis, gota o úlceras, pues ayuda a neutralizar y a disolver los ácidos retenidos en el cuerpo, principalmente el úrico, el fosfórico y el sulfúrico. El plátano es también eficiente en el control del colesterol, la ansiedad y el sueño. Otro punto importante es que es un alimento rico en potasio, el cual contrarresta el efecto de retención

de líquidos producidos por el sodio, y la eliminación del exceso de agua ayuda a reducir la presión arterial en el organismo. Por el contrario, su falta puede provocar debilidad de los músculos, taquicardia, sed y falta de apetito. Los atletas consumen frecuentemente plátano para obtener energía y potasio (Canto y Castillo, 2011).

### **1.1.9 Productos comerciales elaborados a base de plátano**

Como ya se ha mencionado anteriormente, el plátano puede ser consumido fresco y cocinado. Para su consumo en fresco los plátanos deben estar intactos, sin golpes ni magulladuras, el color de la piel es indicativo del grado de madurez. La fruta no requiere condiciones especiales de conservación, basta mantenerlos en un lugar fresco, seco y protegido de la luz directa del sol. En todo caso de que se conserven en refrigeración, la cáscara se torna oscura por lo que se altera su aspecto externo, pero esto no afecta su calidad nutritiva. El oscurecimiento de la piel se puede llegar a evitar si se envuelven en papel. Asimismo los plátanos se pueden congelar, de forma que se conservan durante unos 2 meses (MINAGRI, 2014). Por otra parte, en caso de darle un mayor valor agregado a este producto, se puede procesar con el propósito de obtener:

#### **Harina**

De los frutos verdes puede obtenerse harina o fécula. Para evitar el oscurecimiento de la pulpa que se produce después del pelado y durante la maceración, es recomendable someter el fruto al vapor antes de pelar la pulpa, cortarla y deshidratarla, lo que se conoce como escaldado. Éste es un método barato que facilita también la eliminación de la cáscara, sobre todo si no se cuenta con maquinaria especial de pelado. El escaldado también aumenta la solubilidad de la harina y disminuye su viscosidad, lo que es importante en algunos suplementos alimenticios, como las pastas para bebés. Para su industrialización, la harina de plátano debe ser muy fina al tacto; para su almacenamiento y manejo se le adiciona más o menos uno por ciento de sustancias desecadoras, como carbonato de calcio. Esta harina puede ser utilizada entonces en la preparación de pudines, panes, helados, malteadas y otros productos (Canto y Castillo, 2011).

#### **Jaleas, mermeladas y golosinas**

La pulpa de plátano se puede aprovechar también en la preparación de jaleas, mermeladas, jarabes y golosinas como los llamados Chips, que son hojuelas preparadas a

base de rodajas secas y fritas de la pulpa del fruto verde y que se pueden acompañar de salsas agrídulces o picantes o comerse sin aderezos. El tamaño de los chips es variado, y van desde rodajas pequeñas (cortes transversales del fruto) hasta un filete longitudinal. La jalea, la mermelada y el jarabe se preparan a partir de la pulpa de frutos maduros. La pulpa se macera y se combina con almíbar o azúcar, según sea el caso. Para evitar su oscurecimiento, se deja reposar mezclada con un poco de jugo de limón. La mermelada se prepara adicionando azúcar o almíbar concentrados, y se cuece a fuego bajo mientras se mezcla. En algunos casos se adicionan pectinasas (Canto y Castillo, 2011).

### **Bebidas**

Para la elaboración de bebidas alcohólicas se utilizan frutos maduros y sanos. Los frutos muy maduros pueden emplearse para preparar un jugo energético tipo “néctar”. Se puede utilizar agua caliente para evitar que la pulpa se oscurezca. Las bebidas alcohólicas no destiladas (cerveza, vinillo) se preparan a partir de frutos maduros y sanos, los cuales se lavan abundantemente para eliminar microorganismos que pudieran arruinar la fermentación alcohólica. La pulpa machacada se mezcla en proporciones adecuadas con agua y levadura preparada previamente. La fermentación se realiza en un recipiente cerrado, adaptando una trampa para eliminar el dióxido de carbono que se produce durante la fermentación. En la industria el tiempo se reduce significativamente mediante la adición de enzimas que hidrolizan el almidón de la pulpa. Al final se calienta o pasteuriza para detener la fermentación y evitar la degradación del etanol, tras lo cual se filtra y envasa (Canto y Castillo, 2011).

### **Vinagre**

Al igual que en la fermentación alcohólica, se emplean aquí frutos maduros. Se realiza primero una fermentación alcohólica, la cual se deja más tiempo para que el alcohol sea transformado en ácido acético; después de veinte días, se abre el envase, se recupera el líquido, se diluye para disminuir la concentración del alcohol y se traspa a un recipiente de mayor capacidad porque se requiere oxígeno para la generación de ácido acético, donde se fermenta. El proceso lleva aproximadamente dos meses. El producto es un vinagre apreciado por su buen aroma y cuerpo (Canto y Castillo, 2011).

### **1.1.10 Plagas y enfermedades en plátano**

Los plátanos son susceptibles a una amplia gama de plagas y enfermedades, lo que provoca pérdidas significativas de los cultivos cada año. Algunas son altamente agresivas o muy contagiosas y se propagan de manera fácil, por lo cual una vez establecidas son persistentes y prácticamente imposibles de erradicar (Nelson, 2006). Las plagas y enfermedades más comunes que atacan a los cultivos del plátano son:

#### **Plagas**

##### **Escarabajos**

Escarabajos de hojas y frutas son una de las principales plagas que se encuentran en casi todas las variedades de plátano. El adulto se alimenta de las hojas jóvenes desplegadas de la planta bananera entrando en la porción media de la hoja. En la infestación severa la hoja pierde su vigor y el crecimiento de la planta del plátano es retrasado. Después del conjunto de frutas, los escarabajos dejan la hoja y comienzan a alimentarse en la superficie lisa de las frutas jóvenes. En última instancia, la fruta madura toma un color marrón negruzco y pierde su valor de mercado (Mohandas y Ravishankar, 2016).

##### **Thrips**

*Frankliniella parvula hood* son pequeños insectos que se localizan en la inflorescencia, y ocasionan manchas de color negro en los frutos maduros, lo cual les da mal aspecto y desprecia su valor comercial.

Se dice que oviposita en la superficie de la cáscara, causando asperezas que desmeritan su calidad, la cual se reduce significativamente cuando el ataque es fuerte, con el consecuente rechazo de la fruta en el mercado de exportación. Es más abundante en los meses secos, ya que sus poblaciones disminuyen con la lluvia (INIFAP, 2005).

##### **Gorgojos**

La fase larvaria es la etapa más destructiva para la infección, donde los adultos ponen huevos en la base de la planta y provocan la destrucción del cormo o rizoma. Esta infección afecta el desarrollo de las raíces y la absorción de nutrientes, lo que resulta en el debilitamiento de toda la planta. Además, el daño del gorgojo reduce el vigor de la planta y aumenta la mortalidad por succión, y también se ha reportado una pérdida de rendimiento de hasta el 100%. En algunos estudios se ha demostrado que los genotipos con genoma “B”

son más tolerantes a los gorgojos del plátano que los genotipos con sólo genomas “A” (Mohandas y Ravishankar, 2016).

### **Picudo Negro**

*Cosmopolites sordidus*, *germ* por lo general es la plaga más importante de los plátanos a nivel mundial. Los ataques más severos se producen en plantaciones viejas y en plantas debilitadas por la sequía, deficiencias nutricionales u otras plagas. En las plantas afectadas se da una reducción de crecimiento, amarillamiento de hojas, pérdida de sistema radical, volcamiento delseudotallo, prolongación del ciclo de producción y disminución en el rendimiento (Figura 5). El daño causado por el insecto puede resultar en reducción del tamaño de fruto, menor peso del racimo y acortamiento de la vida de anaquel (Amador et.al, 2015).



Fuente: Amador et.al, 2015.

**Figura 5. Plantas de plátano afectadas por *Cosmopolites***

Se han registrado pérdidas de más del 40% a incluso el 100% de la siembra, ya que las poblaciones del picudo aumentan en ciclos de cultivo sucesivos (OECD, 2009). El control de esta plaga en los sistemas intensivos de producción comercial se basa principalmente en la aplicación de insecticidas cuyo uso induce resistencia, emergencia de plagas secundarias, afecta especies benéficas y tiene un alto costo, lo que provoca un incremento en los costos de producción (Amador et.al, 2015).

### **Picudo rayado y picudo amarillo**

Existen dos especies de picudo amarillo que son el *Metamasius hemipterus*, conocido como el picudo rayado de la caña de azúcar, y el picudo amarillo, *Metamasius hebetatus* (Figura 6).



Fuente: ICA, 2012.

**Figura 6. (a) Adulto de picudo amarillo (b) Adulto de picudo rayado.**

Por lo general, estas plagas son secundarias; la presencia en el cultivo de plátano está relacionada con plantaciones en mal estado, con desbalances o deficiencias nutricionales, especialmente de potasio y boro. También en plantaciones donde no se realiza el destronque inmediato y no se pican los residuos al momento de la cosecha. En ambas especies, el daño es causado principalmente por las larvas que consumen el seudotallo, lo debilitan y ocasionan el doblamiento de las plantas al momento de llenado del racimo. Ambos atacan el seudotallo, el picudo amarillo desde la base hasta el tercio superior y el rayado por encima de un metro de altura. El daño se inicia en las calcetas externas hacia adentro, haciendo que las hojas más externas de la planta se vuelvan amarillas y mueran (ICA, 2012).

### **Nematodos**

El nematodo barrenador *Radopholus similis* es uno de los patógenos de las raíces más importantes que atacan a los plátanos de la zona tropical, especialmente en los tipos Cavendish (OECD, 2009).

*Radopholus similis* se alimenta de raíces y cormos de banano y plátano en todo el mundo, afectando el crecimiento y desarrollo de este cultivo, con pérdidas en producción entre el 20 y 100%. En las células del cilindro cortical, *R. similis* produce lesiones de longitud variable (5 o más cm) con forma de estrías, éstas inicialmente tienen colores que varían desde amarillo claro hasta oscuro, luego rosado rojizas y finalmente marrón o negras. En algunos casos produce depresiones en el tejido que modifican la anatomía

cilíndrica original de las raíces. En infestaciones altas, las lesiones rodean completamente las raíces, hasta destruirlas totalmente (Figura 7) (Guzmán, 2011).



Fuente: Guzmán, 2011.

**Figura 7. Cultivo de plátano severamente afectado por el nematodo *R.***

En las raíces, *R. similis* no invade el cilindro central (tejidos vasculares), aun en infestaciones altas, el cual queda expuesto a la invasión de microorganismos secundarios como hongos y bacterias, que ocasionan necrosis y muerte de las raíces en la parte posterior de la lesión y pueden contribuir al volcamiento. En las plantas infectadas por *R. similis* se reduce la absorción de agua y nutrientes, resultando en varios síntomas como amarillamiento de hojas y disminución del tamaño y longevidad de las plantas (Guzmán, 2011).

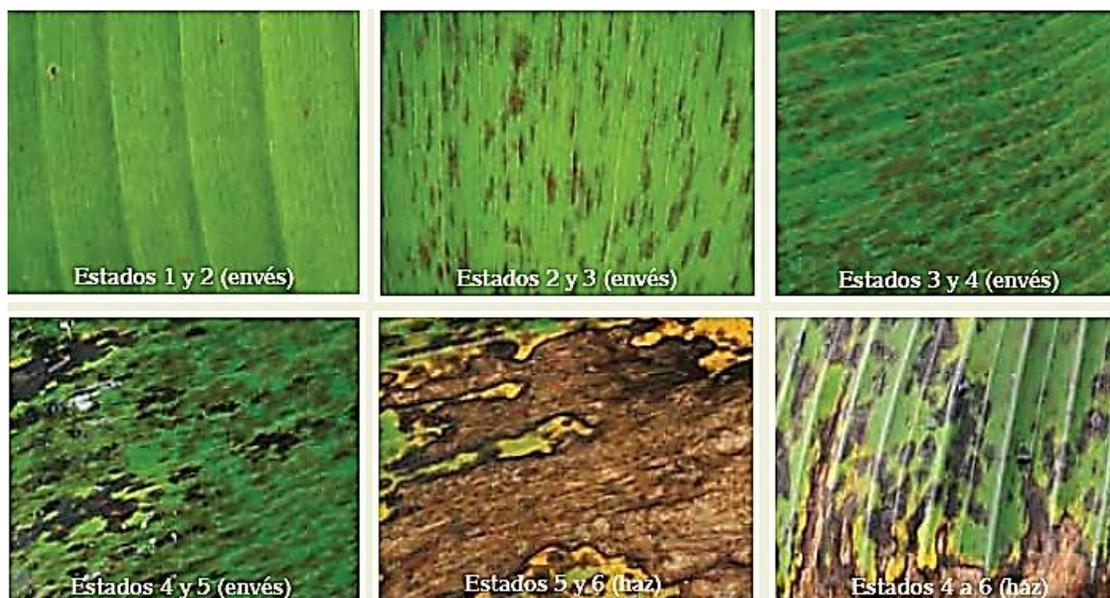
### **Enfermedades**

#### **Sigatoka negra**

La Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, es la enfermedad foliar que representa la principal limitante en la producción de musáceas a nivel mundial (Pantoja et.al, 2013). Este patógeno causa considerable destrucción de tejido foliar, lo que reduce notoriamente la capacidad fotosintética y dificulta que la planta alcance la floración con un buen desarrollo vegetativo y un número de hojas funcionales que permita el llenado de los frutos en forma efectiva, lo que ocasiona maduración prematura de los frutos y racimos con peso inferior a los estándares de comercialización (Lazo y Mu, 2012). En variedades susceptibles, la enfermedad se reconoce por la presencia de gran número de rayas y manchas más notorias por debajo de las hojas, las cuales aceleran el secamiento y

muerte del área foliar (ICA, 2012). El avance puede ser observado, al inicio, como manchas o puntos pequeños de color rojo a café, principalmente sobre el envés de las hojas, los cuales van creciendo y alargándose hasta producir manchas más oscuras, que luego comienzan a secarse (Marín et.al, 2003).

Los síntomas de la Sigatoka negra se pueden reconocer a través de seis estados según Pantoja et.al (2013) (Figura 8):



Fuente: Pantoja et.al, 2013.

**Figura 8. Estados de avance de la sintomatología ocasionada por la Sigatoka negra.**

**Estado 1.** Pequeñas lesiones o puntos de color blanco-amarillento a marrón, de 1 mm de longitud, denominadas pizcas, apenas visibles en el envés de las hojas.

**Estado 2.** Rayas o estrías cloróticas de 3 – 4mm de longitud por 1 mm de ancho, de color marrón.

**Estado 3.** Las rayas o estrías se alargan y amplían dando la impresión de haber sido pintadas con pincel, sin bordes definidos y de color café, que pueden alcanzar hasta 2cm de longitud.

**Estado 4.** Manchas ovaladas de color café en el envés y negro en el haz.

**Estado 5.** Manchas negras rodeadas de un anillo negro y a veces un halo amarillento y centro seco y semihundido.

**Estado 6.** Manchas con centro seco y hundido, de coloración marrón clara, rodeadas de tejido clorótico.

El desarrollo de la enfermedad se encuentra directamente influenciado por las condiciones climáticas, susceptibilidad de la variedad sembrada y manejo del cultivo (Pantoja et.al, 2013). Si la infección es muy severa la hoja se ennegrece, seca y muere dentro de las 3 o 4 semanas siguientes a la aparición de los primeros síntomas (ICA, 2012).

### **Moko del plátano**

Después de la Sigatoka Negra, la marchitez causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum raza 2* es la enfermedad de mayor importancia económica para el cultivo del plátano, destruyendo hasta el 100% en algunas plantaciones donde se presenta. Su diseminación se incrementa cuando no se toman las medidas necesarias para su control oportuno (Pantoja et.al, 2013).

El Moko del plátano causa un marchitamiento vascular y decoloración de los vasos vasculares (Manzo et.al, 2016); induce un marchitamiento que inicia con el amarillamiento y el colapso de las hojas más jóvenes, así como necrosis de la hoja candela (conocida también como hoja tabaco o cigarro). Estos síntomas progresan hacia las hojas más viejas e internamente los tejidos vasculares se tornan necróticos, especialmente aquellos alcanzados en la zona central delseudotallo (Pantoja et.al, 2013). La fruta puede tornarse de color amarilla y la cáscara se agrieta. Al momento del corte, la pulpa de la fruta presenta una pudrición firme de color café, la cual con el tiempo llega a tornarse gris (Manzo et.al, 2016). La enfermedad del Moko puede ser transmitida por la semilla asexual, al seleccionar como material de siembra los colinos de plantas afectadas. La propagación al interior de una plantación comercial ocurre principalmente por el uso de herramientas de trabajo contaminadas durante las labores rutinarias. Estas herramientas pueden transmitir fácilmente la enfermedad a plantas sanas cercanas (Pantoja et.al, 2013).

### **Mal de Panamá**

El mal de Panamá es causado por el hongo, *Fusarium oxysporum Schlect. f. sp. Cubense* (Manzo et.al, 2016). Los síntomas externos producidos por el hongo se caracterizan por un

amarillamiento de las hojas más adultas a lo largo del margen foliar que continúa hacia la nervadura central hasta quedar las hojas completamente marchitas y de color café; puede o no manifestarse un agrietamiento en la base del pseudotallo (Figura 9) (ICA, 2012).



Fuente: ICA, 2012.

*Figura 9. Quemazón de hojas, síntoma avanzado de mal de Panamá.*

Los síntomas internos se caracterizan por una decoloración vascular y se observan al cortar las raíces, el cormo o el pseudotallo. Esta decoloración amarilla, marrón o café-oscuro progresa hacia los haces vasculares del pseudotallo. Al realizar un corte vertical del pseudotallo de una planta infectada por Mal de Panamá se observan líneas color marrón, rojo o amarillo; mientras que en un corte transversal se observan en forma de anillos. El patógeno se dispersa principalmente a través del movimiento de material de propagación y residuos de plátano infectados. Las esporas del patógeno, así como el material infectado, son transportados hacia los canales de drenaje por el agua de lluvia y a través del agua de riego estas esporas infectan nuevas áreas. Por otra parte, el patógeno puede infectar raíces de ciertas malezas sin provocar síntomas visibles y pueden permanecer en estas plantas en ausencia de plátano (DGSV-CNRF, 2011).

## **1.2 Biotecnología e ingeniería genética**

La biotecnología es un campo diverso que implica trabajar con células vivas o usar moléculas derivadas de ellas para aplicaciones orientadas hacia el bienestar humano

utilizando diversos tipos de herramientas y tecnologías. Es una fusión de la ciencia biológica con la ingeniería (Gupta et.al, 2017).

La ingeniería genética y la biotecnología se están utilizando ampliamente en la mejora de los cultivos y han proporcionado un medio por el cual se pueden producir rendimientos incrementados de alimentos y fibras de una manera ambientalmente sostenible. Además, estas técnicas han permitido obtener grandes conocimientos sobre las redes de genes que resultan en la producción de varios bioproductos que pueden ser beneficiosos para la salud humana y el medio ambiente. Los últimos 5 años han sido testigos de importantes avances en ingeniería genética vegetal y biotecnología. Ha facilitado en gran medida la modificación dirigida de rasgos específicos, permitiendo la producción de nuevos cultivares para combatir los desafíos asociados con el cambio climático. Este número especial se centra en el mejoramiento genético de las plantas, especialmente en la tolerancia de las plantas al estrés (Ouyang et.al, 2017).

### **1.2.1 Importancia de la biotecnología en los alimentos**

El término biotecnología se utiliza a menudo como sinónimo de organismos genéticamente modificados (OGM) en la agricultura para producir plantas y animales que aumentan la eficiencia de la producción de alimentos o aumentan el contenido nutricional. La biotecnología utiliza una serie de diferentes herramientas genéticas, más allá de la modificación, incluyendo el uso de tecnología anti sentido, y la síntesis exógena de enzimas importantes (Temple et.al, 2012).

Según la OMS (2005) los alimentos producidos mediante biotecnología moderna pueden dividirse en diferentes categorías:

1. Alimentos compuestos por lo que contengan organismos vivos/viables, por ejemplo maíz.
2. Alimentos derivados de o que contengan ingredientes derivados de OGM, por ejemplo harina, productos que contengan proteínas alimentarias o aceite de soja genéticamente modificada.
3. Alimentos que contengan un solo ingrediente o aditivo producido por microorganismos genéticamente modificados, por ejemplo colorantes, vitaminas y aminoácidos esenciales.

4. Alimentos que contengan ingredientes procesados por enzimas producidas mediante microorganismos genéticamente modificados, por ejemplo, el jarabe de maíz de alta fructosa producido a partir del almidón, usando la enzima glucosa isomerasa (producto de un microorganismo genéticamente modificado).

El uso de la biotecnología en los alimentos viene con algunas preocupaciones de seguridad importantes que podrían fácilmente compensar el aumento en la producción y el contenido nutricional o causar daños no intencionales al medio ambiente; sin embargo, presenta beneficios y Temple et.al (2012) resume los más importantes de la siguiente manera:

### **Producción de plantas**

- Variedades de mayor rendimiento debido a la resistencia a herbicidas o una mejor absorción de nutrientes.
- Mejor resistencia a enfermedades, plagas y condiciones adversas.
- Mejora del contenido nutricional.
- Disminución de la necesidad, en muchos casos, de fertilizantes y otros tratamientos químicos.

### **Producción animal**

- Mayor control de las enfermedades de los animales.
- Composición modificada de alimentos derivados de animales.

### **1.2.2 Organismos Genéticamente Modificados**

Organismo genéticamente modificado (OGM) es un organismo cuyo material genético ha sido alterado mediante el uso de técnicas de ingeniería genética. El término OGM se utiliza para referirse a cualquier microorganismo, planta o animal, en el que se han utilizado técnicas de ingeniería genética para introducir un gen específico y eliminar o modificar partes específicas de su genoma (Singh y Gupta, 2017).

Los OGM han sido desarrollados como una alternativa de productos biológicos, a los que se les confieren características deseadas específicas tales como resistencia a insectos, plagas y/o la tolerancia a herbicidas y en cada desarrollo científico-técnico se caracterizan

genes para que los ingenieros genéticos puedan introducirlos a diferentes organismos, como por ejemplo la proteína luciferasa expresada en la planta de tabaco (COFEPRIS, 2013).

#### **1.2.2.1 Ingeniería genética: ADN Recombinante**

La clonación molecular se refiere a un conjunto de experimentos que se utilizan para construir una molécula de ADN recombinante que puede replicarse en el huésped. El clon se refiere a un grupo de células que se han originado del mismo progenitor y son idénticas entre sí. Éste es el paso básico en la tecnología del ADN recombinante. Comienza con el aislamiento del gen de interés de un organismo, amplificando el fragmento mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ligándolo a un vector. Se propaga a continuación en un huésped y posteriormente se caracteriza y se aísla para uso específico. Las herramientas necesarias son vectores, enzimas de restricción, enzima ADN ligasa y huésped (Gupta et.al, 2017).

#### **Endonucleasas de restricción**

Las endonucleasas de restricción son enzimas que son producidas por bacterias como un mecanismo de defensa contra el genoma extranjero invasor tal como las de virus. Estas enzimas reconocen secuencias específicas de ADN extraño y las digieren a fragmentos pequeños, protegiendo así al huésped. Actúan como tijeras moleculares e identifican secuencias palindrómicas específicas (Gupta et.al, 2017). Los extremos recién creados de los fragmentos de ADN se denominan informalmente como "extremos pegajosos" o "extremos romos", dependiendo de si se generan o no regiones de un solo hilo de ADN por la actividad de corte de la enzima de restricción (Harris y Ness, 2016).

#### **Vectores**

Los vectores son vehículos que se utilizan para transferir y mantener establemente fragmentos de ADN recombinante en organismos huéspedes. Existen varias opciones para los vectores de clonación dependiendo de la longitud del fragmento que se va a insertar y del uso específico; sin embargo, todos los vectores tienen características comunes tales como origen de replicación (OriC), sitios de clonación múltiple (MCS) para la inserción de ADN extraño y marcadores de fármacos de resistencia para la selección de colonias que se transforman. Algunos vectores se usan para expresar los genes clonados (Gupta et.al, 2017).

Los vectores más usados son los plásmidos bacterianos (Betancor et.al, 2008), son moléculas de ADN que existen separadamente del cromosoma (libre del citoplasma), pueden proporcionarle nuevas habilidades a su huésped (Brown y McCallus, 2015). Los sistemas de vector huésped que consisten en la bacteria *E. coli* K-12 y sus plásmidos vectoriales han demostrado ser de inmenso valor para la clonación, amplificación y análisis de fragmentos de ADN de una amplia variedad de organismos (Gupta et.al, 2017).

Actualmente existen varios tipos de vectores, algunos plasmídicos (como el pBR322 o el pUC) y también virales (como el bacteriófago lambda) o, los más modernos llamados cósmidos que combinan algunas de las ventajas de los plásmidos con las de los fagos (Betancor et.al, 2008).

### Métodos de transformación del ADN

La rápida evolución de la tecnología de transformación ha dado lugar a la modificación genética de muchas especies de plantas. Los métodos para introducir diversos genes en las células vegetales incluyen técnicas directas o indirectas (Cuadro 7) (Singh y Gupta, 2017).

*Cuadro 7. Métodos de transformación del ADN.*

Indirecta (Mediada por el vector)	Directa (sin el vector)	
Biológico	Físico	Químico
<p><i>A.tumefaciens</i>  <i>A.rhizogenes</i>                      Mediado por el virus</p>	<p>Microinyección                      Bombardeo de partículas                      Electroporación                      Sílice/ Fibras de carbono</p>	<p>Polietilenglicol                      Fosfato de Calcio                      Lípidos artificiales                      Proteínas                      Dendrímeros</p>

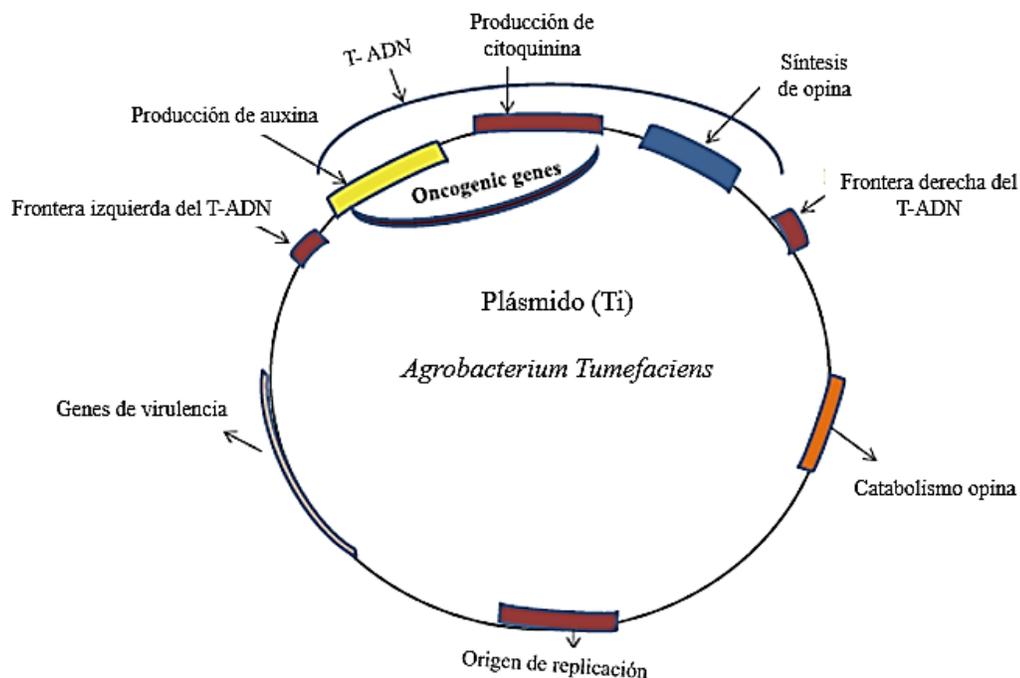
Fuente: Singh y Gupta, 2017.

Las técnicas más utilizadas se describen a continuación:

### Método de transformación indirecta del ADN

Este método explora la capacidad natural del género *Agrobacterium* para transformar las células vegetales. *A. tumefaciens* es una bacteria gram-negativa transmitida por el suelo que causa "enfermedad de la vena de la coronilla", mientras que *A. rhizogenes* es el agente causal de la "enfermedad de la raíz peluda". Los plásmidos inductores de tumores (Ti) de *A. tumefaciens* (Figura 10) o plásmidos inductores de raíces (Ri) de *A. rhizogenes* son

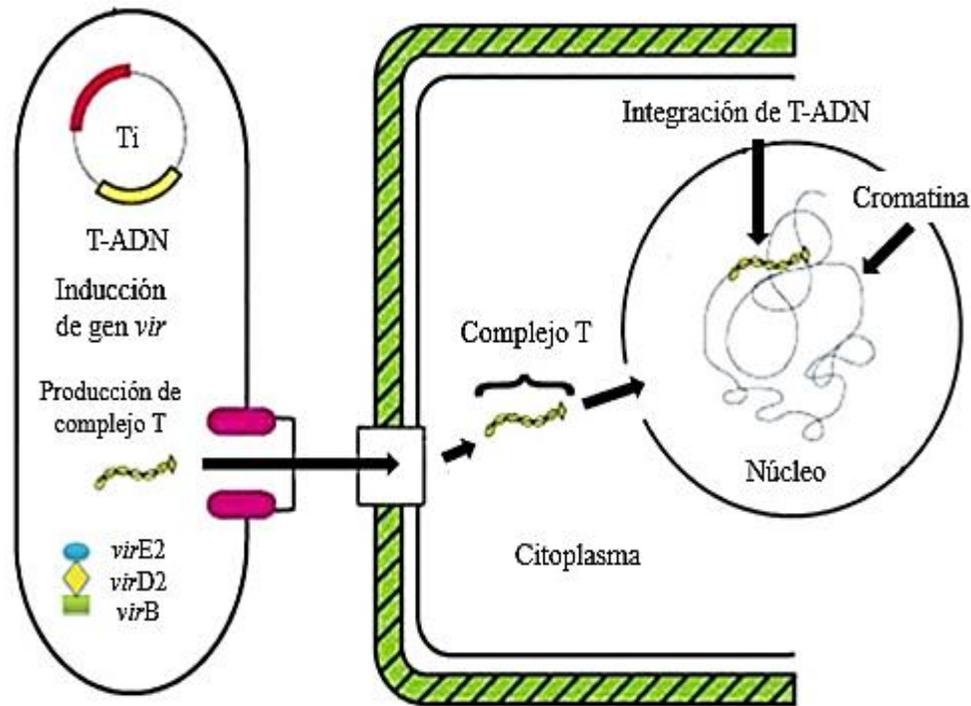
megaplásmidos que confieren patogenicidad. Estos megaplásmidos poseen una región “T-ADN”, también llamada “ADN transferido”, que a su vez consiste en una región oncogénica, el agente causal de tumores y otras regiones que consisten en genes responsables de la síntesis de opina. El oncogén es responsable de la producción de enzimas que están implicadas en la síntesis de auxina y citoquinina, resultando así en el desarrollo de tumores (Saeed et.al, 2016).



Fuente: Gupta et.al, 2017.

**Figura 10. Plásmido Ti de *Agrobacterium Tumefaciens*.**

Tanto los genes de catabolismo tumorigénico como de opina se encuentran dentro del ADN-T del plásmido Ti, aunque los genes de virulencia (*vir*) están situados fuera del ADN-T sobre el plásmido Ti y el cromosoma bacteriano. Estos genes *vir* están disponibles en algunos operones (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* y *virH*) sobre el plásmido Ti y diferentes operones (*chvA*, *chvB* y *chvF*) que son cromosómicos y son fundamentales para la transferencia de T-ADN. El instrumento de transferencia de genes de *A. tumefaciens* a la célula de la planta huésped incluye varios pasos. Estos se componen de colonización por bacterias, inicio del marco de virulencia bacteriana, disposición del complejo de transferencia de T-ADN y transferencia de T-ADN llevada después por coordinación al genoma de la planta (Figura 11) (Ahmad et.al, 2017).



Fuente: Singh y Gupta, 2017.

**Figura 11. Mecanismo molecular de transferencia de genes a través de *Agrobacterium*.**

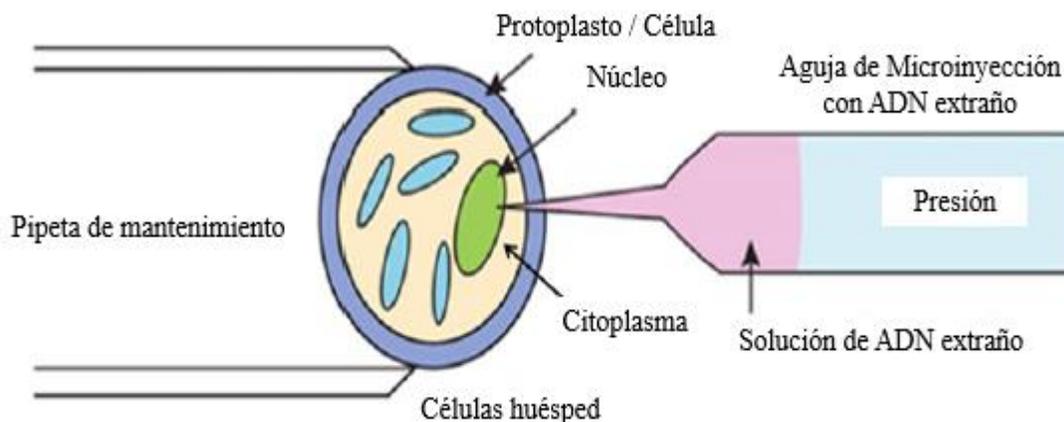
El factor más importante en la transformación mediada por *Agrobacterium* es el rango de huésped de diferentes cepas de *Agrobacterium*. Se ha informado que *Agrobacterium* transfiere ADN a un grupo relativamente grande de organismos incluyendo diferentes plantas de dicotiledóneas y monocotiledóneas (Saeed et.al, 2016).

### **Métodos de transformación directa del ADN.**

Además de las técnicas de transferencia génica basadas en el uso de *Agrobacterium*, existen otro tipo de técnicas basadas en la utilización de tratamientos químicos, físicos y eléctricos para introducir ADN en las células. Estas técnicas son denominadas comúnmente como técnicas de transferencia génica directa (DGT) (Domínguez et.al, 2012).

### **Microinyección**

El ADN se inyecta directamente en protoplastos o células vegetales (específicamente en el núcleo o citoplasma) usando una aguja o micropipeta de vidrio de punta fina (0,5-1,0  $\mu\text{m}$  de diámetro). Este método de transferencia génica se utiliza para introducir el ADN en células grandes como los ovocitos, los huevos y las células del embrión temprano (Figura 12) (Singh y Gupta, 2017).



Fuente: Singh y Gupta, 2017.

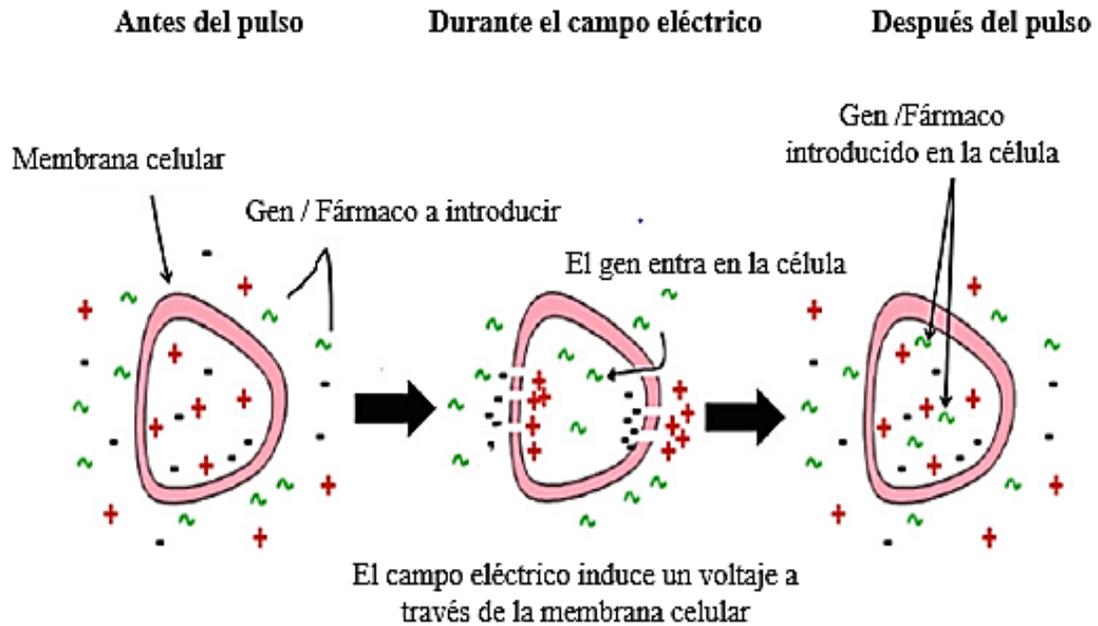
**Figura 12. Transferencia de ADN mediada por microinyección.**

En plantas la aplicación de la microinyección resulta más dificultosa que en animales y, aunque se han hecho importantes avances en la aplicación de esta técnica en células vegetales, su uso continua resultando muy complicado. La principal dificultad que se encuentran en plantas es la presencia de pared celular, la cual no es solo una barrera física que hace necesario el uso de capilares mucho más gruesos para llevar a cabo la microinyección, sino que también dificulta mucho la visualización del núcleo, lo que hace que la microinyección tenga lugar muchas veces en el citoplasma. Otro problema es la presencia de grandes vacuolas en las algunas células vegetales, pues si el ADN es transportado a su interior, este será degradado antes de alcanzar el núcleo (Domínguez et.al, 2012).

### **Electroporación**

Se aplica un pulso eléctrico corto de alta intensidad de campo a las células y tejidos diana que provocan cierto tipo de cambios estructurales en la membrana celular huésped, aumentando con ello la permeabilidad de la membrana celular. El uso más explotado de la técnica de electroporación es la introducción in vitro de ADN en las células diana (Saeed et.al, 2016). Los genes de interés requieren la secuencia reguladora de la planta. Los materiales vegetales se incuban en una solución tampón que contiene ADN y se someten a impulsos eléctricos de alto voltaje. A continuación, el ADN migra a través de poros inducidos por alto voltaje en la membrana plasmática y se integra en el genoma (Figura 13) (Singh y Gupta, 2017). Utilizando la técnica de electroporación, se han logrado cambios

fructíferos con los protoplastos de las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Ahmad et.al, 2017).

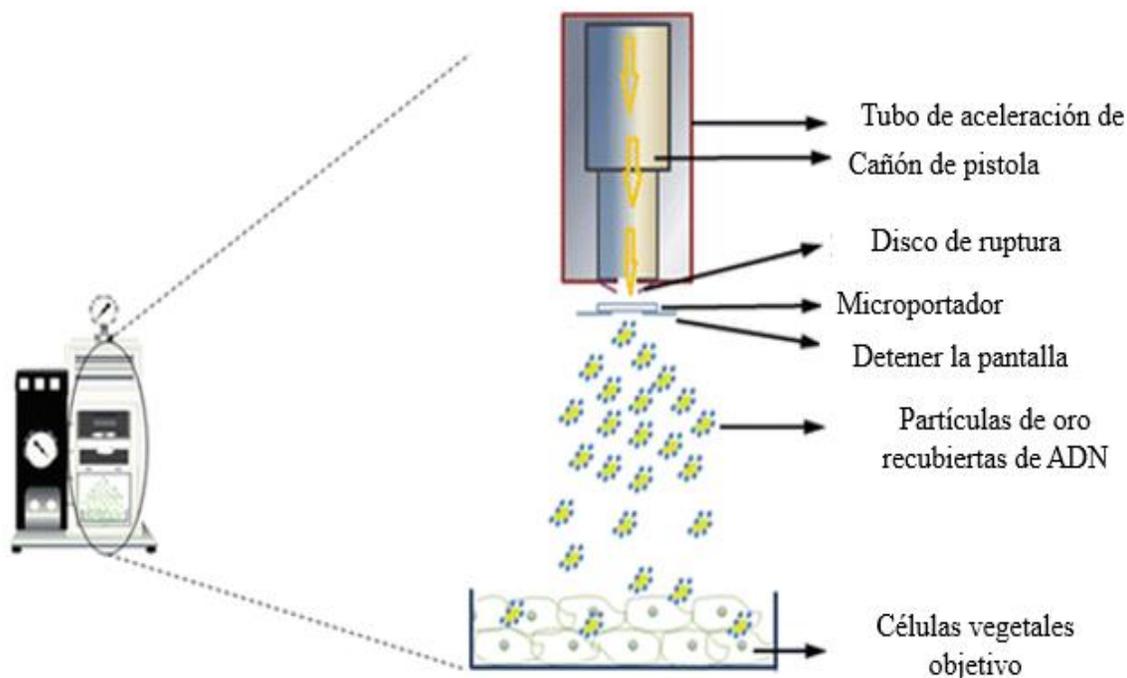


Fuente: Singh y Gupta, 2017.

*Figura 13. Método de electroporación.*

### **Bombardeo de partículas (Biobalística)**

La técnica consiste en bañar partículas esféricas de oro o tungsteno (aproximadamente de 0.4-1.2 micrómetros de diámetro, o del tamaño de algunas células bacterianas) con ADN, el cual ha sido precipitado con  $\text{CaCl}_2$ , espermidina o polietilen glicol. Las partículas bañadas con ADN son aceleradas a altas velocidades (300-600 metros/segundo) con un equipo especial llamado pistola de partículas (o pistola de genes). Actualmente se usa helio a altas presiones como fuente para la propulsión. Los proyectiles acelerados van a penetrar la pared celular y la membrana de la célula, aunque la densidad de partículas utilizadas no va a resultar significativamente dañina para la misma. Una vez dentro de la célula, el ADN se separa de las partículas y, en algunos casos, es integrado dentro del genoma de las plantas (Figura 14) (Domínguez et.al, 2012).



Fuente: Ahmad et.al, 2017.

**Figura 14. Bombardeo de microprojectiles de un tejido vegetal.**

El bombardeo con microprojectiles es utilizado para transferir ADN exógeno a suspensiones celulares de plantas, a cultivos de callos, a tejidos meristemáticos, a embriones inmaduros y a polen. Además, este método ha sido utilizado para transferir ADN a cloroplastos y mitocondrias (Domínguez et.al, 2012).

#### **1.2.2.2 Cultivos genéticamente modificados**

Un cultivo genéticamente modificado (GM) es una planta utilizada con fines agrícolas en la que se han insertado genes que codifican rasgos deseables mediante ingeniería genética (Qaim, 2016).

Existen diversas ventajas y desventajas de modificar genéticamente los cultivos, entre ellas se encuentran:

##### **Ventajas**

**Tolerancia mejorada a las tensiones bióticas y abióticas:** Proporcionan una solución potencial para la seguridad alimentaria, confieren resistencia contra el medio ambiente extremo, a insectos, plagas y enfermedades, que en última instancia reduce el uso de insecticidas, fungicidas, pesticidas y otros productos químicos en la agricultura que ayuda a mejorar los ingresos brutos de los agricultores y también ayuda a reducir la carga de

productos químicos nocivos en el medio ambiente (Nandeshwar, 2015). Por ejemplo, los cultivos genéticamente modificados resistentes a la sequía pueden crecer incluso a baja disponibilidad de agua en el suelo (Mathur et al., 2017).

**Crecimiento más rápido:** Los cultivos se pueden diseñar para crecer más rápido, y se pueden cultivar en las áreas donde el período de crecimiento más corto está disponible (Mathur et al., 2017).

**Mejora de la calidad nutricional y sabor:** Los cultivos también pueden ser diseñados para producir alimentos con mayor cantidad de vitaminas y minerales, para aumentar la cantidad de carbohidratos, proteínas y contenido de grasas saturadas e insaturadas, o para mejorar el sabor, lo que puede animar a la gente a comer alimentos más saludables que actualmente no son agradables (Mathur et al., 2017).

### **Desventajas**

**Desarrollo de la resistencia a los antibióticos en patógenos:** Debido a las mayores tasas de mutación en los microorganismos, los patógenos evolucionan más rápidamente. El gen de resistencia puede transferirse horizontalmente al microorganismo patógeno. Esto puede dar como resultado la creación de superpatógenos con capacidad de resistencia a múltiples fármacos (Mathur et al., 2017).

**Etiquetado de alimentos genéticamente modificados:** Es motivo de preocupación debido a que hoy en día existen muchos productos disponibles en el mercado y no todos los países tienen normas estrictas sobre el etiquetado de alimentos que hayan sido modificados genéticamente o alguno de sus ingredientes; así que el cliente no puede saberlo (Nandeshwar, 2015).

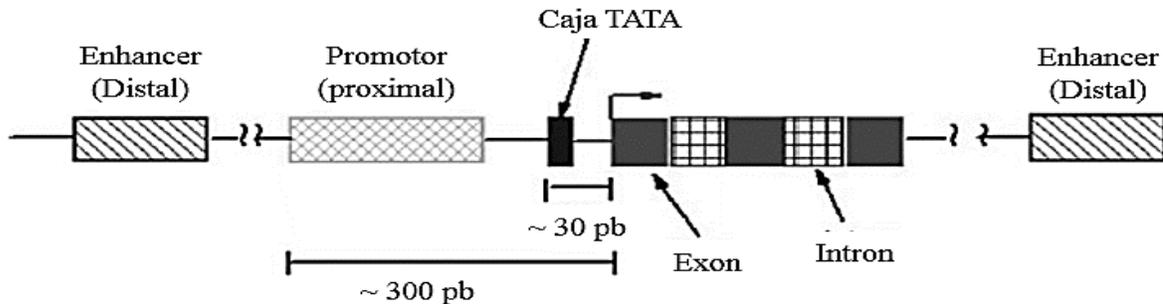
**Uso excesivo de herbicidas:** Es esencial educar a los agricultores sobre el producto genéticamente modificado que están plantando. Los cultivos herbicidas pueden alentarlos a rociar más herbicidas para obtener resultados rápidos, esto puede aumentar la carga de químicos en el suelo y contaminar los ríos y otras vías fluviales, provocando el envenenamiento de animales y causando un daño al ecosistema (Nandeshwar, 2015).

**Problemas de salud humana:** Debido a alteraciones genéticas, algunos cultivos pueden producir compuestos tóxicos que pueden ser dañinos para los seres humanos. La introducción de un gen extraño en una planta puede dar lugar a la formación de proteínas

mal plegadas que causan enfermedades priónicas o cánceres. Estos compuestos también pueden actuar como alérgenos para la raza humana (Mathur et al., 2017).

### 1.2.2.3 Promotores

El promotor es un fragmento de ADN *cis-acting* que inicia y regula la transcripción de un gen asociado (Ahmad et.al, 2017) y consta de las siguientes partes (Figura 15) (De Guglielmo et.al, 2016).



Fuente: Silencers et.al, 2014.

**Figura 15. Representación esquemática de las secuencias de un promotor.**

**Promotor mínimo o núcleo del promotor:** se localiza hasta 100 pares de bases “río arriba” y está constituido por la caja TATA (sitio de ensamblaje del complejo de iniciación por la ARN polimerasa II),

**Secuencias reguladoras proximales** (constituidas por las cajas CAAT y GC a las que se unen proteínas y factores de transcripción que facilitan el ensamblaje del complejo de iniciación) y

**Secuencias reguladoras distales** (se localizan a más de 100pb “río arriba” del sitio de iniciación de la transcripción y regulan la actividad del núcleo del promotor) que son de dos tipos:

- a) *Intensificadores o “enhancer”*, secuencias de acción *cis* que potencian la tasa de transcripción de los promotores que se encuentran en la misma molécula, a los que se unen factores de transcripción activadores;
- b) *Silenciadores, inhibidores o “silencers”*, secuencias de acción *cis* a las que se unen represores, inhibiendo a los activadores y reduciendo el nivel de transcripción.

La elección y utilización de un promotor adecuado es determinante del éxito que se logre en la aplicación de técnicas de ingeniería genética para el mejoramiento vegetal. La selección del promotor dependerá, entre otros factores, del objetivo perseguido o buscado, tal como una expresión constitutiva, en un determinado momento del desarrollo o tejido específica. Los promotores afectan la expresión tanto cuantitativa como cualitativa (en distintas etapas del desarrollo y diferentes tejidos) del gen cuya expresión están regulando. En la actualidad se han aislado numerosos promotores de una gran variedad de organismos, tanto vegetales como bacterianos o virales. Los efectos de la estructura molecular y/o secuencia de los promotores en el mecanismo de regulación de la transcripción, están siendo estudiados intensivamente (Radonic, 2010).

Basándose en la naturaleza del control de la expresión génica ejercida por los promotores, estos elementos pueden clasificarse como constitutivos, tejido-específicos o estadio-específicos, inducibles y sintéticos.

#### **Promotores constitutivos**

Dirige la expresión en la mayoría o todos los tejidos a lo largo de la vida de una planta, usualmente son activos entre especies o incluso reinos (Ahmad et.al, 2017). Han sido ampliamente utilizados en la transformación de mono y dicotiledóneas, especialmente para la detección y/o selección de células o plantas transformadas (De Guglielmo et.al, 2016). El promotor más conocido de este tipo es el promotor CaMV35S (Cuadro 8), que se aisló del virus del mosaico de la coliflor; se demostró que expresaba genes quiméricos constitutivamente en hojas, tallo, raíz y pétalos de tabaco transgénico (Ahmad et.al, 2017).

#### **Promotores inducibles**

Pueden ser activados en respuesta a diferentes estímulos, incluyendo señales endógenas y factores físicos y químicos externos, bajo condiciones experimentales controladas. Permite un control espacial y temporal más preciso de la expresión transgénica y permite analizar la función de nuevos genes (De Guglielmo et.al, 2016).

Algunos de los promotores activados por estrés físico son NOS (del gen nopalina sintetasa) de *Agrobacterium*, el de peroxidasa de arroz y el inhibidor de la peroxidasa II de arroz (De Guglielmo et.al, 2016).

**Cuadro 8. Promotores constitutivos.**

Origen	Promotor	Ventajas	Desventajas
Viral	CaMV35S, CaMV19S del mosaico de la coliflor. CaMV35S duplicado, CsVMV del mosaico de la yuca, BSV del rayado de plátano.	Expresión constitutiva. Alto número de transformantes en mono y dicotiledóneas.	Origen viral. El nivel de expresión del transgen puede variar según el tejido y el estadio. Sobreexpresión inconveniente. Puede haber silenciamiento genético a largo plazo.
Vegetal	Act 1, actina de arroz. Act 2 y ACT2/ACT8, actina de <i>Arabidopsis</i> . Ubi 1 y 2 -ZmUbi, ubiquitina de maíz. EF1 $\alpha$ , de <i>Arabidopsis thaliana</i> . APX, SCP1, PGD1, RbiB, E1F5 de arroz.	Origen vegetal. Mayor expresión en monocotiledóneas. Menor silenciamiento transgénico a largo plazo.	Menor número de transformantes que con promotores de origen viral. La expresión puede variar según el estadio de desarrollo y el tejido. Potencial uso en el control de áfidos.

Fuente: De Guglielmo et.al, 2016.

### **Promotores tejido o estadio-específicos**

Solo actúan en tejidos particulares o en ciertos estadios de desarrollo de la planta. Pueden ser inducidos por factores endógenos o exógenos, en cuyo caso también se les clasifica como inducibles. (De Guglielmo et.al, 2016).

### **Promotores sintéticos o quiméricos**

Los promotores sintéticos son secuencias compuestas de una combinación única de elementos reguladores núcleo, proximal y distal, todos los cuales pueden contener elementos reguladores específicos. Pueden imitar a los promotores naturales, pero son más eficientes o pueden proporcionar perfiles de expresión nuevos que no existen en la naturaleza (Ahmad et.al, 2017).

#### **1.2.2.4 Plátano genéticamente modificado**

La ingeniería genética del plátano se considera una alternativa perfecta para la mejora de cultivares estériles o aquellos que no son susceptibles de métodos de cría tradicionales.

Varios intentos exitosos han demostrado la fortaleza de esta tecnología en el desarrollo de tolerancia al estrés abiótico y variedades transgénicas de plátano resistentes a las enfermedades. Sólo unos pocos de los plátanos genéticamente modificados (GM) han calificado para estudios de campo y algunos están actualmente en pruebas nutricionales en humanos. Los plátanos transgénicos tienen como objetivo aumentar la productividad y el valor nutricional y, de este modo, podrían contribuir eficazmente a la seguridad alimentaria en un futuro próximo (Ghag y Ganapathi, 2017).

### **Plátanos GM resistentes al estrés abiótico**

El cambio climático desafía la productividad óptima de cultivos en regiones tropicales. El cultivo del plátano se ve afectado por el aumento de salinidad, temperaturas frías cuando las temperaturas inferiores a 12°C provocan daños por frío o por un aumento crítico en la temperatura. El desarrollo de plátanos GM con la capacidad de crecer vigorosamente bajo condiciones climáticas y ambientales desfavorables es el enfoque ideal. Tan pronto como la planta experimenta un estrés abiótico, induce una cascada de eventos de señalización que implican factores de transcripción y efectos descendentes que culminan en una respuesta de tolerancia contra el agente de estrés (Ghag y Ganapathi, 2017).

### **Plátanos GM resistentes al estrés biótico**

Plantaciones de plátano en los distintos países tropicales han sido infestadas por plagas y enfermedades justamente por la forma como se cultiva. Ante epidemias como la enfermedad de la Sigatoka negra, surge la necesidad de desarrollar un plátano resistente, que responda principalmente al excesivo uso de fungicidas que se aplican para su control. Los investigadores reportan que parte de su trabajo en el desarrollo del plátano, se ha dedicado en la identificación de promotores para desarrollar lo que ellos llaman plátano “cisgénico”. La cisgénesis es un término dado por los biotecnólogos para describir a la modificación genética de un organismo receptor de un gen que proviene de otro organismo sexualmente compatible. Esta técnica de biotecnología molecular se aplica en la reproducción de plantas, y difiere de la transgénesis en la medida que no se hacen modificaciones o inserciones de genes entre organismos no sexualmente compatibles (Bash, 2015).

### **Plátano GM biofortificado**

La biofortificación es el método en el cual se seleccionan los cultivos con alta densidad de nutrientes a través de las prácticas convencionales del mejoramiento genético vegetal (o fitomejoramiento) o de la ingeniería genética (Bash, 2015). La deficiencia de vitamina A (VAD) es un problema de salud pública identificado en 118 países, con predominio en el sudeste asiático y África, donde la dieta incluye principalmente cereales y tubérculos. El equipo de la Universidad Tecnológica de Queensland (Australia) ha engendrado el plátano Cavendish con una cantidad incrementada de betacaroteno, precursor de la vitamina A. El objetivo principal de este proyecto, apoyado por la Fundación Bill y Melinda Gates, es aliviar el problema de la mortalidad infantil y la ceguera que se producen debido a la VAD en África oriental. Además, el mismo grupo en la QUT está trabajando para aumentar el contenido de micronutrientes (como el hierro) en los plátanos (Ghag y Ganapathi, 2017).

#### **1.2.3 Regulaciones de Organismos Genéticamente Modificados**

La utilización y liberación al ambiente de los OGM, ha despertado cuestionamientos y ha generado conciencia mundial sobre la importancia de analizar y evaluar responsable y exhaustivamente la liberación de los OGM al medio ambiente, tomando en cuenta los diferentes factores y los posibles riesgos. Lo anterior ha permitido a través de discusiones y procesos de revisión por expertos, la creación de acuerdos internacionales y legislaciones nacionales para el manejo responsable de los OGM (Bolívar, 2003).

##### **1.2.3.1 Regulaciones Internacionales**

El **Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre Diversidad Biológica** es un tratado internacional que administra los movimientos de un país hacia otro de organismos vivos modificados (OVMs). Fue adoptado el 29 de enero de 2000 como un acuerdo complementario al Convenio sobre Diversidad Biológica, y entró en vigor el 11 de septiembre de 2003 (CIBIOGEM, 2015). México ratificó el Protocolo de Cartagena por acuerdo del Senado de la República en 2002. El objetivo del Protocolo es contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización seguras de los organismos vivos modificados resultantes de la biotecnología moderna que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos

para la salud humana, y centrándose concretamente en los movimientos transfronterizos (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2000).

La cuestión de elaborar normas sobre responsabilidad y compensación por daños resultantes de los organismos vivos modificados fue objeto de consideración a nivel internacional tanto antes como después de la adopción del Protocolo sobre Seguridad de la Biotecnología. Después de varios años de negociaciones, se completó un acuerdo internacional conocido como **Protocolo de Nagoya–Kuala Lumpur sobre Responsabilidad y Compensación Suplementario al Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología** y éste fue adoptado en Nagoya, Japón, el 15 de octubre de 2010. El objetivo del Protocolo Suplementario es contribuir a la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana, proporcionando normas y procedimientos internacionales en la esfera de la responsabilidad y compensación en relación con los organismos vivos modificados (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2011a).

El 29 de octubre de 2010, en la décima reunión de la Conferencia de las Partes, celebrada en Nagoya, Japón, se adoptó el **Protocolo de Nagoya sobre Acceso a los Recursos Genéticos y Participación Justa y Equitativa en los Beneficios que se Deriven de su Utilización al Convenio sobre la Diversidad Biológica**. El Protocolo proporciona una base sólida para una mayor certeza y transparencia jurídicas tanto para los proveedores como para los usuarios de recursos genéticos. El objetivo del Protocolo es la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos, incluso por medio del acceso apropiado a los recursos genéticos y por medio de la transferencia apropiada de tecnologías pertinentes, teniendo en cuenta todos los derechos sobre dichos recursos y tecnologías y por medio de la financiación apropiada, contribuyendo por ende a la conservación de la diversidad biológica y la utilización sostenible de sus componentes (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2011b).

### **1.2.3.2 Regulaciones en México**

El Marco Legal en México se encuentra acorde con las Reglas y Normas Internacionales en la materia, básicamente derivados del Protocolo de Cartagena y se integra por diversos

ordenamientos legales publicados en el Diario Oficial de la Federación (SENASICA, 2016), tales como:

### **Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM)**

Esta Ley tiene por objeto regular las actividades de utilización confinada, liberación experimental, liberación en programa piloto, liberación comercial, comercialización, importación y exportación de organismos genéticamente modificados, con el fin de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que estas actividades pudieran ocasionar a la salud humana o al medio ambiente y a la diversidad biológica o a la sanidad animal, vegetal y acuícola (Ley DOF 18-03-2005, 2005).

### **Reglamento de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados**

Tiene por objeto reglamentar la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, a fin de proveer a su exacta observancia (SEMARNAT, 2008).

**NORMA Oficial Mexicana NOM-164-SEMARNAT/SAGARPA-2013**, Que establece las características y contenido del reporte de resultados de la o las liberaciones realizadas de organismos genéticamente modificados, en relación con los posibles riesgos para el medio ambiente y la diversidad biológica y, adicionalmente, a la sanidad animal, vegetal y acuícola.

**NORMA Oficial Mexicana NOM-001-SAG/BIO-2014**, Especificaciones generales de etiquetado de organismos genéticamente modificados que sean semillas o material vegetativo destinados a siembra, cultivo y producción agrícola.

Por otra parte, con el objeto de coordinar las políticas de la Administración Pública Federal relativas a la bioseguridad y a la producción, importación, exportación, movilización, propagación, liberación, consumo y, en general, uso y aprovechamiento de organismos genéticamente modificados, sus productos y subproductos, en 1999 se creó la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM) (COFEPRIS, 2016), la cual es un órgano del Poder Ejecutivo Federal que se encarga, al más alto nivel, de establecer las políticas relativas a la seguridad de la biotecnología respecto al uso de los Organismos Genéticamente Modificados (CONACYT, 2015a). La CIBIOGEM se encuentra integrada por los titulares de las Secretarías de:

Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA); Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT); Salud (SSA); Hacienda y Crédito Público (SHCP) y Economía, así como por el Director General del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Además, la CIBIOGEM se apoya en tres Órganos Técnicos y Consultivos: el Comité Técnico, el Consejo Consultivo Científico y el Consejo Consultivo Mixto (COFEPRIS, 2016).

A continuación se presentan las jurisdicciones, responsabilidades generales y los roles de cada secretaría de acuerdo con la LBOGM (Gutiérrez et.al, 2015):

**SAGARPA:** En el año 2009, se publicó el Acuerdo por el que se crea el Comité Técnico Científico de la SAGARPA en materia de OGM. En este acuerdo se delegan en el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) las facultades que otorga la Ley de Bioseguridad en materia de análisis de solicitudes para evaluar posibles riesgos a la sanidad vegetal.

**SEMARNAT:** Tiene competencia para realizar los análisis de riesgos e impacto a la diversidad biológica, asociados a las actividades que emplean OGM. Evalúa características en los OGM que no los haría aptos para consumo humano o animal, a los cuales les asigna valores cualitativos de riesgo potencial.

**SSA:** Realiza la evaluación de la inocuidad de los OGM conforme al Procedimiento de Evaluación de Inocuidad de Organismos Genéticamente Modificados destinados al uso o consumo humano, procesamiento de alimentos, biorremediación y salud pública. De acuerdo con la SSA, en la evaluación de alimentos GM se sigue el proceso “paso por paso” de análisis.

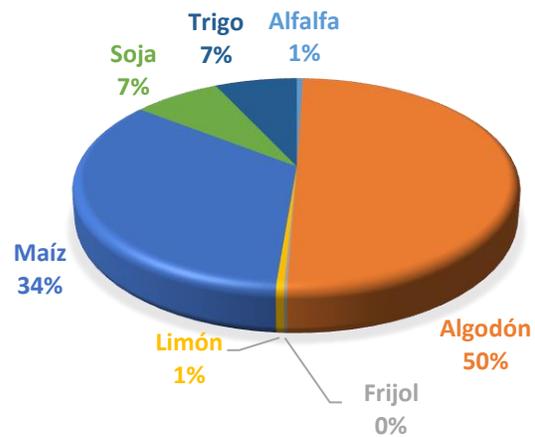
**SHCP:** Corresponde a la SHCP revisar en las aduanas de entrada al territorio nacional, que los OGM que se importen y destinen a su liberación al ambiente o a otras finalidades, cuenten con el permiso y/o la autorización respectiva; revisar que la documentación que acompañe a los OGM contenga los requisitos de identificación establecidos en las normas oficiales mexicanas, y participar en la expedición de normas oficiales mexicanas relativas al almacenamiento o depósito de OGM o de productos que los contengan en los recintos aduaneros del territorio nacional.

Se ha permitido la liberación al ambiente de cultivos como algodón, soya, trigo y maíz en sus diferentes tipos de solicitudes. Del 14 de Junio de 2005 a Diciembre de 2015 existieron en México un total de 590 permisos de liberación al ambiente de Organismos Genéticamente Modificados, de los cuales 466 fueron de solicitud experimental, 113 de solicitud piloto y 11 de solicitud comercial. En el Cuadro 9 y Figura 16 se presenta el total de los permisos en las mismas fechas, conforme la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM), por cultivo (CONACYT, 2015b).

**Cuadro 9. Permisos de liberación por cultivo (2005-2015) conforme la LBOGM.**

Cultivo	Total
Alfalfa	3
Algodón	296
Frijol	1
Limón mexicano	3
Maíz	202
Soya	44
Trigo	41
Total	590

Fuente: CONACYT, 2015b.



Fuente: CONACYT, 2015b.

**Figura 16. % Permisos de liberación por cultivo (2005-2015).**

Del año 1988 al 13 de Junio de 2005 se aprobaron 330 pruebas de campo conforme a la Ley Federal de Sanidad Vegetal (LFSV) y la LBOGM, en 26 organismos: alfalfa, algodón, *Arabidopsis*, arroz, *Bacillus thuringiensis*, calabacita, canola, cártamo, chile, clavel, jitomate, laurate canola de colza, limón, lino, maíz, melón, *Pseudomonas sp*, papa, papaya, piña, plátano, *Rhizobium etli*, soya, tabaco, tomate y trigo (CONACYT, 2015b).

#### 1.2.4 Debate sobre los alimentos genéticamente modificados

Uno de los grandes retos en materia de seguridad alimentaria con los que se enfrenta la sociedad del siglo XXI es la aparición de una gran variedad de nuevos alimentos entre los que se encuentran los alimentos genéticamente modificados; sin embargo, el futuro de estos alimentos va a depender de cómo sean percibidos por los consumidores y de la aceptación

de los mismos. Cuando se habla de los riesgos de los Organismos Genéticamente Modificados (OGM), se relacionan con temas de salud o medioambientales, donde diferentes posturas de los distintos grupos de opinión han dado lugar a grandes controversias en la opinión pública. En ocasiones, el debate ha surgido motivado por los distintos intereses enfrentados entre la industria agroalimentaria, los agricultores, los grupos ecologistas y las asociaciones de consumidores. Estos colectivos han utilizado estrategias de información poco transparentes lo que ha contaminado el debate social. Todos los alimentos transgénicos que han obtenido permiso de comercialización han sido sometidos a rigurosas evaluaciones de riesgo sanitario, dando como resultado que no existen datos científicos que indiquen que dichos alimentos, por el hecho de ser transgénicos, representen un riesgo para la salud del consumidor superior al que implica la ingesta del alimento convencional homólogo (Viedma et.al, 2014).

Existen diversos argumentos a favor y en contra de los organismos genéticamente modificados. Según Casquier y Rodomiro (2012) algunos de ellos son:

#### **Argumentos en contra**

**Religioso:** El hombre, a través de la ciencia, tiene ahora la posibilidad de controlar su evolución, crear vida, modificar la vida. Es por eso que no son pocos los que afirman que los científicos juegan a ser Dios.

**Sanitario:** Aborda temas como la inocuidad de los alimentos, la presencia de alérgenos, la creación de nuevas toxinas, el desarrollo de resistencia a antibióticos y los efectos en la salud a largo plazo.

**Poca difusión de la información científica:** Ante esto se aboga por el etiquetado de los productos que deriven de cultivos transgénicos. Se reclama que el etiquetado de los transgénicos es una cuestión importante. Solo así se podrán rastrear los posibles efectos de los alimentos transgénicos y además permitir que los consumidores decidan si quieren o no consumirlos.

**Económico:** Muchos consideran que es un riesgo que la biotecnología aplicada al mejoramiento de semillas esté en manos de grandes transnacionales. Para los que afirman esto, las semillas transgénicas, que en un inicio buscaban librar del problema el hambre a la humanidad, se han convertido en un negocio lucrativo para unas pocas empresas.

Antiguamente las semillas eran obtenidas por los agricultores por medio de su interacción con la naturaleza, ahora serían productos que habría que comprar a un determinado dueño.

### **Argumentos a favor**

**Ambiental:** Los que defienden su uso afirman que la adición de genes para desarrollar resistencia a insectos por parte de las plantas puede ayudar a preservar el medio ambiente al reducir el uso de pesticidas, herbicidas y plaguicidas.

**Aprovechamiento del suelo:** Mediante la manipulación genética se puede crear semillas que crezcan en tierras afectadas por la erosión, falta de agua o concentración de minerales que impiden la proliferación de cultivos naturales. Grandes zonas de cultivo, hoy desaprovechadas por estas razones, podrían ser utilizadas por cultivos que resistirían a condiciones ambientales desfavorables y a condiciones climáticas inestables.

**Nutrición:** Pueden emplearse en mejorar la nutrición humana, por ejemplo, para obtener micronutrientes.

**Difusión de información:** Nos encontramos en la sociedad de la información y el conocimiento, en donde la información científica está al alcance de todo aquel que quiera investigar; hay una gran cantidad de revistas científicas que abordan estos temas, pero la gente no busca la información, parece que le es suficiente lo que dijo el noticiero, la Internet o algún conocido y de ahí sacan sus conclusiones, las cuales no tienen ningún fundamento. El etiquetado se ve como una posible solución para que la gente al menos decida si consume los alimentos transgénicos o no. Pero, para poder elegir, la persona debe tener acceso a información veraz y no a medias verdades.

El conflicto que generan las aplicaciones de las modificaciones genéticas y sus implicaciones éticas actuales, requiere el comprender tanto los supuestos beneficios como los supuestos efectos adversos. Es importante reconocer que existen propósitos, desde el campo de la biotecnología, encaminados a dar soluciones a situaciones difíciles que enfrentan el ambiente y las sociedades humanas. Es el caso de la implementación de alteraciones genéticas en el sector de la medicina o de la agricultura, donde a través de esta tecnología se ha posibilitado el desarrollo de vacunas a distintas enfermedades, la síntesis de algunas enzimas o sustancias necesarias para la elaboración de algún producto o el proveer alimentos a millones de personas que poseen una marcada desigualdad social. Por el contrario, es necesario prever la probabilidad de secuelas que incidan de forma negativa

en el ambiente, y en los diversos organismos involucrados o la posibilidad de efectos secundarios en el desarrollo de tales prácticas e investigaciones biotecnológicas (Milena et.al, 2016).

### **1.2.5 Técnicas de análisis basadas en la detección de ADN**

Las moléculas de ADN han sido los compuestos diana para la identificación de especies debido a la alta estabilidad comparada con las proteínas, y también a su presencia en la mayoría de los tejidos biológicos, convirtiéndolas en las moléculas de elección para la diferenciación e identificación de componentes en los alimentos (Mafra et.al, 2008).

La detección del ADN en los alimentos comienza siempre con su extracción, que debe ser cuidadosamente optimizada. De hecho, los procedimientos de extracción y purificación del ADN genómico de los alimentos dependen fuertemente no sólo de la matriz, sino también de las transformaciones moleculares de los componentes alimentarios inducidos por las diferentes tecnologías aplicadas y de los eventuales aditivos presentes en los alimentos. Las altas temperaturas pueden dar lugar a xenobióticos que pueden interferir con el proceso de amplificación, el ADN puede ser parcialmente degradado (Marchelli et.al, 2012); a pesar de ello, aún es posible obtener fragmentos con suficientes diferencias de secuencia.

Para la detección de ADN se utilizan dos técnicas, la de Southern Blot y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

#### **Southern Blot**

Southern Blot y las técnicas de hibridación asociadas se describieron por primera vez por E.M. Southern en 1975. El desarrollo de esta técnica permitió obtener información sobre la organización física de secuencias únicas y multicopia en el genoma complejo de cualquier organismo por primera vez. El procedimiento de Southern Blot genómico implica cuatro etapas principales: digestión de restricción de ADN genómico (gADN) y electroforesis, transferencia a membrana, hibridación y detección.

El gADN de alta calidad se escinde en fragmentos de diversos tamaños mediante digestión por restricción. La cantidad de ADN necesita ser suficiente para detectar un gen de copia única y depende del tamaño del genoma del organismo, pero también está limitada por la cantidad que puede cargarse físicamente y correr sobre un gel de agarosa y depende

además de la sensibilidad de la detección técnica. La elección de la enzima de restricción también variará dependiendo del objetivo, pero la digestión completa es crucial para la interpretación exitosa de los patrones de bandas finales. Para el ADN de la planta, las enzimas que son sensibles a la metilación deben ser evitadas. El ADN fragmentado es entonces altamente separado por electroforesis. A continuación, el ADN es depurinado y desnaturalizado, se transfiere permanentemente a un soporte de membrana mediante transferencia capilar u otros métodos tales como transferencia seca o transferencia en vacío. La secuencia de interés puede entonces detectarse por hibridación molecular con una sonda marcada (Gebbie, 2014).

### **1.2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde (Serrato et.al, 2014). Esta es una técnica muy poderosa que ha sido desarrollada por K.B. Mullis en 1980s. PCR tiene una amplia gama de uso en la clonación de genes, la secuenciación, el diagnóstico de enfermedades bacterianas y virales, el diagnóstico de trastorno genético, y el estudio de la expresión génica, entre otros (Gupta et.al, 2017).

#### **1.2.6.1 Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método para amplificar un fragmento de ADN in vitro. Se basa en la capacidad de la enzima ADN polimerasa para sintetizar una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra de molde ofrecida. La PCR implica ciclos repetitivos de desnaturalización de la plantilla seguida de síntesis de ADN. Este proceso tan poco como una sola copia de un gen se puede amplificar a varios millones de copias en un corto período de tiempo. (Gupta et.al, 2017). En la PCR se simula en un tubo lo que ocurre durante la replicación celular (Serrato et.al, 2014). La reacción de PCR requiere un ADN molde, un par de cebadores específicos de la secuencia, una enzima polimerasa de ADN termoestable, nucleótidos, tampón de reacción y  $MgCl_2$ . La reacción se completa en un termociclador que puede ser programado para alterar la temperatura de la reacción cada pocos minutos para permitir la desnaturalización y la síntesis del ADN (Gupta et.al, 2017).

### 1.2.6.2 Etapas de la PCR

La amplificación por PCR se lleva a cabo en un termociclador usando un perfil de temperatura específico. Implica la desnaturalización inicial del ADN molde, seguido por un número específico de ciclos, incluyendo desnaturalización, alineación y elongación. El programa termina con un paso de elongación final extendido (Figura 17) (Knebelberger y Stöger, 2012):

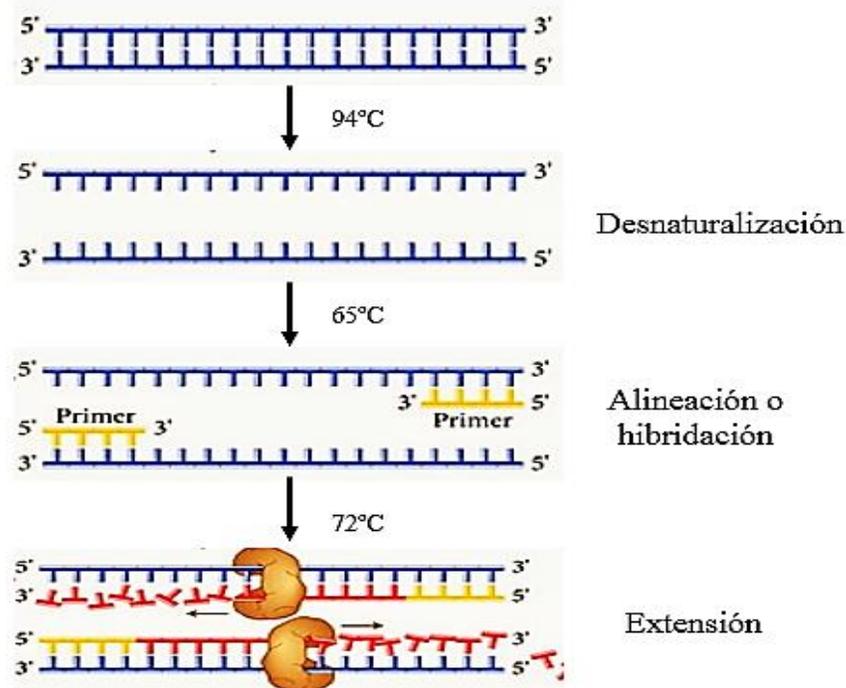


Figura 17. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa.

**Desnaturalización inicial:** Fusión del ADN bicatenario en dos plantillas monocatenarias interrumpiendo los enlaces de hidrógeno entre nucleótidos complementarios. Este paso se realiza normalmente a una temperatura de 94°C durante aproximadamente 5 minutos. Si el ADN molde es rico en GC, el intervalo debe extenderse hasta 10 minutos.

**Desnaturalización:** Similar a la desnaturalización inicial, este paso conduce a la fusión del ADN bicatenario en hebras sencillas para la alineación de cebadores. El ADN amplificado con alto contenido de GC necesita un tiempo de desnaturalización incrementado (3-4 minutos).

**Alineación o hibridación:** En la mayoría de los casos, las temperaturas entre 50 y 65°C permiten la alineación exitosa de cebadores a las hebras de ADN de plantilla única. Típicamente, la temperatura de alineación óptima ( $T_a$ ) es de 3-5°C por debajo de la temperatura de fusión de los cebadores ( $T_m$ ).  $T_m$  puede ser calculado por varios programas informáticos.

**Elongación o extensión:** En este paso, la ADN polimerasa sintetiza una nueva cadena de ADN complementaria a la cadena molde añadiendo dNTPs. La temperatura de elongación óptima depende de la propia polimerasa y de la longitud del fragmento deseado. En el caso de Taq Polimerasa, las tasas de síntesis más altas se pueden realizar a 70-75 ° C. Para fragmentos de hasta 1,000pb, el tiempo de elongación óptimo es entre 1 y 2 min.

**Elongación o extensión final:** Después del último ciclo de PCR, se realiza un alargamiento final para asegurar que todas las hebras de ADN únicas restantes se extienden completamente. Normalmente se realiza a 72 ° C durante 5-10 min.

### 1.2.6.3 Componentes de la PCR

Los componentes físicos primarios de la PCR son:

**1. ADN molde**, el ADN a partir del cual se quiere obtener una copia de un fragmento, es decir, el ADN que se quiere amplificar.

**2. Desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs)**, los componentes básicos del ADN. La enzima ADN polimerasa va a crear una cadena complementaria a la cadena molde mediante la incorporación de nucleótidos al extremo 3' libre del cebador que se ha unido a la cadena. Los cuatro nucleótidos son trifosfato de adenina (ATP), trifosfato de timina (TTP), trifosfato de guanina (GTP) y trifosfato de citosina (CTP) (Waters y Shapter, 2014). Para la PCR convencional, la concentración de dNTPs se mantiene equilibrada en proporciones equimolares, por ejemplo, 200µM cada dNTP (Kolmodin y Birch, 2002).

**3. ADN polimerasa**, la enzima que une los nucleótidos juntos creando una imagen especular de la plantilla. La Taq polimerasa es la más utilizada, es termoestable derivada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*. La estabilidad térmica permite que la enzima resista el calentamiento requerido para desnaturalizar el ADN y mantener la actividad a

temperaturas relativamente altas lo que mejora la especificidad del cebador (Waters y Shapter, 2014).

**4. Cebadores de oligonucleótidos**, son una secuencia de ADN complementaria al ADN diana ya la que la Taq polimerasa se une e inicia la síntesis de ADN (Waters y Shapter, 2014). Están diseñados para reconocer secuencias específicas del objetivo deseado, y definir la región amplificada. A las temperaturas apropiadas para la alineación, los dos cebadores se unen a extremos opuestos de esta región, cada uno de ellos a una cadena complementaria de ADN diana. Los cebadores deben diseñarse cuidadosamente para evitar la auto-alineación o la dimerización (Loeffelholz y Deng, 2013). Los cebadores tienen habitualmente 15-25 nucleótidos de longitud y tienen aproximadamente 50-60% de contenido de G+C (Kolmodin y Birch, 2002).

**5. Una solución tampón de fuerza iónica y pH apropiados.** La reacción se lleva a cabo en un tampón apropiado para el funcionamiento de la enzima polimerasa. Además, como cofactores de la polimerasa se añaden cationes divalentes, generalmente en forma de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ). La concentración óptima de tampón de PCR, la concentración de sal y el pH dependen de la ADN polimerasa en uso. El tampón de PCR para la Taq polimerasa consiste en KCl 50 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, a temperatura ambiente (Kolmodin y Birch, 2002).

#### 1.2.6.4 Aplicaciones de la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una tecnología revolucionaria que ha permitido el avance de diferentes campos científicos, siendo una herramienta fundamental en la investigación científica actual (Domingues, 2017). Existen diversas aplicaciones de la PCR, entre las más importantes se encuentran:

**Diagnóstico médico:** La PCR puede detectar e identificar bacterias y virus que causan infecciones como tuberculosis, clamidia, meningitis viral, hepatitis viral, VIH y muchos otros. Una vez que los cebadores están diseñados para una secuencia específica, la PCR puede detectar la presencia o ausencia del patógeno correspondiente en la sangre o los tejidos de un paciente (McIver et al., 2005).

**Pruebas genéticas:** La PCR también se utiliza para determinar si los pacientes portan una mutación genética que podría ser heredada por sus descendientes (por ejemplo, la mutación que causa la fibrosis quística) o presentar un riesgo de enfermedad en los propios pacientes. Una mutación en el gen BRCA1 que predispone a una mujer a cáncer de mama o de ovario. Partes del gen se amplifican por PCR y luego secuenciado para buscar mutaciones (Drouin et.al, 2007).

**Secuenciación del genoma:** El uso de cebadores aleatorios de todo el genoma de un organismo puede amplificarse en pedazos. Una vez amplificadas las piezas deben ser secuenciadas, y luego las secuencias solapadas pueden ser unidas por algoritmos informáticos para determinar la secuencia del genoma (Drouin et.al, 2007).

**Mutagénesis:** Las mutaciones pueden introducirse en secuencias de ADN copiadas en dos formas fundamentalmente diferentes durante el proceso de PCR. La mutagénesis dirigida al sitio permite al experimentador introducir una mutación en un lugar específico en la cadena de ADN. La mutación deseada se incorpora normalmente en los cebadores usados para el programa de PCR. Por el contrario, la mutagénesis aleatoria se basa en el uso de polimerasas propensas a errores en el proceso de PCR. En el caso de la mutagénesis aleatoria, la localización y la naturaleza de las mutaciones no pueden ser controladas. Una aplicación de la mutagénesis aleatoria es analizar las relaciones estructura-función en las proteínas (Drouin et.al, 2007).

**Análisis del ADN antiguo:** Usando PCR se hace posible analizar ADN que tiene miles de años. Las técnicas de PCR se han utilizado con éxito en animales y humanos (Drouin et.al, 2007).

**Alimentos:** Las técnicas analíticas utilizadas en la determinación del origen de un producto, en concreto la especie animal o vegetal a partir de la que ha sido elaborado, son de gran importancia en el ámbito de la seguridad y calidad alimentarias. Entre las técnicas biotecnológicas de reciente aplicación al análisis de los alimentos se encuentran las genéticas, que se basan en el reconocimiento específico de fragmentos de ácidos nucleicos presentes en los seres vivos. De estas técnicas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la más utilizada y permite obtener millones de copias de una secuencia específica de ADN mediante una simple reacción enzimática (Peña, 2014).

### 1.2.6.5 Ventajas y desventajas de la PCR

#### Ventajas

- Permite clonar ADN en pocas horas, utilizando equipos relativamente poco sofisticados. Esto supera ampliamente el tiempo requerido para la clonación en células, que suele ser de semanas, o incluso meses (Eduard, 2008).
- Puede amplificar incluso una sola copia de la secuencia objetivo presente en una muestra de ADN y generar millones de copias de esta secuencia (Herráez, 2012).
- Puede amplificar secuencias a partir de cantidades ínfimas de ADN diana (Eduard, 2008), incluso el ADN parcialmente degradado se puede usar con éxito para la PCR (Herráez, 2012).

#### Desventajas

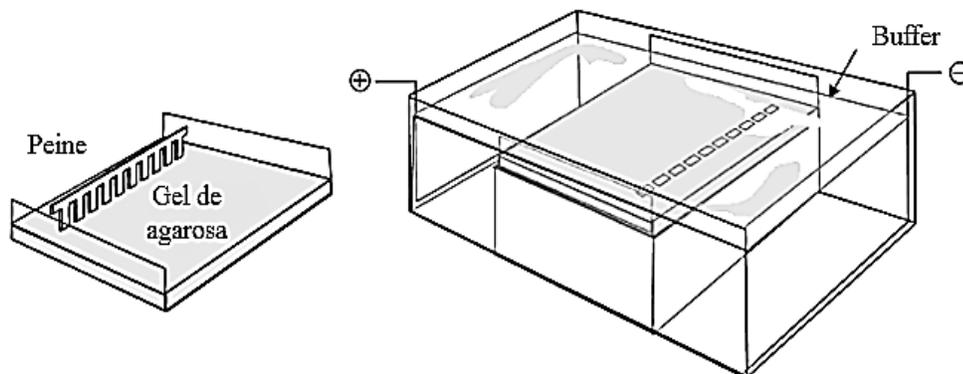
- La facilidad con que se amplifica el ADN exige evitar el peligro de contaminación (Herráez, 2012).
- La enzima ADN polimerasa puede generar errores al sintetizar la copia nueva.
- Costos que se requieren para llevar a cabo la técnica.
- Necesidad de estandarizar la técnica para el organismo o la técnica de interés, lo cual puede ser tardado y costoso (Serrato et.al, 2014).

### 1.2.6.6 Análisis del producto de una PCR

Cuando se ha generado ADN suficiente mediante PCR, la muestra puede analizarse mediante electroforesis en gel de agarosa (Ismail et.al, 2010). Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de ADN de diferente tamaño van a emigrar de forma distinta. Utilizando geles con diferentes concentraciones porcentuales de agarosa, se pueden resolver diferentes tamaños de fragmentos de ADN. Concentraciones más altas de agarosa facilitan la separación de moléculas de ADN más pequeñas, mientras que concentraciones de agarosa más bajas permiten la resolución de moléculas de ADN más grandes (Padilla, 2011).

El material necesario para la electroforesis en gel de agarosa consiste en una caja de gel de electroforesis y una bandeja de colada de gel, peines de gel (utilizados para fabricar

pozos de carga o ranuras) (Figura 18), un horno de microondas o una placa caliente y una fuente de alimentación de electroforesis (Podzorski et.al, 2016)



Fuente: Westermeier, 2016.

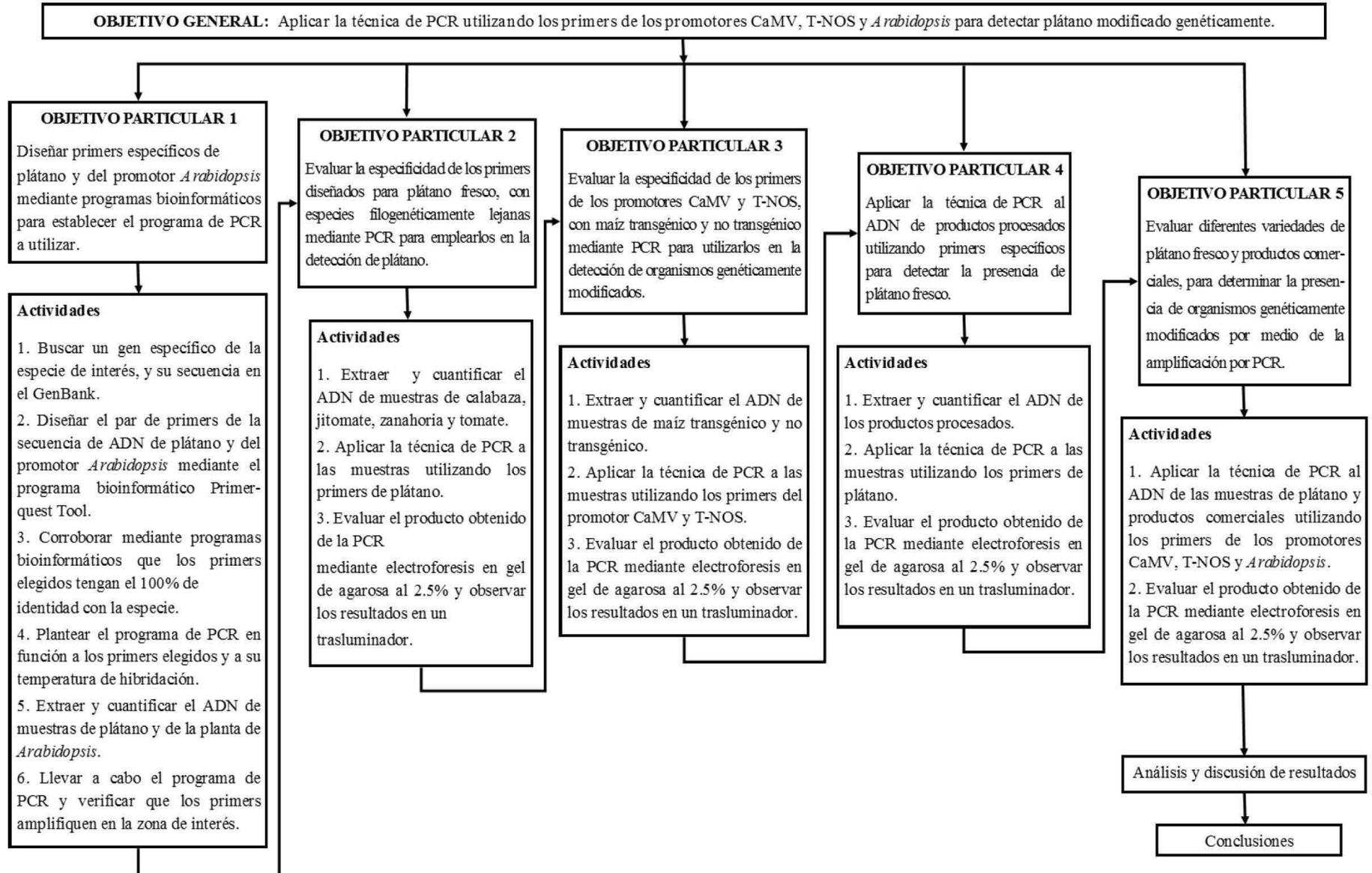
**Figura 18. Material necesario para electroforesis en gel de agarosa.**

Los dos tampones de electroforesis más utilizados (tampones en ejecución) para electroforesis en gel de agarosa son Tris-acetato con EDTA (TAE) y Tris-borato con EDTA (TBE). El pH de ambos tampones es mayor que 7, lo que significa que el esqueleto de fosfato del ADN tiene una carga neta negativa y migra hacia el ánodo durante la electroforesis. Antes de añadir muestras de ADN a un gel, se añade tampón de carga para aumentar la densidad de la muestra para que se hunde en el fondo del pozo y para añadir color a la muestra. A su vez, este color sirve como marcador para simplificar el proceso de carga y permitir que se monitorice la electroforesis de progreso, basándose en el movimiento del colorante a través del gel (Podzorski et.al, 2016).

Una vez completada la electroforesis, el ADN en el gel se visualiza mediante tinción con un colorante fluorescente (por ejemplo, bromuro de etidio, GelRed, SYBR green), seguido de iluminación con luz UV (Padilla, 2011). El bromuro de etidio se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos y permite la detección muy conveniente de los fragmentos de ADN en los geles (Demeke y Jenkins, 2010). Si en dicha electroforesis se aplican marcadores de peso molecular (fragmentos de ADN de tamaño conocido) se puede calcular el tamaño aproximado del ADN en estudio (Padilla, 2011).

## CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 2.1 Cuadro metodológico



### **2.1.1 Descripción del cuadro metodológico**

A continuación se describen los objetivos y las actividades que se llevaron a cabo para la realización del proyecto:

#### **Objetivo General**

Aplicar la técnica de PCR utilizando los primers de los promotores CaMV, T-NOS y *Arabidopsis* para detectar plátano modificado genéticamente.

#### **Objetivo Particular 1**

Diseñar primers específicos de plátano y del promotor *Arabidopsis* mediante programas bioinformáticos para establecer el programa de PCR a utilizar.

#### **Actividades:**

1. Buscar un gen específico de la especie de interés, y su secuencia en el GenBank.
2. Diseñar el par de primers de la secuencia de ADN de plátano y del promotor *Arabidopsis* mediante el programa bioinformático Primerquest Tool.
3. Corroborar mediante programas bioinformáticos que los primers elegidos tengan el 100% de identidad con la especie.
4. Plantear el programa de PCR en función a los primers elegidos y a su temperatura de hibridación.
5. Extraer y cuantificar el ADN de muestras de plátano y de la planta de *Arabidopsis*.
6. Llevar a cabo el programa de PCR y verificar que los primers amplifiquen en la zona de interés.

#### **Objetivo Particular 2**

Evaluar la especificidad de los primers diseñados para plátano fresco, con especies filogenéticamente lejanas mediante PCR para emplearlos en la detección de plátano.

#### **Actividades:**

1. Extraer y cuantificar el ADN de muestras de calabaza, jitomate, zanahoria y tomate.
2. Aplicar la técnica de PCR a las muestras utilizando los primers de plátano.
3. Evaluar el producto obtenido de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y observar los resultados en un trasluminador.

### **Objetivo Particular 3**

Evaluar la especificidad de los primers de los promotores CaMV y T-NOS, con maíz transgénico y no transgénico mediante PCR para utilizarlos en la detección de organismos genéticamente modificados.

#### **Actividades**

1. Extraer y cuantificar el ADN de muestras de maíz transgénico y no transgénico.
2. Aplicar la técnica de PCR a las muestras utilizando los primers del promotor CaMV y T-NOS.
3. Evaluar el producto obtenido de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y observar los resultados en un trasluminador.

### **Objetivo Particular 4**

Aplicar la técnica de PCR al ADN de productos procesados utilizando primers específicos para detectar la presencia de plátano fresco.

#### **Actividades**

1. Extraer y cuantificar el ADN de los productos procesados.
2. Aplicar la técnica de PCR a las muestras utilizando los primers de plátano.
3. Evaluar el producto obtenido de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y observar los resultados en un trasluminador.

### **Objetivo Particular 5**

Evaluar diferentes variedades de plátano fresco y productos comerciales, para determinar la presencia de organismos genéticamente modificados por medio de la amplificación por PCR.

#### **Actividades**

1. Aplicar la técnica de PCR al ADN de las muestras de plátano y productos comerciales utilizando los primers de los promotores CaMV, T-NOS y *Arabidopsis*.
2. Evaluar el producto obtenido de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y observar los resultados en un trasluminador.

## 2.2 Materiales y métodos

### 2.2.1 Material Biológico

Para poder realizar lo establecido en el cuadro metodológico (2.1) se requirió de diversas muestras biológicas. Se trabajó con 4 variedades de plátano fresco (tabasco, macho, morado y dominico) obtenidas de 3 lugares distintos cada una, y con 12 productos comerciales que contienen plátano, entre los que se encuentran: alimentos para lactantes, plátanos fritos, galletas y avena. En el Cuadro 10 y 11 se muestra la nomenclatura utilizada para la identificación de estas muestras en el proyecto y algunas generalidades.

Así mismo, fue necesario la utilización de otras muestras que sirvieron para corroborar la especificidad de los primers de plátano (calabaza, jitomate, zanahoria y tomate) y para utilizarlas como controles positivos al momento de realizar la PCR (maíz transgénico, canola transgénica y semillas de *Arabidopsis*).

**Cuadro 10. Muestras de variedades de plátano fresco.**

Nomenclatura	Variedad de plátano	Procedencia
T <sub>1</sub>	Tabasco	Mercado local (Coacalco de Berriozábal)
T <sub>2</sub>	Tabasco	Wal-Mart (Coacalco de Berriozábal)
T <sub>3</sub>	Tabasco	Soriana (Coacalco de Berriozábal)
M <sub>1</sub>	Macho	Mega Comercial (Cuautitlán Izcalli)
M <sub>2</sub>	Macho	Wal-Mart (Coacalco de Berriozábal)
M <sub>3</sub>	Macho	Estado de Veracruz
Mo <sub>1</sub>	Morado	Mega Comercial (Cuautitlán Izcalli)
Mo <sub>2</sub>	Morado	Estado de Tabasco
Mo <sub>3</sub>	Morado	Mercado local (Cuautitlán Izcalli)
D <sub>1</sub>	Dominico	Mega Comercial (Cuautitlán Izcalli)
D <sub>2</sub>	Dominico	Estado de Chiapas
D <sub>3</sub>	Dominico	Estado de Campeche

**Cuadro 11. Muestras de productos comerciales que contienen plátano.**

Nomenclatura	Producto	Marca	Lote	Caducidad	Contenido neto	Precio
P <sub>1</sub>	Puré de frutas (manzana y plátano)	Buddy Fruits	USA 32209:021 L3	18/02/17	90g	\$19.19
P <sub>2</sub>	Plátanos con chile	Tanitos	20A7	17/04/17	190g	\$15.00
P <sub>3</sub>	Panecillos con plátano	Fiber Cookies	20116	18/04/17	190g	\$35.50
P <sub>4</sub>	Chips de plátano	Turbana	C11	09/02/18	198.4g	\$39.90
P <sub>5</sub>	Papilla de plátano (Etapa 1)	Gerber	52144511 C2	08/18	71g	\$9.00
P <sub>6</sub>	Papilla de plátano (Etapa 2)	Gerber	62254511 B3	08/18	113g	\$11.40
P <sub>7</sub>	Papilla de manzana, plátano, fresa y frambuesa	Heinz	M46285	11/10/17	113g	\$8.00
P <sub>8</sub>	Plátanos fritos	Sunbites	MX3A55	08/01/2017	28g	\$16.00
P <sub>9</sub>	Alimento para lactantes orgánico	Gerber	61884511 K2	04/17	110g	\$18.00
P <sub>10</sub>	Colado de plátano	Heinz	MX3 L: 6J24	24/09/17	113g	\$8.00
P <sub>11</sub>	Plátanos deshidratados	Farm Nuts	1216	20/09/17	80g	\$34.50
P <sub>12</sub>	Avena en polvo para licuado	Avena Rivero	16386	29/12/17	400g	\$21.50

### 2.2.2 Diseño de primers

Los primers que amplifican para plátano y el promotor *Arabidopsis* fueron diseñados mediante el programa Primerquest Tool. Se buscaron y corroboraron las secuencias de los

primers en la base de datos bioinformático GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para el plátano (*Musa spp.*) los primers se encuentran en el gen “MSAP-RGA” y para el promotor *Arabidopsis* en el gen “AtSUC2”. La metodología detallada del diseño de primers se encuentra en el Anexo 1.

Los primers fueron elegidos de acuerdo a que tuvieran una longitud entre 18 y 25pb, con una temperatura de hibridación igual o que no defiriera entre más de 2°C y con un contenido de G-C del 50%.

### 2.2.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras de plátano fresco y productos comerciales se llevó a cabo basada en el protocolo descrito por Sambrook (2001) y Cheng et.al (2003) con modificaciones en ambas metodologías. Los dos protocolos se describen posteriormente de manera detallada.

#### Reactivos

- ☐ Agua desionizada o bidestilada con pH de 7
- ☐ Alcohol isopropílico
- ☐ Cloroformo – alcohol isomílico (24:1)
- ☐ CTAB (hexadecil trimetil bromuro de amonio)
- ☐ Enzima proteinasa K
- ☐ Etanol absoluto
- ☐ Etanol frío al 70%
- ☐ Éter saturado- agua
- ☐ Mezcla fenol–cloroformo–alcohol isoamílico
- ☐ NaCl 50M
- ☐ Nitrógeno líquido
- ☐ Solución de lisis (Tris base 50mM, NaCl 250mM, SDS 0.3%, EDTA 0.1M)

#### Materiales y equipo

- ☐ Agitador Vortex *Genie* K-550-G
- ☐ Balanza analítica electrónica, Cole parmer PR410 Equipar
- ☐ Espátula
- ☐ Kit de micropipetas marca *Rainin* de volúmenes desde 0.5µI hasta 1000µL

- Microcentrífuga, Minispin Plus Eppendorf 14 000 rpm
- Mortero con pistilo
- Puntas para micropipetas esterilizadas
- Tubos de eppendorf esterilizados
- Termoblock, Thermomixer compact Eppendorf

### **Metodología para la extracción de ADN de plátano (Sambrook, 2001 y Cheng et.al, 2003)**

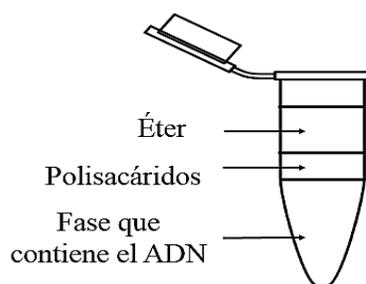
Se pulverizó cierta cantidad de muestra en el mortero con nitrógeno líquido. Se pesaron 300µg de muestra pulverizada en un tubo eppendorf y se agregaron 1000µL de solución de lisis y 30µL de CTAB. Se agitó con el vortex para homogenizar la muestra y se incubó en el Termoblock a 65°C por 1 hora con inversión ocasional, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió 500µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se agitó suavemente cada tubo manualmente por un tiempo de 3 minutos. Se centrifugó a 10,000rpm durante 10 minutos y se procedió a recuperar de manera cuidadosa la fase acuosa superior que contiene el ADN transfiriéndola a un nuevo tubo eppendorf.

Se agregó 1000µL de alcohol isopropílico para precipitar el ADN y se dejó en el congelador por 15 minutos, al término del tiempo se centrifugó a 12,000rpm durante 10 minutos procediendo a decantar el alcohol y a realizar un lavado agregando 500µL de etanol absoluto. Se realizó una mezcla manual por unos segundos invirtiendo el tubo suavemente y se centrifugó a 10,000rpm durante 10 minutos. Se formó una pastilla de color blanco, por lo cual se decantó de manera cuidadosa y se dejó secar en el Termoblock a 38°C. Se agregó 300µL de agua y se sometió a vortex hasta que se disolviera la pastilla, se dejó incubar durante media hora en el Termoblock con agitación a 37°C.

Posteriormente se agregó 300µL más de agua y 500µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se realizó una mezcla con el vortex para que pudieran interactuar los componentes y se centrifugó a 8,000rpm durante 10 minutos. Se añadió 40µL de NaCl 50M y 160µL de éter saturado con agua, inmediatamente la fase acuosa se volvió lechosa, por lo cual se agitó un minuto de manera suave y se centrifugó a 8,000rpm durante 10 minutos. Se formaron 3 fases en el tubo: la primera que contiene el éter, la segunda los polisacáridos y

la tercera el ADN (Figura 19), por ello se transfirió esta última fase a otro tubo eppendorf cuidando de no trasladar algún residuo de las otras dos fases.

El tubo eppendorf con el residuo fue desechado y al que contenía el ADN se le agregó 500µL de alcohol isopropílico, se dejó 15 minutos en el congelador y se centrifugó a 10,000rpm durante 10 minutos, el alcohol fue decantado para realizar un último lavado agregando 500µL de etanol al 70%. Finalmente se dejó 5 minutos en el congelador y se centrifugó a 10,000rpm durante 2 minutos procediendo a decantar y dejar secar en el Termoblock a 37°C. Se adicionó 50µL de agua desionizada a cada tubo para re suspender el ADN y se agitó de manera cuidadosa hasta su completa disolución. La muestra de ADN se guardó y conservó para poder ser cuantificada posteriormente.



*Figura 19. Esquema representativo de las fases formadas en la extracción de ADN al utilizar éter saturado con agua y NaCl 50 M.*

### **Metodología para la extracción de ADN (Jitomate, zanahoria, tomate y calabaza) (Sambrook, 2001)**

Primero se procedió a realizar la disgregación del tejido, para ello se trituró cierta cantidad de muestra con ayuda del mortero. Se pesaron 125µg en un tubo eppendorf y se agregaron 1250µL de solución de lisis, la muestra fue homogeneizada con el vortex y se le adicionó 7µl de enzima proteinasa K. Se incubó en el Termoblock con agitación a 50°C durante 2 horas, después se elevó la temperatura a 60°C y se mantuvo así durante 1 hora para desactivar la enzima.

Para la extracción de proteínas y polisacáridos de ADN se agregó 250µL de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se agitó de una manera suave de tal manera que los componentes pudieran interactuar entre sí. Se centrifugó cada muestra en la microcentrífuga a 10,000rpm durante 10 minutos y se recuperó de manera cuidadosa la fase acuosa superior que contiene el ADN transfiriéndola a un nuevo tubo eppendorf.

Para finalizar, se llevó a cabo la precipitación del ADN, para ello se añadió 1500 $\mu$ L de etanol frío al tubo que contenía la fase acuosa recuperada y se volvió a centrifugar a 10,000rpm durante 10 minutos. Se decantó el etanol y se dejó secar el ADN en el Termoblock a 37°C durante 1 hora (el ADN se pudo observar pegado en la parte inferior del tubo). Se adicionó 50 $\mu$ L de agua desionizada a cada tubo para re suspender el ADN y se agitó de manera cuidadosa hasta su completa disolución. La muestra de ADN se guardó y conservó para poder ser cuantificada posteriormente.

#### **2.2.4 Cuantificación de la concentración y pureza del ADN**

El método espectrofotométrico no sólo puede determinar la concentración de ácido nucleico, sino también estimar la pureza mediante la determinación de la relación de absorción de UV a 260nm y 280nm (A260/A280). La relación para el ADN puro es 1.8 y para el ARN es 2.0. Si la proporción de ADN es superior a 1.8, hay ARN residual en la solución. Si hay fenol o proteína residual, la relación podría disminuir por debajo de 1.8 (Xu, 2016).

#### **Reactivos**

- ☐ Agua desionizada o bidestilada con pH de 7
- ☐ Muestras de ADN extraídas del material biológico

#### **Materiales y equipo**

- ☐ Kit de micropipetas marca *Rainin* de volúmenes desde 0.5 $\mu$ L hasta 1000 $\mu$ L
- ☐ Nanoespectrofotómetro, *Accesolab* Nano Drop ND-1000.
- ☐ Puntas para micropipetas esterilizadas
- ☐ Tubos de eppendorf esterilizados

#### **Metodología**

El ADN extraído fue cuantificado en un Nanoespectrofotómetro, Nano Drop ND-1000. Se encendió el Nano Drop y la computadora a la que se encuentra conectado, después se colocaron 2 $\mu$ L de agua libre de nucleasas para calibrar e iniciar el equipo. Se utilizó el programa “Nanodrop” en la opción de ácidos nucleicos. Antes de comenzar a cuantificar las muestras de ADN se colocaron otros 2 $\mu$ L de agua libre de nucleasas que sirvieron como blanco y se verificó que todos los valores dieran cero, lo que indicó que el equipo estaba

listo para realizar las mediciones de las muestras.

Se limpió el sensor con ayuda de un pañuelo y se colocaron 2 $\mu$ L de la muestra de ADN a cuantificar, se corrió el programa mostrando los resultados en la computadora y se registraron los valores de la relación 260/280 y de la concentración de ADN expresada en ng/ $\mu$ l.

### 2.2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

#### Reactivos

- ☐ Agua desionizada o bidestilada con pH de 7
- ☐ Muestras cuantificadas de ADN extraídas del material biológico
- ☐ Kit para PCR, *Promega*:  
PCR Master Mix (50 unidades de Taq DNA polimerasa, 400 $\mu$ M de cada dNTP's y 3mM de MgCl<sub>2</sub>).
- ☐ Kit para PCR directa, *Thermo Scientific Phire Plant Direct*:  
2x Phire Plant PCR Buffer (dNTP's y 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>), Phire Hot Start II DNA Polymerase y Buffer de dilución.
- ☐ Primers de plátano y de promotores CaMV, T-NOS y *Arabidopsis*.

#### Materiales y equipo

- ☐ Kit de micropipetas marca *Rainin* de volúmenes desde 0.5 $\mu$ l hasta 1000 $\mu$ L
- ☐ Puntas para micropipetas esterilizadas
- ☐ Termociclador
- ☐ Tubos de eppendorf esterilizados

#### Metodología de PCR

##### Preparación de la reacción

Para llevar a cabo la preparación de la reacción fue indispensable solubilizar los primers a una concentración de 25mM. Se utilizó el Kit de PCR *Promega* para realizar PCR a las muestras de plátano fresco utilizando los primers de plátano y verificar que en todas las variedades amplificará la zona de interés. Los primers para la identificación de plátano fueron diseñados mediante programas bioinformáticos. En el Cuadro 12 se muestran las secuencias de 5' a 3' con un tamaño de amplificado de 234pb.

*Cuadro 12. Primers de plátano.*

Primer	Secuencia (5' → 3')	Longitud	Tamaño del amplificado
Plátano Frontal	GACTTCCTGAAACGCCAAAC	20pb	234pb
Plátano Reverso	AGACTGCGTACCAATTCCC	19pb	

La preparación de la reacción se realizó en un tubo eppendorf esterilizado utilizando los componentes que se muestran en el Cuadro 13, excepto el ADN.

*Cuadro 13. Componentes para preparar la reacción de PCR.*

Componente	Proporción por muestra
Kit Master Mix	12.5µL
Primer F	0.5µL
Primer R	0.5µL
Agua libre de nucleasas	Necesaria para complementar volumen final de 24µL
ADN	1-3µL

Debido a que la proporción es por muestra fue necesario multiplicar cada valor por el número de muestras a preparar. Una vez preparada la reacción se mezcló un instante en la microcentrífuga y se dividió el volumen final agregando 24µL de reacción en cada tubo eppendorf previamente etiquetado. Posteriormente se agregó a cada tubo la cantidad de ADN correspondiente, en el caso del blanco se agregó agua libre de nucleasas. Se mezclaron los tubos en la microcentrífuga y se llevaron al Termociclador.

### **Etapas y ciclos de la reacción**

Para determinar el programa de PCR a utilizar se tomó de base el programa establecido por Huerta (2016) para la identificación de papaína con un  $T_m$  de 54°C. A pesar de que la temperatura de hibridación coincide con la calculada para los primers de plátano (Anexo 2), no permitió la correcta amplificación de la zona de interés, por lo que se aumentó a 56°C. En la Figura 20 se muestra el programa de PCR utilizado.

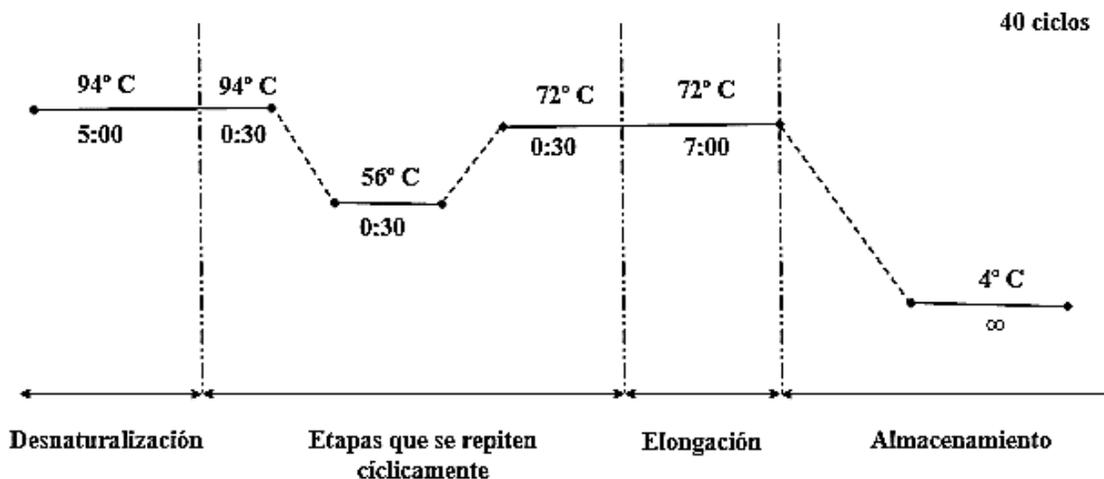


Figura 20. Programa de PCR para la detección de plátano.

### Metodología de PCR directa

#### Preparación de la reacción

La PCR directa se llevó a cabo utilizando el Kit de PCR *Thermo Scientific Phire Plant Direct* para corroborar que los productos comerciales contienen plátano y para detectar plátano genéticamente modificado con los promotores CaMV, T-NOS y *Arabidopsis*.

Para la selección de primers que amplifican la zona del promotor CaMV y el terminador T-NOS se utilizaron unos que anteriormente han sido probados en diversos trabajos y los cuales se encuentran reportados en Karamollaoglu et.al (2009) (Cuadro 14). Para el promotor CaMV 35S del virus mosaico de la coliflor los primers seleccionados se ubican en el gen “CaMVgp7” y para el terminador T-NOS de *Agrobacterium tumefaciens* en el gen que codifica la nopalina sintetasa. Los primers fueron previamente solubilizados a 25mM.

Cuadro 14. Primers de los promotores CaMV y T-NOS.

Primer	Secuencia (5' → 3')	Tamaño del amplificado
CaMV Frontal	GCTCCTACAAATGCCATCA	195pb
CaMV Reverso	GGATAGTGGGATTGTGCGTC	
T-NOS Frontal	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	180pb
T-NOS Reverso	TTATCCTAGTTTGCGCGCTA	

Los primers del promotor *Arabidopsis* fueron diseñados mediante programas bioinformáticos. En el Cuadro 15 se muestran las secuencias utilizadas con un tamaño de amplificado de 679pb.

**Cuadro 15. Primers de promotor de *Arabidopsis*.**

Primer	Secuencia (5' → 3')	Longitud	Tamaño del amplificado
<i>Arabidopsis</i> Frontal	GCGCAGTACAAATAAACAGTGG	22pb	679pb
<i>Arabidopsis</i> Reverso	TCCGAAGAGGAGACAGTGAA	20pb	

La preparación de la reacción se llevó a cabo con el mismo procedimiento que se mencionó anteriormente para PCR, la enzima al igual que el ADN se agregó al final a cada tubo. Los componentes para preparar la reacción a un volumen de 21µL se muestran en el Cuadro 16.

**Cuadro 16. Componentes para preparar la reacción de PCR directa.**

Componente	Proporción por muestra
2x Phire Plant PCR Buffer	10µL
Primer Frontal	0.5µL
Primer Reverso	0.5µL
Phire Hot Start II DNA Polymerase	0.4µL
AND	0.5µL
Agua libre de nucleasas	9.1µL

Al llevar a cabo una PCR directa no es necesario realizar una previa extracción de ADN a las muestras; sin embargo, para asegurar la presencia de material genético se decidió utilizar las muestras de ADN extraídas anteriormente.

A la planta de *Arabidopsis* que se utilizó como control positivo no se le realizó extracción de ADN, por lo cual se llevó a cabo un pretratamiento antes de la PCR, se diluyó cierta cantidad de muestra en 20µL de buffer de dilución que forma parte del Kit, se le dio vortex y se dejó reposar la muestra durante 10 minutos, al concluir el tiempo de reposo la muestra pudo ser utilizada para preparar la reacción.

### **Etapas y ciclos de la reacción**

#### ***Arabidopsis***

El programa de PCR que se utilizó fue el sugerido por el Kit modificando la temperatura de hibridación de acuerdo a la secuencia de los primers de *Arabidopsis*, la T<sub>m</sub> fue calculada con fórmula (Anexo 2) y en la página [www.thermoscientific.com/pcrwebtools](http://www.thermoscientific.com/pcrwebtools), resultando

de 57 y 63.1°C respectivamente, se fue variando la temperatura hasta que logró amplificar a 61.1°C a las condiciones establecidas (Figura 21).

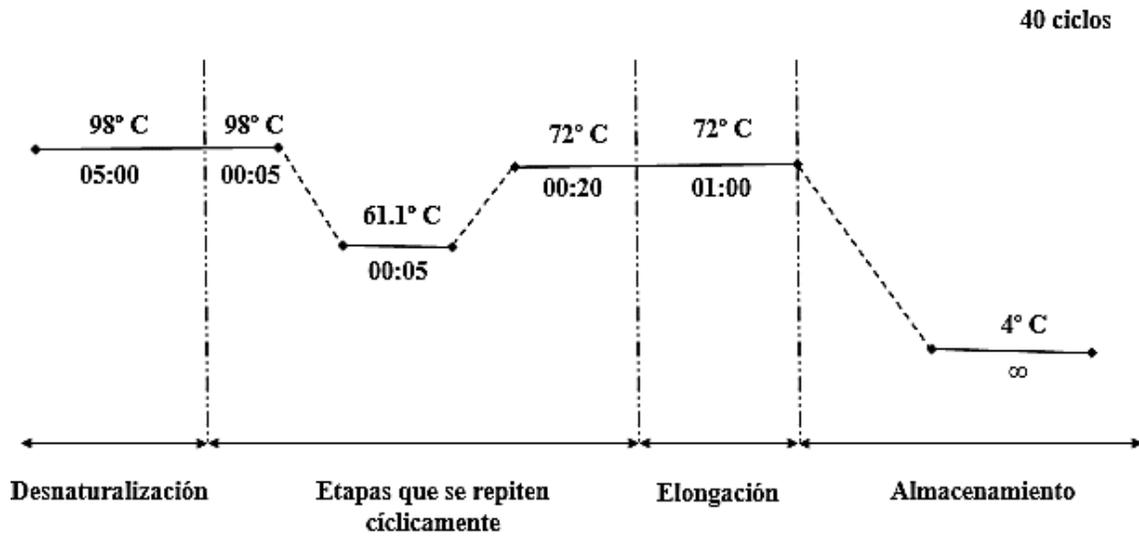


Figura 21. Programa de PCR directa para el promotor Arabidopsis.

### CaMV y T-NOS

Las condiciones de PCR directa para los promotores CaMV y T-NOS fueron establecidas de acuerdo al protocolo del Kit de PCR *Thermo Scientific Phire Plant Direct*. Para la detección de plátano en productos comerciales se utilizó el programa de PCR mostrado en la Figura 20 con una temperatura de hibridación de 62°C.

En la Figura 22 se muestran las condiciones de PCR directa utilizadas para la detección de plátano genéticamente modificado con los promotores CaMV Y T-NOS.

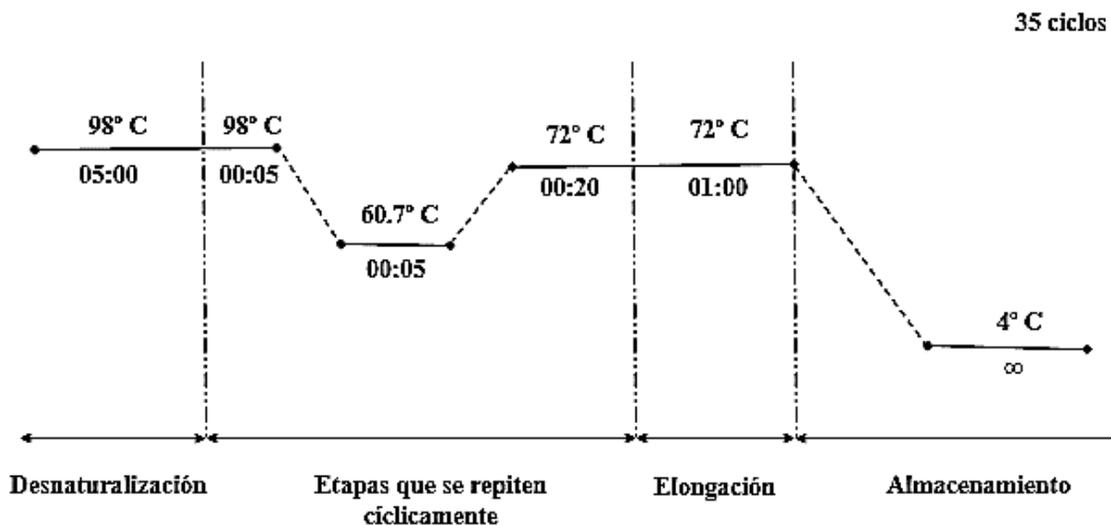


Figura 22. Programa de PCR directa para los promotores CaMV y T-NOS.

### 2.2.6 Electroforesis en gel de agarosa

Una vez concluida la PCR se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2.5% para poder observar los resultados obtenidos.

#### Reactivos

- ☐ Agarosa
- ☐ Bromuro de Etidio (BrET)
- ☐ Marcador de peso molecular, *Promega*
- ☐ Muestras resultantes de las PCR
- ☐ Tinte cargador Azul/Naranja 6X, *Promega*
- ☐ Tris Acetato y EDTA (TAE) 1X como solución buffer, pH=8

#### Materiales y equipo

- ☐ Agitador Vortex *Genie K-550-G*
- ☐ Balanza analítica electrónica, Cole parmer PR410 Equipar
- ☐ Cámara y cassette de electroforesis horizontal
- ☐ Equipo para fotografía de luz UV
- ☐ Fuente de poder, Bio-Rad PowerPac 200
- ☐ Horno de microondas
- ☐ Kit de micropipetas marca *Rainin* de volúmenes desde 0.5 $\mu$ I hasta 1000 $\mu$ L
- ☐ Parafilm
- ☐ Puntas para micropipetas esterilizadas
- ☐ Trasluminador
- ☐ Tubos de eppendorf esterilizados

#### Metodología

##### Preparación del gel de agarosa

Se preparó el gel al 2.5% de agarosa con 50mL de TAE 1X. Para lograr disolver completamente la agarosa se calentó la disolución en un horno de microondas durante 1 minuto por intervalos de 20 segundos evitando la ebullición y evaporación de la mezcla. Una vez disuelta la agarosa se dejó enfriar aproximadamente a temperatura ambiente y se añadió una gota de Bromuro de Etidio procediendo a mezclar. Se cerraron las aperturas

laterales del soporte de la cámara de electroforesis y de manera cuidadosa se vertió la mezcla impidiendo la formación de burbujas. Después de verter toda la mezcla inmediatamente se colocó el peine y se esperó a que la agarosa gelificara para poder retirarlo. Se colocó el soporte con el gel en la cámara de electroforesis y se agregó buffer TAE 1X hasta que el gel quedara cubierto.

### **Carga y corrida del gel**

Para llevar a cabo la carga del gel se colocó en un trozo de parafilm: 3 $\mu$ L de Bromuro de Etidio (BrET), 3 $\mu$ L de colorante azul/naranja y 5 $\mu$ L de muestra resultante de PCR o blanco. Con ayuda de una micropipeta se mezclaron todos los elementos y se tomó cada una de las muestras puestas en el parafilm para colocarla en el pocillo correspondiente, en el primer pocillo se colocó 3 $\mu$ L de marcador de peso molecular y en los siguientes las muestras. Ya cargadas todas las muestras se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se encendió, enseguida se activó el campo eléctrico a 60V. La corrida finalizó hasta que el colorante se visualizó aproximadamente a 3/4 partes del gel.

### **Visualización de fragmentos**

Una vez finalizada la corrida se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se colocó dentro del trasluminador de manera centrada. Se encendió el trasluminador y el equipo para fotografía de luz UV procediendo a enfocar y fotografiar el gel.

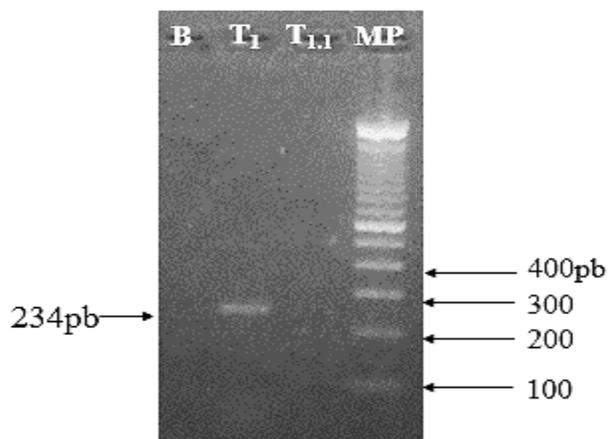
## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Objetivo particular 1

**Diseñar primers específicos de plátano y del promotor *Arabidopsis* mediante programas bioinformáticos para establecer el programa de PCR a utilizar.**

Se extrajo ADN de dos muestras de plátano tabasco procedente de un mercado local y se cuantificó en el Nanodrop, la muestra 1 presentó una pureza de 1.82 y una concentración de 440.8ng/μL y la muestra 2 una pureza de 1.78 y una concentración de 462.1ng/μL. Teóricamente la técnica de PCR requiere una cantidad suficiente de 60ng/μL para realizarse de manera adecuada; sin embargo, debido a la complejidad de la extracción de ADN de plátano se optó por dejar concentrada la muestra 1 y diluir la muestra 2 con agua libre de nucleasas obteniendo como resultado una concentración de ADN de 61.1ng/μL y una relación 260/280 de 1.79.

En la Figura 23 se muestran los resultados de la PCR llevada a cabo con una temperatura de hibridación de 56°C, en el pocillo T<sub>1</sub> se colocó muestra de ADN concentrada y se puede observar un amplificado de 234pb que corresponde a la zona de interés; en cambio, en el pocillo T<sub>1.1</sub> no se observa alguna banda, esto puede ser debido a que el material genético no fue suficiente para que la PCR pudiera realizarse correctamente.



**Figura 23. Gel de agarosa al 2.5% a 60 V para la amplificación de una muestra de plátano fresco (T<sub>1</sub>) utilizando primers de plátano. (B) Blanco; (T<sub>1</sub>) Muestra de ADN concentrada de plátano fresco; (T<sub>1.1</sub>) Muestra de ADN diluida de plátano fresco; (MP) Marcador de peso molecular 100pb.**

A pesar de que las muestras no presentan contaminación al no existir algún amplificado en el carril B la prueba se repitió para descartar la posibilidad de un error experimental pero se obtuvo el mismo resultado. Lo anterior indica que los primers diseñados de plátano hibridan a las condiciones que se muestran en la Figura 20 a una concentración aproximada de 400ng/μL; sin embargo, con la finalidad de verificarlo fue importante realizar PCR a las demás muestras de plátano fresco.

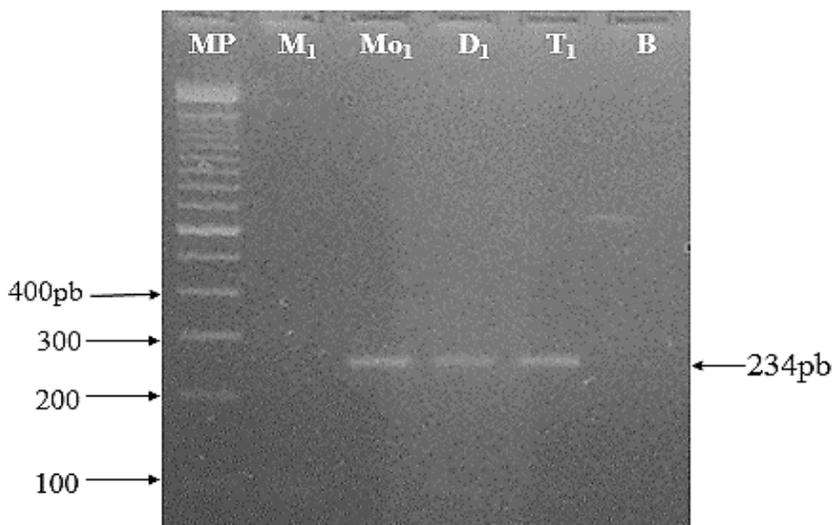
Se extrajo el ADN de las 11 muestras restantes de plátano fresco y se cuantificó mediante espectrofotometría en el Nanodrop (Cuadro 17) obteniendo concentraciones de ADN de 102.5ng/μL a 429.1ng/μL, a pesar de que pueden parecer altas se demostró que los primers de plátano hibridan de manera adecuada sin saturación de muestra a una concentración de 400ng/μL, por tal motivo se decidió trabajar con las muestras concentradas. Los valores que se obtuvieron de la relación 260/280 indican que no existe contaminación significativa ya que se encuentran muy cercanos a 1.8, por lo tanto el ADN puede ser utilizado en PCR.

**Cuadro 17. Concentración y pureza de muestras de ADN de plátano fresco.**

Muestra	Relación 260/280	(ng/μL)
T <sub>1</sub>	1.82	440.8
T <sub>2</sub>	1.76	406.8
T <sub>3</sub>	1.84	223.2
M <sub>1</sub>	1.78	230.3
M <sub>2</sub>	1.74	407.6
M <sub>3</sub>	1.75	174.7
Mo <sub>1</sub>	1.78	429.1
Mo <sub>2</sub>	1.85	170.4
Mo <sub>3</sub>	1.91	108.9
D <sub>1</sub>	1.73	162.5
D <sub>2</sub>	1.72	102.5
D <sub>3</sub>	1.71	275

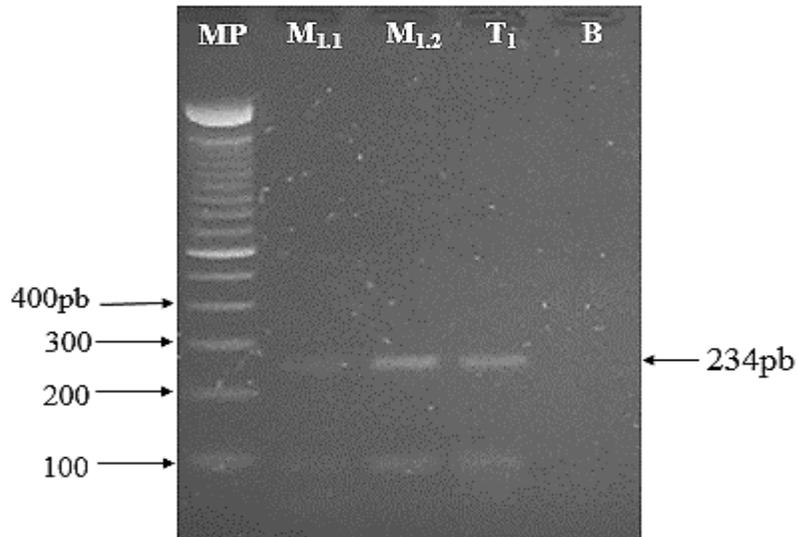
Se empleó el Kit de PCR *Promega* y el programa que se encuentra en la Figura 20, los geles de agarosa se prepararon al 2.5% y se corrieron a 60V. Se trabajó cada 4 muestras de distinta variedad para lograr una mejor interpretación de los resultados, se colocó la muestra T<sub>1</sub> como control positivo para verificar que las otras muestras de ADN también

amplificaran en la zona de interés, los resultados se muestran en las Figuras 24-28.



**Figura 24.** Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la amplificación de 3 muestras de plátano fresco ( $M_1$ ,  $Mo_1$  y  $D_1$ ) utilizando primers de plátano. (MP) Marcador de peso molecular 100pb; Muestras procedentes de Mega Comercial: ( $M_1$ ) Plátano macho, ( $Mo_1$ ) Plátano morado, ( $D_1$ ) Plátano dominico; ( $T_1$ ) Control positivo-Plátano tabasco de un mercado local; (B) Blanco.

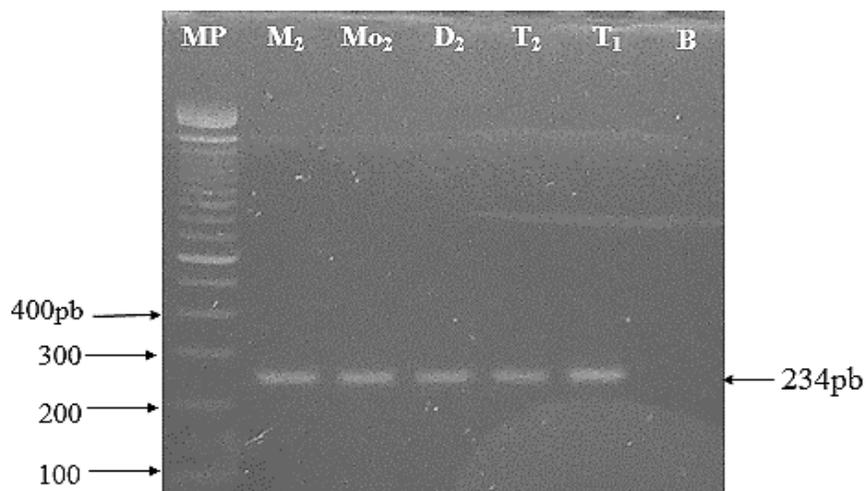
En la Figura 24 se muestra el gel de 3 muestras de plátano fresco procedentes de Mega Comercial: plátano macho ( $M_1$ ), plátano morado ( $Mo_1$ ) y plátano dominico ( $D_1$ ). Se puede apreciar una banda de 234pb en los carriles que contienen ADN de plátano morado  $Mo_1$  y plátano dominico  $D_1$ , los dos amplificados se observan de manera clara; sin embargo, la banda en el carril donde se encuentra la muestra  $D_1$  es un poco más tenue, esto puede deberse a que tiene una concentración menor de ADN en comparación a las otras dos muestras, a pesar de ello se puede trabajar posteriormente con esta muestra ya que los primers de plátano hibridaron correctamente en la zona de interés. La muestra de plátano macho  $M_1$  no presentó alguna banda visible por lo cual se realizó nuevamente la técnica de PCR variando la cantidad de ADN (0.5 $\mu$ L y 1.5 $\mu$ L), la muestra  $M_{1.2}$  en donde se colocó 1.5 $\mu$ L de ADN amplificó en 234pb como se esperaba (Figura 25) indicando que la muestra de plátano macho  $M_1$  no amplificó en la PCR anterior debido a que no tenía material genético suficiente para llevar a cabo la reacción, la muestra  $M_{1.1}$  presentó una banda de amplificación apenas visible. El control positivo también amplificó en 234pb, por otra parte, se observa que el carril del blanco B no presenta alguna banda demostrando la ausencia de contaminación en las muestras.



**Figura 25.** Gel de agarosa al 2.5% a 60 V para la amplificación de 2 muestras de plátano fresco ( $M_{1.1}$  y  $M_{1.2}$ ) utilizando primers de plátano. (MP) Marcador de peso molecular 100pb; ( $M_{1.1}$ ) Plátano macho de un mercado local, 0.5 $\mu$ L de ADN; ( $M_{1.2}$ ) Plátano macho de un mercado local, 1.5 $\mu$ L de ADN; ( $T_1$ ) Control positivo-Plátano tabasco de un mercado local; (B) Blanco.

En la Figura 26 se observan las siguientes 4 muestras de plátano fresco: plátano macho de Wal-Mart ( $M_2$ ), plátano morado de Tabasco ( $Mo_2$ ), plátano dominico de Chiapas ( $D_2$ ) y plátano tabasco de Wal-Mart ( $T_2$ ), todas al igual que el control positivo presentan una banda de amplificación en 234pb como era lo esperado. Se colocó 1.5 $\mu$ L de ADN en las muestras  $Mo_2$  y  $D_2$  con la finalidad de que existiera material genético suficiente en la reacción, a las muestras  $M_2$ ,  $T_2$  y  $T_1$  se les colocó 1 $\mu$ L de ADN.

Los 4 amplificados se pueden apreciar de manera clara a pesar de que las muestras tienen distintas concentraciones de ADN, cabe mencionar que la muestra de plátano macho  $M_2$  tiene la concentración más alta (407.6ng/ $\mu$ L) y presenta una banda un poco más marcada. El carril del blanco indica que no existe contaminación en las muestras al no presentar alguna banda visible, de lo contrario se tendría que realizar nuevamente la PCR teniendo los cuidados adecuados.

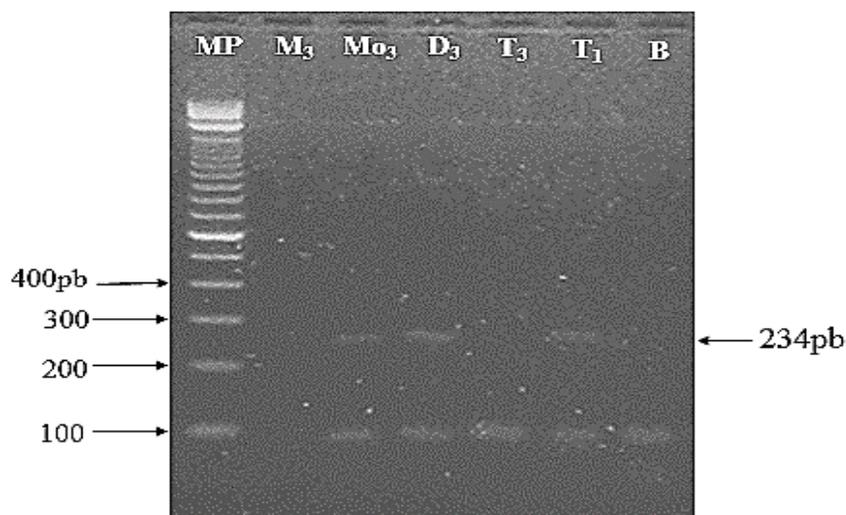


**Figura 26. Gel de agarosa al 2.5% a 60 V para la amplificación de 4 muestras de plátano fresco ( $M_2$ ,  $Mo_2$ ,  $D_2$  y  $T_2$ ) utilizando primers de plátano. (MP) Marcador de peso molecular 100pb; ( $M_2$ ) Plátano macho de Wal-Mart, ( $Mo_2$ ) Plátano morado de Tabasco, ( $D_2$ ) Plátano dominico de Chiapas; ( $T_2$ ) Plátano tabasco de Wal-Mart, ( $T_1$ ) Control positivo-Plátano tabasco de un mercado local; (B) Blanco.**

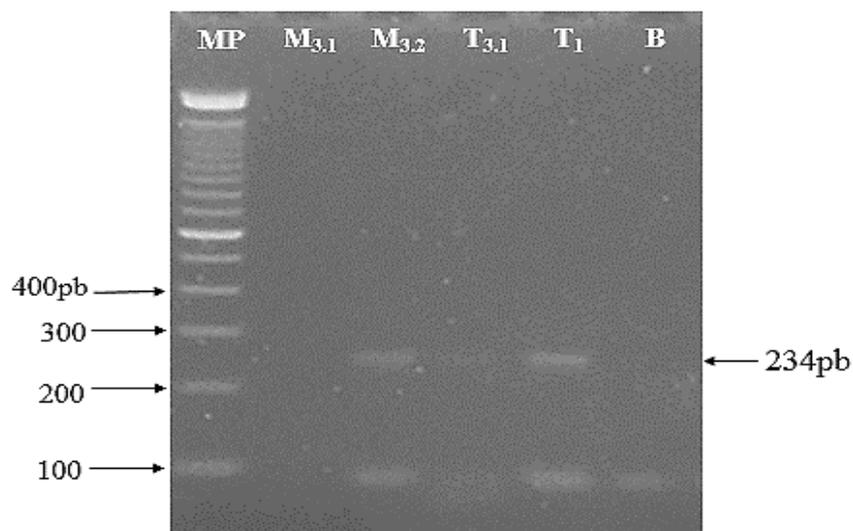
Los resultados de las últimas 4 muestras restantes de plátano fresco analizadas se presentan en la Figura 27, se pueden observar 3 bandas de amplificación muy tenues que corresponden a las muestras de plátano morado de un mercado local ( $Mo_3$ ), plátano dominico de Campeche ( $D_3$ ) y al control positivo, el hecho de que las bandas no sean del todo visibles puede ser debido a la concentración obtenida de ADN. El control positivo amplificó de manera correcta en los demás geles y las bandas de amplificación se encuentran en 234pb como se deseaba, por lo tanto, las muestras pueden ser utilizadas posteriormente. En el carril B que corresponde al blanco o control negativo no se observa alguna banda visible descartando que exista contaminación. A todas las muestras se les colocó 1 $\mu$ L de ADN; sin embargo, las muestras de plátano macho  $M_3$  y plátano tabasco  $T_3$  no amplificaron, por lo cual se sometieron nuevamente a la técnica de PCR cambiando la cantidad de ADN.

En la Figura 28 se observa que la muestra de plátano macho  $M_{3.2}$  en donde se colocó 2 $\mu$ L de ADN amplificó en 234pb presentando una banda visible e indicando que en la PCR anterior hubo insuficiencia de material genético, a la muestra de plátano tabasco  $T_{3.1}$  se le colocó 1.5 $\mu$ L de ADN obteniendo como resultado una banda de amplificación muy tenue casi imposible de observarse, a pesar de ello se decidió utilizar la muestra posteriormente

ya que los primers hibridaron en la zona de interés. El control positivo amplificó sin problema alguno, por otra parte, el carril B correspondiente al blanco indica que la PCR se realizó correctamente.



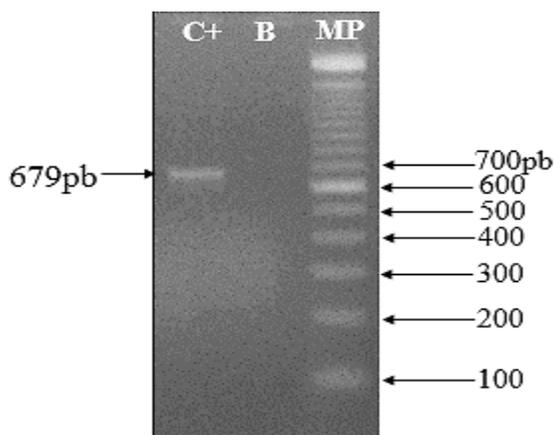
**Figura 27.** Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la amplificación de 4 muestras de plátano fresco ( $M_3$ ,  $Mo_3$ ,  $D_3$  y  $T_3$ ) utilizando primers de plátano. (MP) Marcador de peso molecular 100pb; ( $M_3$ ) Plátano macho de Veracruz, ( $Mo_3$ ) Plátano morado de un mercado local, ( $D_3$ ) Plátano dominico de Campeche; ( $T_3$ ) Plátano tabasco de Soriana, ( $T_1$ ) Control positivo-Plátano tabasco de un mercado local; (B) Blanco.



**Figura 28.** Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la amplificación de 3 muestras de plátano fresco ( $M_{3.1}$ ,  $M_{3.2}$  y  $T_{3.1}$ ) utilizando primers de plátano. (MP) Marcador de peso molecular 100pb; ( $M_{3.1}$ ) Plátano macho de Veracruz, 1.5 $\mu$ L de ADN; ( $M_{3.2}$ ) Plátano macho de Veracruz, 2 $\mu$ L de ADN; ( $T_{3.1}$ ) Plátano tabasco de Soriana; ( $T_1$ ) Control positivo-Plátano tabasco de un mercado local; (B) Blanco.

Después de realizar PCR a las 12 muestras de plátano fresco utilizando el Kit para PCR *Promega* se pudo corroborar que los primers diseñados de plátano amplifican en la zona de interés deseada e hibridan correctamente, es importante destacar que fue muy variable el manipular la cantidad de ADN para que la reacción contara con suficiente material genético y pudiera realizarse de manera adecuada, es por ello que se decidió trabajar en las siguientes reacciones con el Kit de PCR *Thermo Scientific Phire Plant Direct* utilizando las muestras de ADN concentradas. Por otra parte, las condiciones que se habían establecido fueron las ideales para trabajar con las distintas variedades de plátano fresco, estableciendo así el programa de PCR.

En el caso del promotor *Arabidopsis* para comprobar la amplificación de la zona de interés con los primers diseñados se llevó a cabo la prueba de PCR directa. Para la muestra de ADN se consiguieron semillas de *Arabidopsis* en el CINVESTAV-IPN con el Dr. Roberto Ruiz Medrano las cuales fueron sembradas en agar nutritivo al 0.5% hasta su crecimiento (aproximadamente 5 días), la planta fue colocada en el buffer de dilución que contiene el Kit de PCR y se tomó 0.5 $\mu$ L de muestra para preparar la reacción. Para observar el producto obtenido se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, el resultado fue el siguiente:



**Figura 29.** Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la amplificación de planta de *Arabidopsis* utilizando primers del promotor *Arabidopsis*. (C+) Control positivo- ADN de planta de *Arabidopsis*; (B) Blanco; (MP) Marcador de peso molecular 100pb.

En la Figura 29 se puede observar un amplificado en 679pb correspondiente a la zona de interés de los primers diseñados, por lo tanto, la muestra puede ser utilizada como control

positivo para la identificación de organismos genéticamente modificados con el promotor *Arabidopsis* bajo las condiciones establecidas en la Figura 21. El carril B correspondiente al control negativo o blanco no presenta banda de amplificación indicando que la PCR se realizó de manera correcta.

### 3.2 Objetivo particular 2

**Evaluar la especificidad de los primers diseñados para plátano fresco, con especies filogenéticamente cercanas mediante PCR para emplearlos en la detección de plátano.**

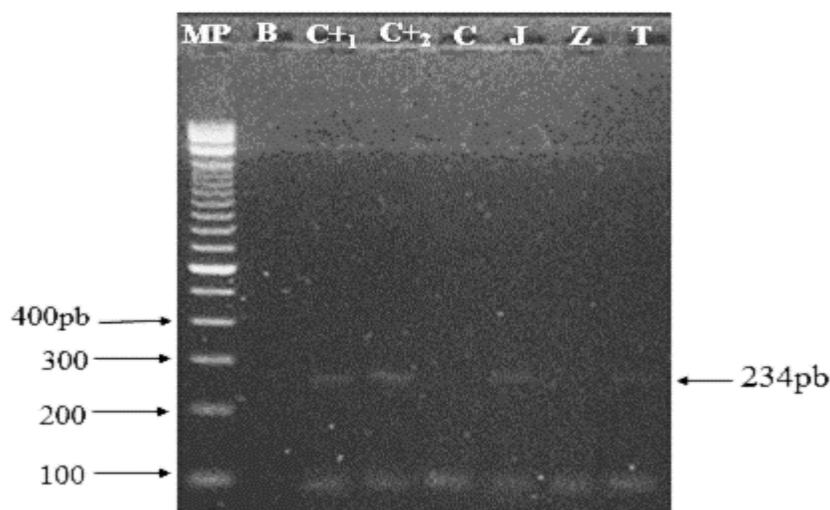
Se realizó la extracción de ADN de muestras vegetales (calabaza, jitomate, zanahoria y tomate) siguiendo el protocolo clásico de Sambrook (2001). Las muestras de ADN fueron cuantificadas mediante espectrofotometría utilizando el Nanodrop. En el Cuadro 18 se puede observar que las concentraciones iniciales obtenidas inmediatamente después de la extracción van de 1958.1 a 2580.7 ng/μL, por lo cual, para ser utilizadas en PCR fue necesario realizar una dilución con agua libre de nucleasas. Se realizaron los cálculos de tal manera que las muestras quedaran a una concentración aproximada de 400 ng/μL, ya que el plátano amplificó en un rango de concentraciones de 100 a 400 ng/μL. De acuerdo a la relación 260/280 final los valores se encuentran cercanos al valor óptimo que es de 1.8 indicando que no existe una contaminación significativa con fenol o con ARN y que las muestras pueden ser utilizadas para PCR.

*Cuadro 18. Concentración y pureza de muestras de ADN para especificidad de primers de plátano.*

Muestra	Relación 260/280 inicial	(ng/μL) inicial	Relación 260/280 final	(ng/μL) final	
C	Calabaza	1.97	2580.7	1.83	455.5
J	Jitomate	1.89	2156.1	1.79	383.4
Z	Zanahoria	1.94	2385.8	1.88	480.6
T	Tomate	1.86	1985.1	1.82	358.7

Una vez cuantificadas las muestras se realizó la prueba de PCR utilizando el Kit de PCR *Promega* y los primers de plátano. El programa utilizado se muestra en la Figura 20. Posteriormente se evaluó el producto obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % y se observó en el trasluminador.

En la Figura 30 se muestran dos amplificados en C<sub>+1</sub> y C<sub>+2</sub> que corresponden a los controles positivos, los cuales fueron muestras de ADN de plátano fresco. En C<sub>+1</sub> se colocó ADN de plátano macho y en C<sub>+2</sub> de plátano dominico, los dos procedentes de Mega Comercial. Estos amplificados son tenues y puede ser debido a que las muestras estuvieron conservadas por un tiempo hasta su utilización y el ADN se haya degradado; sin embargo, el amplificado corresponde a las 234pb esperadas. En el carril de las muestras jitomate (J) y tomate (T) se puede observar de igual manera un amplificado un poco más tenue que los anteriores indicando que los primers diseñados para plátano no son específicos, aunque amplifica en la zona de interés no hibrida únicamente con la especie deseada sino con especies filogenéticamente lejanas. Se realizaron algunas repeticiones de la PCR y del gel para descartar algún error experimental que se viera reflejado en los resultados; sin embargo, se obtuvo el mismo. En el carril de las muestras calabaza (C) y tomate (T) no se presentó un amplificado. En el carril B que corresponde al Blanco se observa que no existe contaminación que pudiera alterar el resultado al no presentar alguna banda de amplificación.



**Figura 30. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la prueba de especificidad de primers de plátano.** (MP) Marcador de peso molecular 100pb; (B) Blanco; (C<sub>+1</sub> y C<sub>+2</sub>) Controles positivos: plátano fresco; (C) Calabaza; (J) Jitomate; (Z) Zanahoria; (T) Tomate.

### 3.3 Objetivo particular 3

**Evaluar la especificidad de los primers de los promotores CaMV y T-NOS, con maíz transgénico y no transgénico mediante PCR para utilizarlos en la detección de organismos genéticamente modificados.**

Se llevó a cabo la extracción de ADN de maíz que contiene el gen de CaMV y T-NOS, y de canola que contiene el gen de T-NOS para ser utilizadas como controles positivos en la detección de organismos genéticamente modificados. Las muestras ya se encontraban en el laboratorio y habían sido utilizadas en trabajos anteriores. También se realizó la extracción de ADN de maíz no transgénico para evaluar la especificidad de los primers de los promotores. La extracción de las muestras se llevó a cabo empleando el protocolo clásico de Sambrook (2001) y se cuantificó en el Nanodrop, obteniendo los siguientes resultados:

*Cuadro 19. Concentración y pureza de muestras de ADN para control positivo y especificidad de primers de CaMV y T-NOS.*

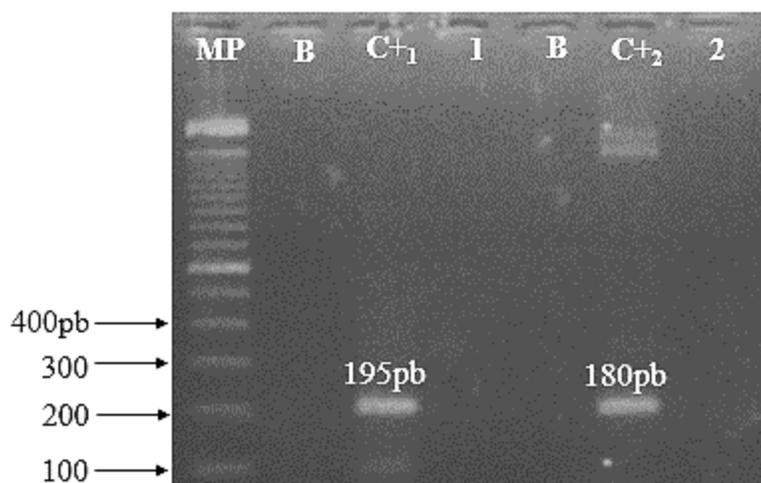
Muestra	Relación 260/280 inicial	(ng/ $\mu$ L) inicial	Relación 260/280 final	(ng/ $\mu$ L) final
Maíz transgénico	1.76	1042.1	1.80	82
Maíz no transgénico	1.82	2493.1	1.78	77.3
Canola transgénica	1.82	1235.7	1.81	65.2

En el Cuadro 19 se aprecia que la relación 260/280 inicial tiene un valor cercano a 1.8, por lo que las muestras cuentan con la pureza necesaria para ser utilizadas en PCR; sin embargo, la concentración es muy alta y podría afectar en la hibridación de los primers. Para reducir la concentración aproximadamente a 60ng/ $\mu$ L se realizó una dilución con agua libre de nucleasas. En las dos últimas columnas se pueden observar los resultados después de llevar a cabo la dilución, la pureza de las muestras se mantuvo cercana a 1.8 indicando la ausencia de contaminación y la concentración de ADN se muestra considerable para que los primers hibriden de manera correcta en PCR.

Para corroborar la amplificación de la zona de interés de los primers seleccionados del promotor CaMV y del terminador T-NOS se realizó PCR directa utilizando los primers correspondientes y el Kit de PCR *Thermo Scientific Phire Plant Direct*. Se evaluó el producto obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % y se observó en el trasluminador.

En la Figura 31 se aprecia un amplificado en los carriles de los controles positivos C<sub>+1</sub> y C<sub>+2</sub> en los cuales se colocó una muestra de maíz transgénico que contiene el gen de CaMV y T-NOS. En C<sub>+1</sub> se utilizaron los primers de CaMV, mostrando un amplificado de 195pb y en C<sub>+2</sub> los primers de T-NOS con un amplificado de 180pb, los dos amplificados eran los esperados. En los carriles 1 y 2 no se muestra algún amplificado debido a que se colocó muestra de ADN de maíz no transgénico para asegurar que los primers amplifican únicamente para cada gen. No se muestra contaminación al no presentar alguna banda en los carriles de blanco.

Después de corroborar que la muestra de maíz transgénico amplifica con los primers de CaMV y T-NOS se decidió utilizarla como control positivo en PCR para los dos. En el caso del terminador T-NOS se utilizó también la muestra de canola transgénica como control positivo.



**Figura 31.** Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la prueba de especificidad de primers de CaMV y T-NOS. (MP) Marcador de peso molecular 100pb; (B) Blanco; (C<sub>+1</sub> y C<sub>+2</sub>) Controles positivos: maíz transgénico; (1 y 2) Muestras de maíz no transgénico.

### 3.4 Objetivo particular 4

**Aplicar la técnica de PCR al ADN de productos procesados utilizando primers específicos para detectar la presencia de plátano fresco.**

Se empleó el protocolo descrito por Sambrook (2001) y Cheng et.al (2003) para realizar la extracción de ADN de 12 productos comerciales que de acuerdo a su etiqueta contienen plátano. Se cuantificó la concentración y pureza de las muestras de ADN extraídas

utilizando el Nanodrop (Cuadro 20). Las concentraciones que se obtuvieron se encuentran en un rango de 100 a 400ng/ $\mu$ L parecidas a las que amplificó el plátano fresco. Las muestras de puré de frutas (manzana y plátano) (P<sub>1</sub>) y plátanos deshidratados (P<sub>11</sub>) muestran una concentración de 56.6 y 71.2ng/ $\mu$ L respectivamente, cantidad suficiente que se requiere de ADN para que se lleve a cabo la PCR de manera correcta. Por lo anterior, se optó por utilizar las muestras concentradas de ADN de los productos comerciales.

La relación 260/280 se obtuvo entre 1.70 y 1.80, indicando que puede existir una contaminación con proteínas o fenol. El plátano fresco contiene 1.2g de proteínas por cada 100g de porción comestible, por lo cual es probable que dicha contaminación sea por fenol que no se eliminó totalmente durante la extracción. A pesar de lo anterior, los valores indican que los ácidos nucleicos todavía se encuentran y por ello las muestras pueden ser utilizadas para realizar PCR.

**Cuadro 20. Concentración y pureza de muestras de ADN de productos comerciales que contienen plátano.**

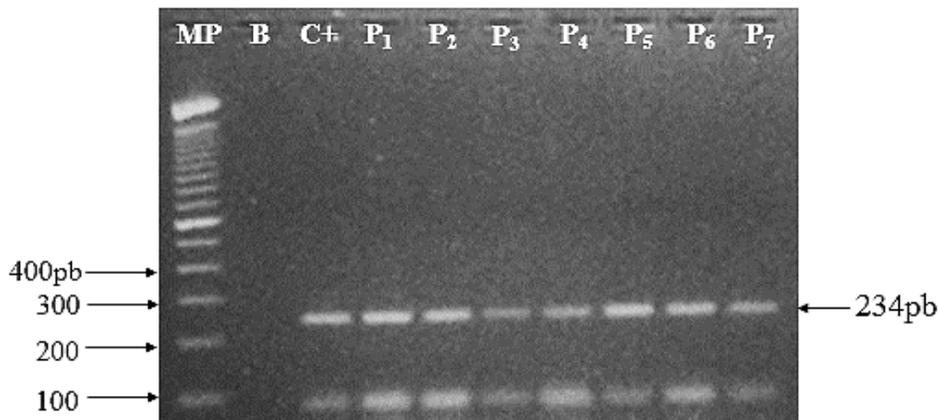
Muestra	Relación 260/280	(ng/ $\mu$ L)
P <sub>1</sub>	1.71	56.6
P <sub>2</sub>	1.71	129.3
P <sub>3</sub>	1.77	244
P <sub>4</sub>	1.78	152.1
P <sub>5</sub>	1.71	103.4
P <sub>6</sub>	1.72	109
P <sub>7</sub>	1.70	103.3
P <sub>8</sub>	1.74	174.1
P <sub>9</sub>	1.80	382.4
P <sub>10</sub>	1.70	404.4
P <sub>11</sub>	1.77	71.2
P <sub>12</sub>	1.70	377.5

Se realizó la prueba de PCR empleando el Kit de PCR *Thermo Scientific Phire Plant Direct* y los primers de plátano. Al usar el Kit no es necesario realizar una extracción previa de ADN ya que la muestra se toma de manera directa; sin embargo, debido a la complejidad del método de extracción de ADN de plátano se decidió utilizar las muestras extraídas anteriormente para asegurar una pureza mayor del ADN. El programa de PCR que se utilizó se muestra en la Figura 20 empleando un T<sub>m</sub> de 62°C. Se llevó a cabo

electroforesis en gel de agarosa al 2.5% para evaluar los resultados obtenidos de la PCR y se observó en el trasluminador.

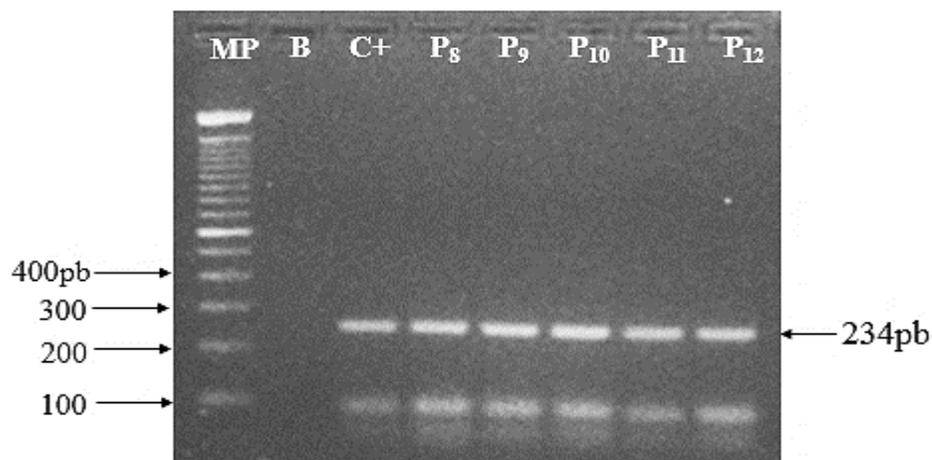
En la Figura 32 se muestran las primeras 7 muestras con las que se trabajó: puré de frutas (manzana y plátano) (P<sub>1</sub>), plátanos con chile (P<sub>2</sub>), panecillos con plátano (P<sub>3</sub>), chips de plátano (P<sub>4</sub>), papilla de plátano (etapa 1) (P<sub>5</sub>), papilla de plátano (etapa 2) (P<sub>6</sub>) y papilla de manzana, plátano, fresa y frambuesa (P<sub>7</sub>). Se puede observar que todas las muestras tienen un amplificado de 234pb como se esperaba, demostrando que los productos realmente contienen plátano como lo muestra su etiqueta. Es importante tener en cuenta que los primers diseñados para plátano no resultaron específicos de la especie y que los productos comerciales no contienen sólo plátano en su composición, por lo cual no se puede descartar la posibilidad de que amplifique algún otro material vegetal.

En el pocillo del control positivo C+ se colocó muestra de ADN de plátano fresco para verificar que la PCR se efectuó de manera correcta mostrando también un amplificado en 234pb. No existe contaminación en las muestras al no presentar alguna banda en el carril B perteneciente al Blanco. En el carril P<sub>3</sub> que corresponde a la muestra de ADN de Panecillos con plátano se observa un amplificado tenue en comparación a las demás muestras, esto puede deberse a que el ADN se vio afectado por la presencia de conservadores, saborizantes o por proceso al que se sometió el producto.



**Figura 32. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección de plátano en muestras de ADN de P<sub>1</sub> a P<sub>7</sub>.** (MP) Marcador de peso molecular 100pb; (B) Blanco; (C+) Control positivo: plátano fresco; (P<sub>1</sub>) Puré de frutas (manzana y plátano); (P<sub>2</sub>) Plátanos con chile; (P<sub>3</sub>) Panecillos con plátano; (P<sub>4</sub>) Chips de plátano; (P<sub>5</sub>) Papilla de plátano (etapa 1); (P<sub>6</sub>) Papilla de plátano (etapa 2); (P<sub>7</sub>) Papilla de manzana, plátano, fresa y frambuesa.

En la Figura 33 se encuentran los resultados de las últimas 5 muestras de productos comerciales: plátanos fritos ( $P_8$ ), alimento para lactantes orgánico ( $P_9$ ), colado de plátano ( $P_{10}$ ), plátanos deshidratados ( $P_{11}$ ) y avena en polvo para licuado ( $P_{12}$ ). Se utilizó el mismo programa de PCR y de igual manera se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. Las muestras presentaron el amplificado esperado de 234pb, incluyendo la banda que corresponde al control positivo (ADN de plátano fresco). El blanco no presentó ningún amplificado, por lo tanto las muestras no se encuentran contaminadas y la PCR se llevó a cabo de manera correcta.



**Figura 33.** Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección de plátano en muestras de ADN de  $P_8$  a  $P_{12}$ . (MP) Marcador de peso molecular 100pb; (B) Blanco; (C+) Control positivo: plátano fresco; ( $P_8$ ) Plátanos fritos; ( $P_9$ ) Alimento para lactantes orgánico; ( $P_{10}$ ) Colado de plátano; ( $P_{11}$ ) Plátanos deshidratados; ( $P_{12}$ ) Avena en polvo para licuado.

### 3.5 Objetivo particular 5

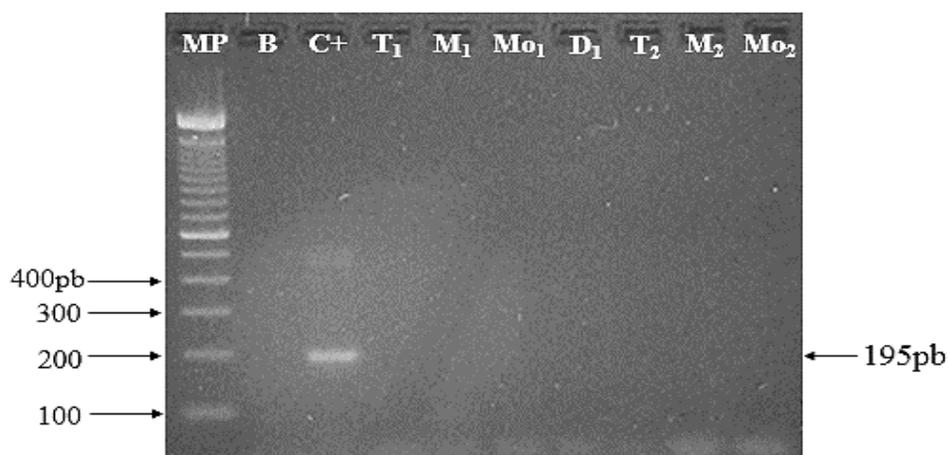
**Evaluar diferentes variedades de plátano fresco y productos comerciales, para determinar la presencia de organismos genéticamente modificados por medio de la amplificación por PCR.**

Después de corroborar que los primers diseñados amplifican en la zona de interés y que los productos comerciales realmente contienen plátano se llevó a cabo la técnica de PCR directa al ADN de las muestras para determinar la presencia de organismos genéticamente modificados utilizando los primers de los promotores (CaMV y *Arabidopsis*) y del terminador (T-NOS).

Las condiciones a las que fueron sometidas las muestras en PCR directa para detectar la presencia del promotor CaMV y el terminador T-NOS se muestran en la Figura 22. Para el promotor de *Arabidopsis* el programa se muestra en la Figura 21. Los resultados obtenidos fueron evaluados en geles de agarosa al 2.5% y 60V. Los amplificados esperados para los controles positivos fueron las siguientes: CaMV: 195pb, T-NOS: 180pb y *Arabidopsis*: 679pb, en caso de que alguna muestra amplifique en alguna de ellas indicaría que ha sido modificada genéticamente usando la secuencia del promotor o terminador correspondiente para la expresión del gen insertado.

### Detección del promotor CaMV en muestras de plátano fresco y productos comerciales

En la Figura 34 se encuentran las primeras 7 muestras: plátano tabasco de un mercado local ( $T_1$ ), plátano macho ( $M_1$ ), plátano morado ( $Mo_1$ ) y plátano dominico de Mega Comercial ( $D_1$ ), plátano tabasco de Wal-Mart ( $T_2$ ), plátano macho Wal-Mart ( $M_2$ ) y plátano morado de Tabasco ( $Mo_2$ ). En ninguna de estas muestras se obtuvo un amplificado demostrando la ausencia del promotor CaMV.

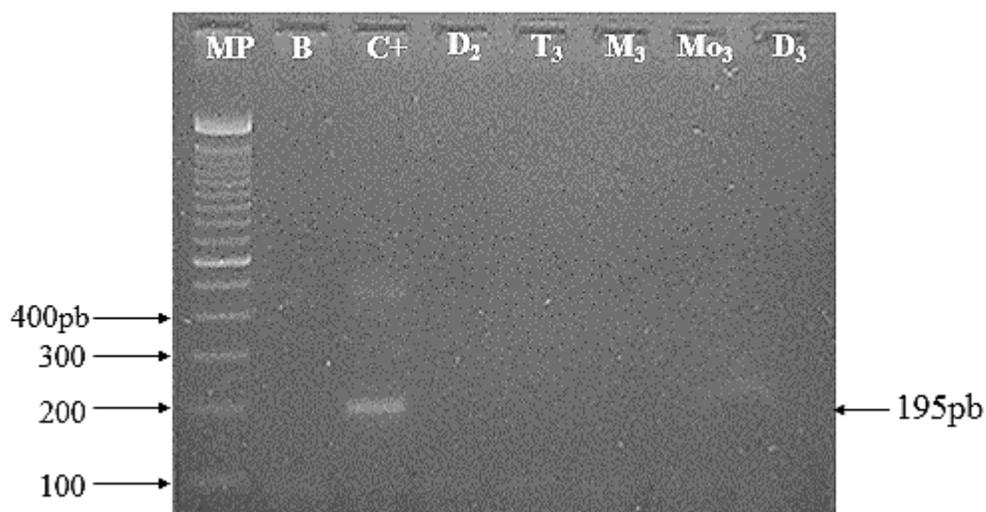


**Figura 34.** Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del promotor CaMV en 7 muestras de plátano fresco ( $T_1$ ,  $M_1$ ,  $Mo_1$ ,  $D_1$ ,  $T_2$ ,  $M_2$  y  $Mo_2$ ). (MP) marcador de peso molecular 100pb; (B) Blanco; (C+) Control positivo: maíz transgénico; ( $T_1$ ) Plátano tabasco de un mercado local; ( $M_1$ ) Plátano macho de Mega Comercial; ( $Mo_1$ ) Plátano morado de Mega Comercial; ( $D_1$ ) Plátano dominico de Mega Comercial; ( $T_2$ ) Plátano tabasco de Wal-Mart; ( $M_2$ ) Plátano macho Wal-Mart; ( $Mo_2$ ) Plátano morado de Tabasco.

En la Figura 35 se pueden apreciar las 5 muestras restantes: plátano dominico de Chiapas ( $D_2$ ), plátano tabasco de Soriana ( $T_3$ ), plátano macho de Veracruz ( $M_3$ ), plátano morado de un mercado local ( $Mo_3$ ) y plátano dominico de Campeche ( $D_3$ ).

Al igual que las 7 muestras anteriores de plátano fresco, las 5 muestras restantes no presentaron algún amplificado indicando que no han sido modificadas genéticamente con el promotor CaMV.

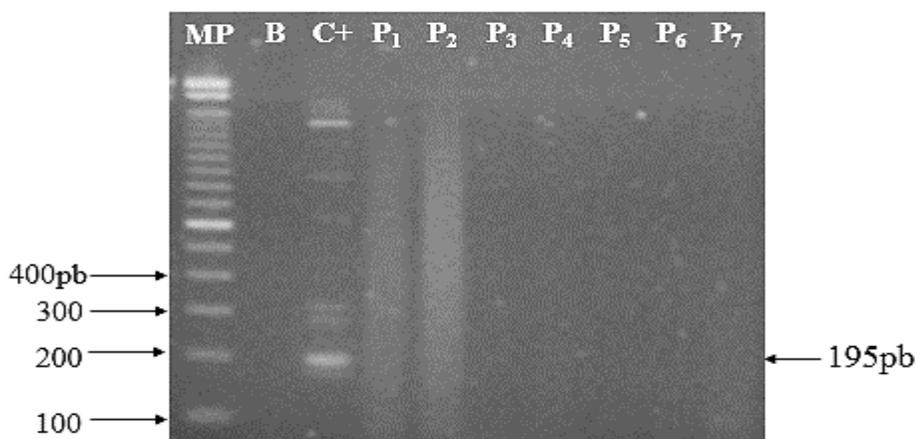
En los dos geles (Figuras 34 y 35) se observa una banda de amplificación en 195pb en el control positivo que corresponde a la muestra evaluada anteriormente de ADN de maíz transgénico que contiene el gen de CaMV para asegurar la presencia de material transgénico. Los carriles de Blanco (B) se encuentran vacíos demostrando que la PCR se realizó correctamente sin presencia de contaminación.



**Figura 35.** Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del promotor CaMV en 5 muestras de plátano fresco ( $D_2$ ,  $T_3$ ,  $M_3$ ,  $Mo_3$  y  $D_3$ ). (MP) marcador de peso molecular 100pb; (B) Blanco; (C+) Control positivo: maíz transgénico; ( $D_2$ ) Plátano dominico de Chiapas; ( $T_3$ ) Plátano tabasco de Soriana; ( $M_3$ ) Plátano macho de Veracruz; ( $Mo_3$ ) Plátano morado de un mercado local; ( $D_3$ ) Plátano dominico de Campeche.

Después de detectar la presencia del promotor CaMV en las variedades de plátano fresco se procedió a realizar lo mismo en las muestras de los productos comerciales que contienen plátano. En las Figuras 36 y 37 se presentan los resultados que se obtuvieron, de igual manera se realizaron dos geles de electroforesis para lograr una mejor interpretación de los resultados.

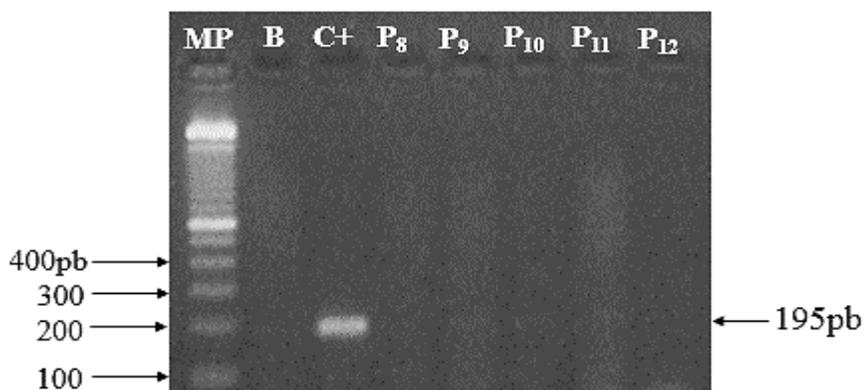
En la Figura 36 se presentan 7 productos comerciales: puré de frutas (manzana y plátano) (P<sub>1</sub>), plátanos con chile (P<sub>2</sub>), panecillos con plátano (P<sub>3</sub>), chips de plátano (P<sub>4</sub>), papilla de plátano (etapa 1) (P<sub>5</sub>), papilla de plátano (etapa 2) (P<sub>6</sub>) y papilla de manzana, plátano, fresa y frambuesa (P<sub>7</sub>). Se puede apreciar que la PCR se llevó a cabo adecuadamente al amplificar el control positivo C+ (maíz transgénico) en 195pb como se esperaba, algunas muestras presentan un barrido en su carril pero se puede observar que en el Blanco no existe alguna banda visible, por lo que se descarta que sea por contaminación. Ninguno de los productos mostró una banda de amplificación descartando el uso del promotor CaMV.



**Figura 36.** Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del promotor CaMV en productos comerciales que contienen plátano (P<sub>1</sub> a P<sub>7</sub>). (MP) Marcador de peso molecular 100pb; (B) Blanco; (C+) Control positivo: maíz transgénico; (P<sub>1</sub>) Puré de frutas (manzana y plátano); (P<sub>2</sub>) Plátanos con chile; (P<sub>3</sub>) Panecillos con plátano; (P<sub>4</sub>) Chips de plátano; (P<sub>5</sub>) Papilla de plátano (etapa 1); (P<sub>6</sub>) Papilla de plátano (etapa 2); (P<sub>7</sub>) Papilla de manzana, plátano, fresa y frambuesa.

En la Figura 37 se observan las 5 muestras de productos comerciales restantes: plátanos fritos (P<sub>8</sub>), alimento para lactantes orgánico (P<sub>9</sub>), colado de plátano (P<sub>10</sub>), plátanos deshidratados (P<sub>11</sub>) y avena en polvo para licuado (P<sub>12</sub>). El control positivo C+ amplificó en la zona de interés (195pb) mientras que ninguna de las 5 muestras presentó un amplificado indicando que no se ha llevado a cabo una modificación genética utilizando el promotor CaMV. El carril del blanco (B) indica que no existe contaminación en las muestras al mostrarse completamente vacío.

Desde el primer informe de líneas transgénicas de plátano y las primeras plantas generadas de plátano transgénico, se han usado varios promotores para dirigir la expresión del gen. Se han utilizado al menos 35 promotores diferentes, principalmente para dirigir una expresión altamente constitutiva, de la cual el promotor CaMV 35S del virus mosaico de la coliflor es el más utilizado (Mohandas y Ravishankar, 2016), debido a lo anterior es que se esperaba encontrar plátano genéticamente modificado con este promotor; sin embargo, en ninguna de las 24 muestras analizadas fue localizado.



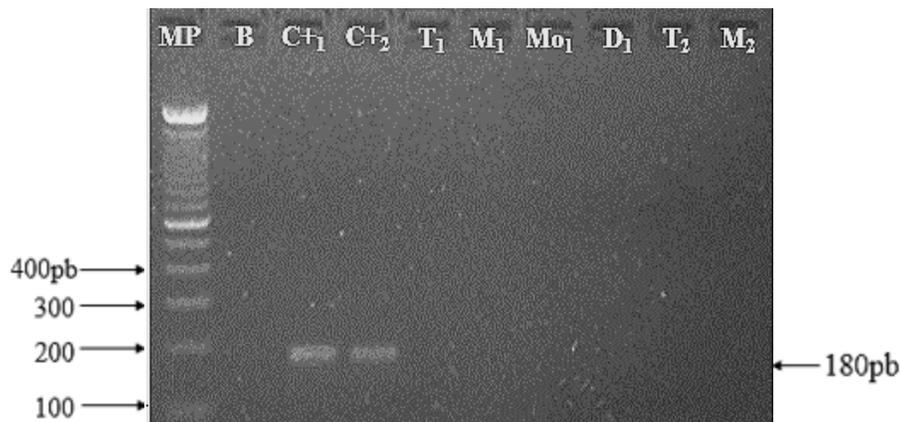
**Figura 37.** Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del promotor CaMV en productos comerciales que contienen plátano ( $P_8$  a  $P_{12}$ ). (MP) Marcador de peso molecular 100pb; (B) Blanco; (C+) Control positivo: maíz transgénico; ( $P_8$ ) Plátanos fritos; ( $P_9$ ) Alimento para lactantes orgánico; ( $P_{10}$ ) Colado de plátano; ( $P_{11}$ ) Plátanos deshidratados; ( $P_{12}$ ) Avena en polvo para licuado.

### **Detección del terminador T-NOS en muestras de plátano fresco y productos comerciales**

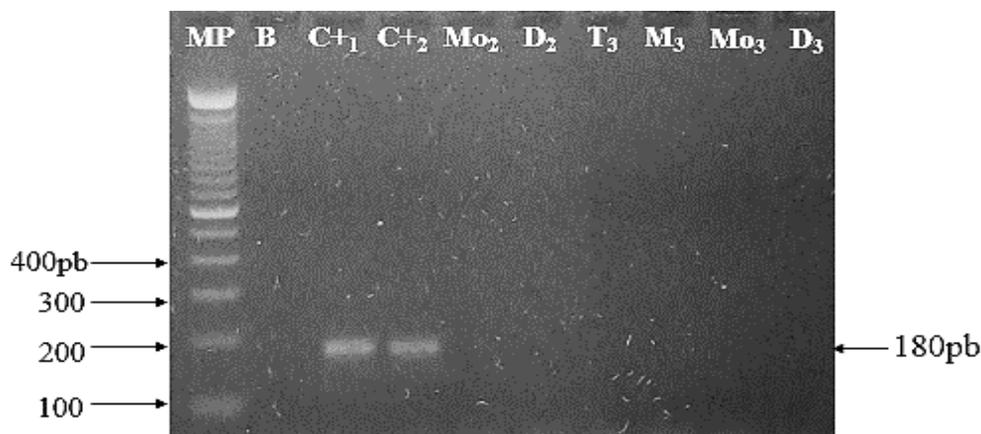
Ya evaluadas todas las muestras con el promotor CaMV se procedió a realizar lo mismo con el terminador T-NOS, se utilizaron como controles positivos la muestra de ADN de maíz transgénico ( $C_{+1}$ ) que contiene los dos genes y la de canola transgénica ( $C_{+2}$ ) que contiene el gen de T-NOS para corroborar la existencia de material transgénico.

En la Figura 38 se presentan los resultados de las muestras: plátano tabasco de un mercado local ( $T_1$ ), plátano macho ( $M_1$ ), plátano morado ( $Mo_1$ ) y plátano dominico de Mega Comercial ( $D_1$ ), plátano tabasco de Wal-Mart ( $T_2$ ) y plátano macho Wal-Mart ( $M_2$ ); mientras que en la Figura 39 se observan las últimas 6 muestras: plátano morado de Tabasco ( $Mo_2$ ), plátano dominico de Chiapas ( $D_2$ ), plátano tabasco de Soriana ( $T_3$ ), plátano

macho de Veracruz ( $M_3$ ), plátano morado de un mercado local ( $Mo_3$ ) y plátano dominico de Campeche ( $D_3$ ).



**Figura 38.** Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del terminador T-NOS en 6 muestras de plátano fresco ( $T_1$ ,  $M_1$ ,  $Mo_1$ ,  $D_1$ ,  $T_2$  y  $M_2$ ). (MP) marcador de peso molecular 100pb; (B) Blanco; ( $C+1$ : maíz transgénico y  $C+2$ : canola transgénica) Controles positivos; ( $T_1$ ) Plátano tabasco de un mercado local; ( $M_1$ ) Plátano macho de Mega Comercial; ( $Mo_1$ ) Plátano morado de Mega Comercial; ( $D_1$ ) Plátano dominico de Mega Comercial; ( $T_2$ ) Plátano tabasco de Wal-Mart; ( $M_2$ ) Plátano macho Wal-Mart.

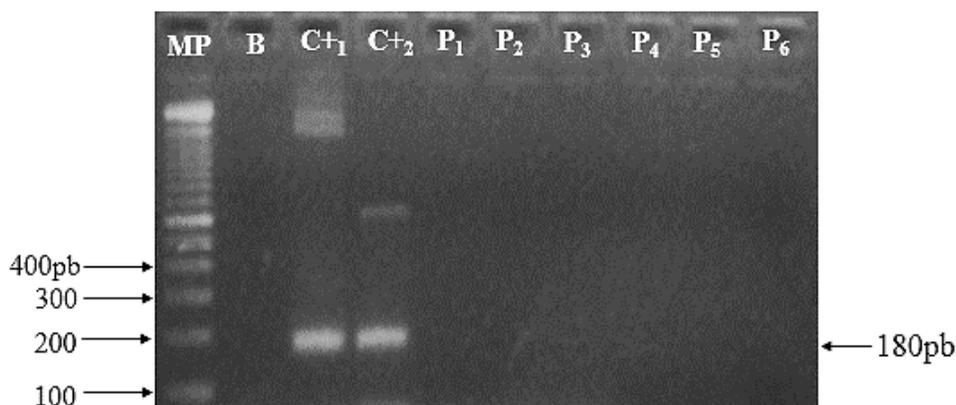


**Figura 39.** Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del terminador T-NOS en 6 muestras de plátano fresco ( $Mo_2$ ,  $D_2$ ,  $T_3$ ,  $M_3$ ,  $Mo_3$  y  $D_3$ ). (MP) marcador de peso molecular 100pb; (B) Blanco; ( $C+1$ : maíz transgénico y  $C+2$ : canola transgénica) Controles positivos; ( $Mo_2$ ) Plátano morado de Tabasco; ( $D_2$ ) Plátano dominico de Chiapas; ( $T_3$ ) Plátano tabasco de Soriana; ( $M_3$ ) Plátano macho de Veracruz; ( $Mo_3$ ) Plátano morado de un mercado local; ( $D_3$ ) Plátano dominico de Campeche.

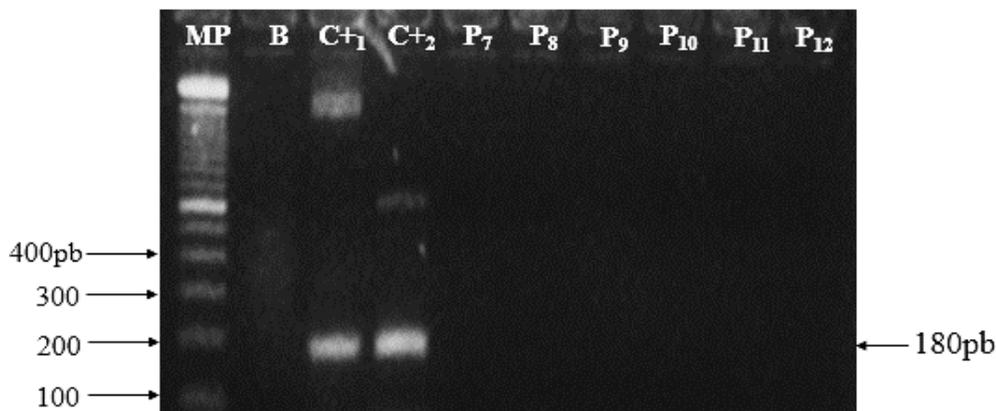
Ninguna de las 12 muestras de plátano fresco evaluadas presenta una banda de amplificación descartando el uso del terminador T-NOS para realizar modificación genética, por otra parte, los controles positivos amplificaron de manera visible demostrando que los primers hibridaron de manera adecuada en la zona de interés correspondiente a las 180pb. No se observa contaminación en las muestras, el carril B se encuentra sin algún amplificado.

En las Figuras 40 y 41 se muestran los gels de electroforesis realizados después de llevar a cabo la técnica de PCR a los 12 productos comerciales: puré de frutas (manzana y plátano) (P<sub>1</sub>), plátanos con chile (P<sub>2</sub>), panecillos con plátano (P<sub>3</sub>), chips de plátano (P<sub>4</sub>), papilla de plátano (etapa 1) (P<sub>5</sub>), papilla de plátano (etapa 2) (P<sub>6</sub>), papilla de manzana, plátano, fresa y frambuesa (P<sub>7</sub>), plátanos fritos (P<sub>8</sub>), alimento para lactantes orgánico (P<sub>9</sub>), colado de plátano (P<sub>10</sub>), plátanos deshidratados (P<sub>11</sub>) y avena en polvo para licuado (P<sub>12</sub>).

Se puede observar un amplificado en los carriles C<sub>+1</sub> y C<sub>+2</sub> en 180pb demostrando que los primers hibridaron adecuadamente en la zona de interés. En C<sub>+1</sub> se colocó muestra de ADN de maíz transgénico y en C<sub>+2</sub> muestra de ADN de canola transgénica. A pesar de que el carril perteneciente al Blanco no amplificó se repitió la prueba de PCR debido a la presencia de pequeños barridos y a que se utilizó una pareja de primers distinta al de las muestras anteriores, por lo cual era importante descartar que existiera alguna contaminación, al final se obtuvo el mismo resultado.



**Figura 40.** Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del terminador T-NOS en productos comerciales que contienen plátano (P<sub>1</sub> a P<sub>6</sub>). (MP) Marcador de peso molecular 100pb; (B) Blanco; (C<sub>+1</sub>: maíz transgénico y C<sub>+2</sub>: canola transgénica) Controles positivos; (P<sub>1</sub>) Puré de frutas (manzana y plátano); (P<sub>2</sub>) Plátanos con chile; (P<sub>3</sub>) Panecillos con plátano; (P<sub>4</sub>) Chips de plátano; (P<sub>5</sub>) Papilla de plátano (etapa 1); (P<sub>6</sub>) Papilla de plátano (etapa 2).



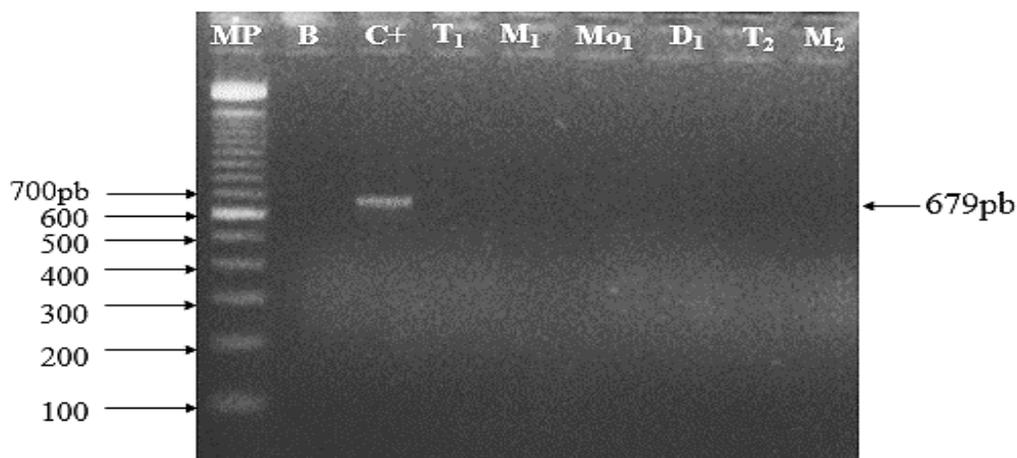
**Figura 41.** Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del terminador T-NOS en productos comerciales que contienen plátano ( $P_7$  a  $P_{12}$ ). (MP) Marcador de peso molecular 100pb; (B) Blanco; ( $C_{+1}$ : maíz transgénico y  $C_{+2}$ : canola transgénica) Controles positivos; ( $P_7$ ) Papilla de manzana, plátano, fresa y frambuesa; ( $P_8$ ) Plátanos fritos; ( $P_9$ ) Alimento para lactantes orgánico; ( $P_{10}$ ) Colado de plátano; ( $P_{11}$ ) Plátanos deshidratados; ( $P_{12}$ ) Avena en polvo para licuado.

Al igual que en las muestras de plátano fresco en ninguno de los 12 productos comerciales evaluados existió una amplificación señalando que no se ocupó el terminador T-NOS de *Agrobacterium tumefaciens* para modificar genéticamente el plátano que contienen los productos.

#### **Detección del promotor *Arabidopsis* en muestras de plátano fresco y productos comerciales**

Las muestras fueron evaluadas utilizando los primers del promotor *Arabidopsis*, este promotor no había sido empleado en trabajos anteriores pero Mohandas y Ravishankar (2016) y Smirnova et.al (2015) mencionan que *Arabidopsis thaliana* se ha utilizado para modificar genéticamente el plátano, también se han aplicado otros promotores derivados en los que se encuentran: TUB-1, ubq3, Ahas, act2p y HSP18.2. Para un mejor análisis de los resultados se realizaron dos geles de electroforesis con 6 muestras cada uno, como control positivo se utilizó ADN de una planta de *Arabidopsis*. En la Figura 42 se observa el gel de agarosa de las primeras 6 muestras de plátano fresco: plátano tabasco de un mercado local ( $T_1$ ), plátano macho ( $M_1$ ), plátano morado ( $Mo_1$ ) y plátano dominico de Mega Comercial ( $D_1$ ), plátano tabasco de Wal-Mart ( $T_2$ ) y plátano macho Wal-Mart ( $M_2$ ); la única banda de amplificación que se puede observar es la

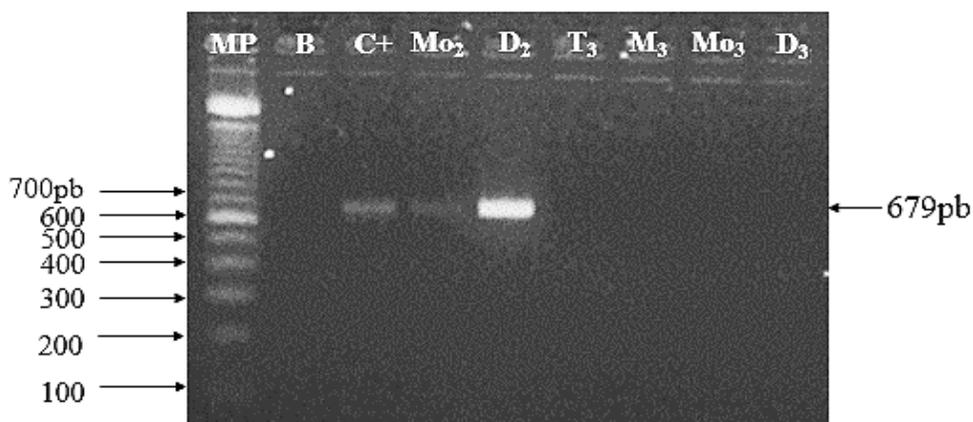
perteneciente al control positivo C+ en 679pb, el carril B se encuentra vacío lo que nos indica que no existe contaminación en las muestras y que la reacción se realizó adecuadamente.



**Figura 42.** Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del promotor *Arabidopsis* en 6 muestras de plátano fresco ( $T_1$ ,  $M_1$ ,  $Mo_1$ ,  $D_1$ ,  $T_2$  y  $M_2$ ). (MP) Marcador de peso molecular 100pb; (B) Blanco; (C+) Control positivo: *Arabidopsis*; ( $T_1$ ) Plátano tabasco de un mercado local; ( $M_1$ ) Plátano macho de Mega Comercial; ( $Mo_1$ ) Plátano morado de Mega Comercial; ( $D_1$ ) Plátano dominico de Mega Comercial; ( $T_2$ ) Plátano tabasco de Wal-Mart; ( $M_2$ ) Plátano macho Wal-Mart.

Las 6 muestras restantes se pueden observar en la Figura 43: plátano morado de Tabasco ( $Mo_2$ ), plátano dominico de Chiapas ( $D_2$ ), plátano tabasco de Soriana ( $T_3$ ), plátano macho de Veracruz ( $M_3$ ), plátano morado de un mercado local ( $Mo_3$ ) y plátano dominico de Campeche ( $D_3$ ); en este gel se aprecian 3 bandas visibles en 679pb, una de ellas corresponde al control positivo C+ y las otras dos a muestras de plátano fresco de distinta variedad: plátano morado proveniente de Tabasco y plátano dominico procedente de Chiapas siendo las dos principales entidades federativas productoras de plátano en México. El que hayan amplificado estas variedades indica que han sido modificadas genéticamente utilizando el promotor *Arabidopsis* para la expresión del gel insertado, es importante mencionar que se desconoce el tipo de gen. A pesar de que se colocó la misma cantidad de ADN la banda de amplificación de la muestra de plátano dominico  $D_2$  se encuentra muy marcada en comparación con las otras dos, la muestra de plátano morado  $Mo_2$  presenta la banda más tenue; sin embargo, no se puede asegurar que no ha sido modificada

genéticamente debido a que los primers amplificaron en la zona de interés y el carril B perteneciente al blanco demuestra que no existe contaminación en las muestras.

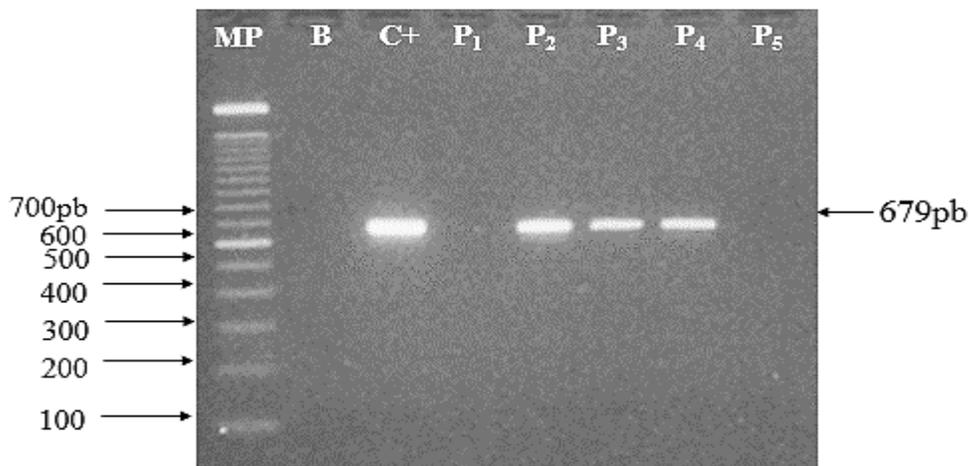


**Figura 43. Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del promotor *Arabidopsis* en 6 muestras de plátano fresco ( $Mo_2$ ,  $D_2$ ,  $T_3$ ,  $M_3$ ,  $Mo_3$  y  $D_3$ ). (MP) Marcador de peso molecular 100pb; (B) Blanco; (C+) Control positivo: *Arabidopsis*; ( $Mo_2$ ) Plátano morado de Tabasco; ( $D_2$ ) Plátano dominico de Chiapas; ( $T_3$ ) Plátano tabasco de Soriana; ( $M_3$ ) Plátano macho de Veracruz; ( $Mo_3$ ) Plátano morado de un mercado local; ( $D_3$ ) Plátano dominico de Campeche.**

Para finalizar, se detectó la presencia del promotor *Arabidopsis* en las muestras de ADN de los productos comerciales que contienen plátano en su composición, en la Figura 44 se presentan las primeras 5 muestras analizadas: puré de frutas (manzana y plátano) ( $P_1$ ), plátanos con chile ( $P_2$ ), panecillos con plátano ( $P_3$ ), chips de plátano ( $P_4$ ) y papilla de plátano (etapa 1) ( $P_5$ ); de las cuales 3 mostraron un amplificado en 679pb, las bandas pertenecen a las muestra de ADN de plátanos con chile ( $P_2$ ), panecillos con plátano ( $P_3$ ) y chips de plátano ( $P_4$ ) señalando que estos productos contienen plátano al cual se le ha insertado un gen para conferirle alguna característica y que se utilizó como promotor *Arabidopsis* para la expresión del mismo, a pesar de ello ninguno de los 3 productos lo menciona en su etiqueta, el control positivo también amplificó.

Según Smirnova et.al (2015) para conducir la expresión de un gen se ha empleado el promotor *Arabidopsis* en plátano, fresa, naranja y toronja, por otra parte, Farre (2013) menciona que este promotor es utilizado en tabaco para que las plantas acumulen mayores niveles de vitamina E y para mejorar los niveles de carotenoides en canola.

En la etiqueta de panecillos con plátano (P<sub>3</sub>) se puede observar que contiene aceite de canola en su composición dejando la posibilidad de que el amplificado se deba a que la canola este modificada genéticamente y no el plátano.

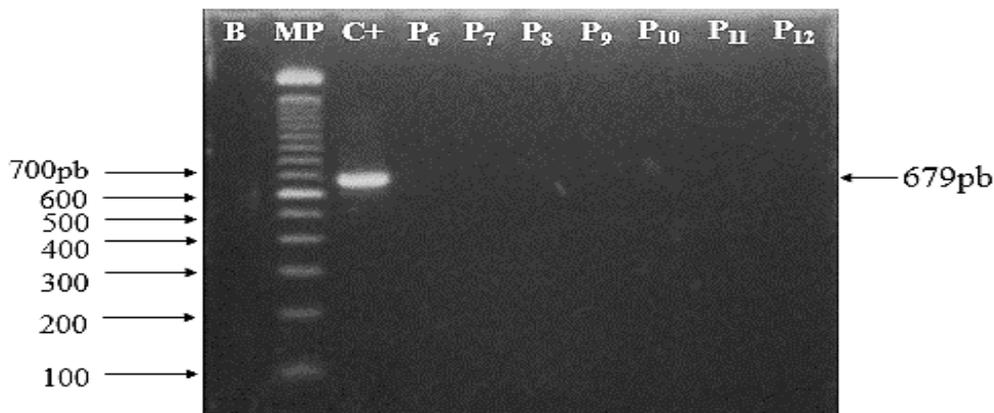


**Figura 44.** Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del promotor *Arabidopsis* en productos comerciales que contienen plátano (P<sub>1</sub> a P<sub>5</sub>). (MP) Marcador de peso molecular 100pb; (B) Blanco; (C+) Control positivo: *Arabidopsis*; (P<sub>1</sub>) Puré de frutas (manzana y plátano); (P<sub>2</sub>) Plátanos con chile; (P<sub>3</sub>) Panecillos con plátano; (P<sub>4</sub>) Chips de plátano; (P<sub>5</sub>) Papilla de plátano (etapa 1).

Las 7 muestras restantes: papilla de manzana, plátano, fresa y frambuesa (P<sub>7</sub>), plátanos fritos (P<sub>8</sub>), alimento para lactantes orgánico (P<sub>9</sub>), colado de plátano (P<sub>10</sub>), plátanos deshidratados (P<sub>11</sub>) y avena en polvo para licuado (P<sub>12</sub>) fueron presentadas en la Figura 45. No amplificaron para el promotor *Arabidopsis*, sólo se logra observar la banda de amplificación del control positivo en 679pb. Las PCR para detectar el promotor *Arabidopsis* en productos comerciales se realizaron de manera adecuada ya que el carril B no muestra la presencia de algún amplificado.

Mohandas y Ravishankar (2016) enlistan 36 promotores que se han empleado para modificar genéticamente plátano entre los que se encuentran: CaMV 35S, NOS, MAS, Ubi1, Adh1, Act1, REG-2, PR-10 y MusaDHN-1.

Por lo anterior, no se puede descartar la posibilidad de que no sean transgénicas porque pudieron utilizar otro promotor o terminador que no se utilizó en este trabajo.



**Figura 45.** Gel de agarosa al 2.5% a 60V para la detección del promotor *Arabidopsis* en productos comerciales que contienen plátano (P<sub>6</sub> a P<sub>12</sub>). (MP) Marcador de peso molecular 100pb; (B) Blanco; (C+) Control positivo: *Arabidopsis*; (P<sub>6</sub>) Papilla de plátano (etapa 2); (P<sub>7</sub>) Papilla de manzana, plátano, fresa y frambuesa; (P<sub>8</sub>) Plátanos fritos; (P<sub>9</sub>) Alimento para lactantes orgánico; (P<sub>10</sub>) Colado de plátano; (P<sub>11</sub>) Plátanos deshidratados; (P<sub>12</sub>) Avena en polvo para licuado.

Finalmente, en los Cuadros 21 y 22 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en este trabajo para la presencia (✓) y/o ausencia (✗) de los promotores CaMV y *Arabidopsis*, y del terminador T-NOS en plátano fresco y en productos comerciales que contienen plátano.

**Cuadro 21.** Resumen de resultados de la detección de OGM en plátano fresco.

Nomenclatura	Muestra de plátano	CaMV	<i>Arabidopsis</i>	T-NOS
T <sub>1</sub>	Tabasco de un mercado local	✗	✗	✗
T <sub>2</sub>	Tabasco de Wal-Mart	✗	✗	✗
T <sub>3</sub>	Tabasco de Soriana	✗	✗	✗
M <sub>1</sub>	Macho de Mega Comercial	✗	✗	✗
M <sub>2</sub>	Macho de Wal-Mart	✗	✗	✗
M <sub>3</sub>	Macho del Estado de Veracruz	✗	✗	✗
MO <sub>1</sub>	Morado de Mega Comercial	✗	✗	✗
MO <sub>2</sub>	Morado del Estado de Tabasco	✗	✓	✗
MO <sub>3</sub>	Morado de un mercado local	✗	✗	✗
D <sub>1</sub>	Dominico de Mega Comercial	✗	✗	✗
D <sub>2</sub>	Dominico del Estado de Chiapas	✗	✓	✗
D <sub>3</sub>	Dominico del Estado de Campeche	✗	✗	✗

**Cuadro 22. Resumen de resultados de la detección de OGM en productos comerciales que contienen plátano.**

Nomenclatura	Muestra	CaMV	Arabidopsis	T-NOS
P <sub>1</sub>	Puré de frutas (manzana y plátano)	×	×	×
P <sub>2</sub>	Plátanos con chile	×	✓	×
P <sub>3</sub>	Panecillos con plátano	×	✓	×
P <sub>4</sub>	Chips de plátano	×	✓	×
P <sub>5</sub>	Papilla de plátano (Etapa 1)	×	×	×
P <sub>6</sub>	Papilla de plátano (Etapa 2)	×	×	×
P <sub>7</sub>	Papilla de manzana, plátano, fresa y frambuesa	×	×	×
P <sub>8</sub>	Plátanos fritos	×	×	×
P <sub>9</sub>	Alimento para lactantes orgánico	×	×	×
P <sub>10</sub>	Colado de plátano	×	×	×
P <sub>11</sub>	Plátanos deshidratados	×	×	×
P <sub>12</sub>	Avena en polvo para licuado	×	×	×

## CONCLUSIONES

El diseño de primers para el plátano y el promotor *Arabidopsis* mediante programas bioinformáticos se realizó de manera adecuada al amplificar en la zona de interés de la especie, por lo cual pueden ser utilizados con las condiciones de PCR establecidas en trabajos posteriores.

Los primers diseñados no fueron específicos para plátano.

Los primers de CaMV y T-NOS fueron específicos para detectar organismos genéticamente modificados debido a que amplificaron en maíz transgénico y canola transgénica.

En todas las muestras de productos comerciales se obtuvieron los amplificados de 234pb de la secuencia del gen “MSAP-RGA” del plátano, corroborando su presencia en la composición del producto como lo declara la etiqueta.

La detección de organismos genéticamente modificados (OGM) fue adecuada debido a que se encontraron fragmentos de ADN del promotor *Arabidopsis* indicando una manipulación genética en 2 muestras de plátano fresco procedentes de Tabasco y Chiapas, y 3 productos comerciales que contienen plátano en su composición. Se esperaba la presencia de fragmentos de ADN del virus mosaico de la coliflor (CaMV) siendo el promotor más utilizado en plantas y del terminador de la nopalina sintetasa (T-NOS); sin embargo, se demuestra que no siempre se utiliza esta combinación y que el uso de diversos promotores y terminadores cada vez es más extenso.

En México no está permitida la liberación del cultivo de plátano genéticamente modificado; sin embargo, los resultados de este trabajo indican que puede existir una propagación de material vegetal de la planta de plátano genéticamente modificada y que esta información no se dé a conocer, incumpliendo así con la normatividad vigente en materia de bioseguridad como lo es la NOM-001-SAG/BIO-2014 que exige el etiquetado de cualquier material vegetal propagativo para evitar desviaciones de uso y tener un control de trazabilidad. Así mismo, no se cumple con la NOM-164-SEMARNAT/SAGARPA-2013 al no existir reportes de resultados que demuestren la seguridad de estos organismos y en los cuales se mencionen los posibles riesgos al medio ambiente.

Por otra parte, a pesar de que la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) se encarga de regular las actividades de utilización de organismos genéticamente modificados, de acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que actualmente en México se comercializan productos que han sido modificados genéticamente para conferirles alguna característica sin mostrar una etiqueta en donde se indique su presencia, por lo tanto las personas no pueden elegir si consumir tales productos o no.

## **Perspectivas**

- ❑ Diseñar primers que sean específicos para la identificación de plátano y establecer el programa de PCR.
- ❑ Utilizar el método de extracción de ADN empleado para otras especies vegetales que se deseen analizar y que contengan alto contenido de polisacáridos, proteínas o pigmentos que puedan inhibir la PCR.
- ❑ Con la metodología planteada se pueden seguir analizando muestras de diversas variedades de plátano para detectar organismos genéticamente modificados, ampliando el uso de otros promotores y terminadores.
- ❑ Además del análisis de detección se pueden realizar pruebas pertinentes y exhaustivas para mostrar la inocuidad alimentaria de los transgénicos que se consumen y de nuevos productos que se pretendan incorporar en el mercado.
- ❑ La incorporación de una norma estricta en México que exija la declaración en la etiqueta de los productos que contienen material genético en su composición para tener el control de su consumo en el país y dejar al alcance del consumidor la oportunidad de elección.

## GLOSARIO

■ **Ácido desoxirribonucleico (ADN):** Molécula básica de la herencia. El ADN está constituido por un esqueleto de azúcar-fosfato, ubicados hacia fuera en la cadena, mientras que hacia el centro se presentan las purinas y pirimidinas. El esqueleto está formado por uniones entre el radical fosfato y el carbono 3' de la molécula desoxirribosa y el carbono 5' de la siguiente. Las bases nitrogenadas se unen al carbono 1' del azúcar. De acuerdo al modelo de Watson y Crick, el ADN está formado por una doble hélice unida por puentes de hidrógeno entre pares de bases específicas (tiamina a adenina y citosina a guanina).

■ **Ácido ribonucleico (ARN):** Cadena de polinucleótidos, caracterizado por estar compuesto por azúcar (ribosa). Las moléculas de ARN son cadenas simples y tienen bajos pesos moleculares a comparación del ADN. Existen tres tipos de ARN: (1) ARN mensajero, (2) ARN ribosomal, y (3) ARN de transferencia. Ácido orgánico, polímero de los ribonucleótidos adenina, guanina, citosina y uracilo.

■ **Amplificación:** Creación de numerosas copias de un segmento del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

■ ***Arabidopsis:*** Género de plantas con flor de la familia de las crucíferas. *A. thaliana* se utiliza en investigación como planta modelo por el pequeño tamaño de su genoma, ya totalmente secuenciado, por su fácil manejo y por su corto tiempo de generación.

■ **Bioseguridad:** Se refiere a las medidas destinadas a evitar los riesgos para la salud y la seguridad humana y para la conservación del medio ambiente derivados del uso de organismos infecciosos o genéticamente modificados en investigación y en las prácticas comerciales.

■ **Biotecnología:** Toda aplicación tecnológica que utilice recursos biológicos, organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos.

■ **Biotecnología moderna:** Se entiende la aplicación de técnicas in vitro de ácido nucleico, incluidos el ácido desoxirribonucleico (ADN y ARN) recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u organelos, o la fusión de células más allá de la familia taxonómica, que supera las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o

de la recombinación y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional, que se aplican para dar origen a organismos genéticamente modificados.

■ **Bromuro de Etidio:** Colorante fluorescente que puede intercalarse entre pares de bases de ADN bicatenario, de ahí su aplicación generalizada para teñir ADN en los geles. El colorante es fluorescente cuando se expone a la luz UV. Se sabe que es un fuerte agente mutágeno y posiblemente también cancerígeno y teratógeno.

■ **Desnaturalización:** Modificar la conformación nativa de un ácido nucleico o, más frecuentemente, de una proteína mediante procesos físicos o químicos. Normalmente este proceso se acompaña de la pérdida de la actividad biológica.

■ **Electroforesis:** Técnica de biología molecular, de uso generalizado y de la que existen muchas variantes. Se utiliza para separar los componentes de mezclas complejas de macromoléculas. Para ellos, las muestras se someten a un campo eléctrico aplicado a través de una matriz porosa; bajo tales condiciones, las moléculas migran a velocidades que dependen de sus cargas eléctricas y/o pesos moleculares.

■ **Enzima:** Cualquiera de las sustancias proteicas elaboradas por las células vivas que intervienen en todas las reacciones químicas modificando su velocidad, por lo cual actúan como catalizadores biológicos.

■ **Gen:** Unidad básica hereditaria, que se localiza en los cromosomas de las células y se duplica durante cada división celular; este mecanismo permite la transmisión de los caracteres hereditarios del organismo progenitor a sus descendientes.

■ **Hibridación:** Apareamiento de dos hebras de ADN, a menudo de origen diferente, mediante el establecimiento de puentes de hidrógeno entre nucleótidos complementarios. Proceso de formación de un híbrido por polinización cruzada de plantas o por cruzamiento entre animales de diferentes tipos.

■ **Ingeniería genética:** Alteración selectiva y deliberada del genoma de un organismo, al introducir, modificar o eliminar genes específicos mediante técnicas de biología molecular.

▣ **Liberación en el medio ambiente:** El uso de un producto manipulado fuera de los límites de un confinamiento físico normal de un recinto cerrado, laboratorio, invernadero, fermentador o cualquier otra estructura cerrada, bajo las condiciones de bioseguridad que establezca la Secretaría.

▣ **Microlitro ( $\mu\text{L}$ ):** Unidad de volumen equivalente a la millonésima parte de un litro, representada por el símbolo  $\mu\text{L}$ . Equivalente a 1 milímetro cúbico.

▣ **Organismos genéticamente modificados (OGM):** Cualquier organismo vivo, con excepción de los seres humanos, que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna.

▣ **Par de bases (pb):** Las dos cadenas de una doble hélice de ácido nucleico se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno que se forman entre una purina y una pirimidina, una de cada cadena. La base A se empareja con la T en el ADN (con la U en el ARN); mientras que la G se empareja con la C tanto en el ADN como en el ARN. La longitud de una molécula de ácido nucleico se expresa generalmente por el número de pares de bases que contiene.

▣ **Plantas monocotiledóneas:** Se trata de plantas con flor. Son casi siempre herbáceas, donde la semilla está provista de un solo cotiledón u hoja inicial.

▣ **Ploidía:** Número de juegos completos de cromosomas por célula, p. ej., un juego: haploide, dos juegos: diploide, etc.

▣ **Primer o cebador:** Oligonucleótido de tamaño pequeño que, al hibridar con un molde de ADN de un hebra, le proporciona una estructura bicatenaria a partir de la cual, la ADN polimerasa sintetizará una nueva hebra de ADN para producir una molécula dúplex.

▣ **Promotor:** Región del ADN a la que se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción.

▣ **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Una de las técnicas más utilizadas de la biología molecular que permite la producción de millones de copias (amplificación) de una secuencia específica de ADN, siempre que se conozca la secuencia de pares de bases de cada extremo del ADN diana.

■ **Terminador:** Secuencia de ADN situada secuencia abajo inmediatamente después del segmento codificante de un gen y que es reconocida por la ARN polimerasa como una señal para detener la síntesis de ARNm.

■ **Transgén:** Secuencia génica aislada que se utiliza para transformar un organismo. A menudo, pero no siempre, el transgén proviene de una especie distinta a la del receptor.

## REFERENCIAS

1. Ahmad, M., Ali, A., Siddiqui, S., Kamaluddin y Abdin, M. (2017). Methods in Transgenic Technology. En: Abdin M. y Kiran U. (Ed.) *Plant Biotechnology: Principles and Applications*. Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.
2. Amador, M., Molina, D., Guillen, C. y Parajeles, E. (2015). Utilización del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis atacamensis* CIA-NE07 en el control del picudo del banano *Cosmopolites sordidus* en condiciones in vitro. *Agronomía Costarricense*, 39(3), 47-60. Recuperado de: [http://www.mag.go.cr/rev\\_agr/v39n03\\_047.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_agr/v39n03_047.pdf).
3. Bash, E. (2015). Una Mirada al banano transgénico desde la ecología política. *Alerta verde*. Recuperado de: <http://www.rallt.org/PUBLICACIONES/banano%20GM.pdf>.
4. Betancor, L., Gadea, M., Flores, K. e Instituto de Higiene Facultad de Medicina. (2008). *Genética bacteriana. Temas de Bacteriología y Virología Médica (3º ed)*. Montevideo: FEFMUR.
5. Bolívar, Z.F (2003). *Recomendaciones para el Desarrollo y Consolidación de la Biotecnología en México*. Distrito Federal, México: Academia Mexicana de Ciencias, A.C.
6. Brown, D. y McCallus, D. (2015). *Plasmid relationships and applications*. Salem Press Encyclopedia Of Health.
7. Calberto, G., Staver, C. y Siles, P. (2015). An assessment of global banana production and suitability under climate change scenarios. En: *Climate Change and Food Systems: Global Assessments and Implications for Food Security and Trade*, 266–291.
8. Canto, C. y Castillo, A. (2011). Un mil usos: el plátano. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana*, XXIV (1). Recuperado de: <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol24num1/articulos/platano/>.
9. Casquier, J. y Rodomiro, O. (2012). Las semillas transgénicas: ¿Un debate bioético? Derecho PUCP. *Revista de la Facultad de Derecho* (69), 281-300.
10. Champion, J. (1978). *El plátano. Colección agricultura tropical*. Barcelona: Blume.
11. Cheng, Y., Guo, W., Yi, H. y Pang, X. (2003). An Efficient Protocol for Genomic DNA Extraction. *International Society for Plant Molecular Biology*. (21), 177a-177g.

12. CIBIOGEM, Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados. (2015). *Acerca del Protocolo de Cartagena en México*. Recuperado de: <http://conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/protocolo-de-cartagena>.
13. COFEPRIS, Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (2013). *¿Qué es un organismo genéticamente modificado?*. Recuperado de: <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/OGMS/Que-son-ogms-.aspx>.
14. COFEPRIS, Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (2016). *Organismos genéticamente modificados. Acciones y programas*. Recuperado de: <http://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/organismos-geneticamente-modificados?idiom=es>.
15. CONACYT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (2015a). *Acerca de la CIBIOGEM. Coordinación Intersecretarial*. Recuperado de: <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/cibiogem/acerca-de-la-cibiogem>.
16. CONACYT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (2015b). *Estadísticas comparativas entre pruebas de campo y permisos*. Recuperado de: <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/estadisticas-comparativo-pruebas-de-campo-y-permisos>.
17. COVECA, Comisión Veracruzana de Comercialización Agro-pecuaria. (2010). *Monografía del plátano*. Veracruz, México, 2-6.
18. Crane, J. y Balerdi, C. (2015). Los plátanos en Florida. *Horticultural Science*. Recuperado de: <http://edis.ifas.ufl.edu/>.
19. De Guglielmo, C., Zoraya, M. y Fernández, D. (2016). Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVIII, 119-128. DOI: 10.15446.
20. Demeke, T. y Jenkins, G. (2010). *Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits*. DOI: <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s00216-009-3150-9>.
21. Domingues, L. (2017). *PCR: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. University of Minho, Portugal: Humana Press.
22. Domínguez, D., El, C. y Ti, P. (2012). *Obtención de plantas transgénicas. Transformación de Células Vegetales*. Recuperado de: <http://ciencia-en-red.fisimur.org>.

23. Drouin, R., Dridi, W. y Samassekou, O. (2007) DNA Polymerases for PCR Applications. En: Polaina, J. (Ed.) *Industrial Enzymes*. Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.
24. Eduard, C. (2008). *Reacción En Cadena De La Polimerasa (PCR)*. UNED.
25. FAOSTAT, Estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2017). *Cultivos: Cantidades de producción de bananos*. Recuperado de: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>.
26. Farre, G. (2013) Biotechnology and Nutritional Improvement of Crops. En: Christou, P. (Ed.) *Sustainable Food Production*. Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.
27. FHIA, Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. (2017) *Programa de Banano y plátano. Investigación y proyectos productivos*. Recuperado de: [http://fhia.org.hn/htdocs/banano\\_y\\_platano.html](http://fhia.org.hn/htdocs/banano_y_platano.html).
28. FIBAO, Fundación Pública Andaluza para la Investigación Biosanitaria en Andalucía Oriental-Alejandro Otero. (2007). *Medicina Molecular*. Recuperado de: <http://medmol.es/tecnicas/28/>.
29. OECD, Organization for Economic Co-operation and Development (2009). Consensus Document on the Biology of Bananas and Plantains (*Musa spp.*). *OECD Environment, Health and Safety Publications*, (48). Recuperado de: <http://www.oecd.org/science/biotrack/46815346.pdf>.
30. FND, Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero (2014). *Panorama del Plátano*. Recuperado de: <https://www.gob.mx/fnd>.
31. Galan, S. (1992). *Los Frutales Tropicales en los Subtrópicos II. Plátano (Banano)*. Madrid: Mundi-Prensa.
32. Gebbie, L. (2014) Genomic Southern Blot Analysis. En: Henry, R. (Ed.) *Cereal Genomics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 1099. Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.
33. Ghag, S., y Ganapathi, T. (2017). Genetically modified bananas : To mitigate food security concerns. *Scientia Horticulturae*, 214, 91-98. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.023>.

34. Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J. y Tripathy, B. (2017) Fundamentals of Recombinant DNA Technology. En: *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*. Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.
35. Gutiérrez, G., Medrano, R. y Xoconostle, C. (2015). Estado actual de los cultivos genéticamente modificados en México y su contexto internacional. *CINVESTAV, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional*. Recuperado de: <http://www.conacyt.gob.mx/>.
36. Guzmán, P. (2011). El nematodo barrenador (*Radopholus similis* [COBB] THORNE) del banano y plátano. *Revista Luna Azul*, (33), 137-153.
37. Harris, R. y Ness, B. P (2016). Restriction enzymes. Salem Press Encyclopedia.
38. Herráez, A. (2012). *Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, técnicas y aplicaciones en Ciencias de la Salud (2º ed.)*. España: Elsevier.
39. Hippolyte, I., Jenny, C., Gardes, L., Bakry, F., Rivallan, R., Pomies, V. y Perrier, X. (2012). Foundation characteristics of edible *Musa* triploids revealed from allelic distribution of SSR markers. *Annals of Botany*, 109(5), 937–951. DOI: <http://doi.org/10.1093/aob/mcs010>.
40. Huerta, O. (2016). *Detección de frutos de papaya (Carica papaya L.) genéticamente modificados, comercializados en México por reacción en cadena de la polimerasa*. Tesis de Ingeniería. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
41. ICA, Instituto Colombiano Agropecuario. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo del plátano (Musa spp.) - Medidas para la temporada invernal*. Bogotá: ICA.
42. INIFAP, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. (2005). *Paquete tecnológico para el cultivo del Plátano*. Recuperado de: [www.inifap.gob.mx](http://www.inifap.gob.mx).
43. Ismail, B., Reuhs, B. y Nielsen, S. (2010) Analysis of Food Contaminants, Residues, and Chemical Constituents of Concern. En: Nielsen, S. (Ed.) *Food Analysis*. Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.
44. Karamollaoglu, İ., Öktem, H. y Mutlu, M. (2009). QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs). *Biochemical Engineering Journal*, 44, 142–150. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.bej.2008.11.011>.
45. Kepler, A. y Rust, F. (2011). *The world of bananas in Hawai'i: then and now. Traditional pacific and global varieties, cultures, ornamentals, health and recipes*.

- Recuperado de: <https://www.amazon.com.mx/World-Bananas-Hawaii-Traditional-Ornamentals/dp/0983726604>.
46. Knebelsberger, T. y Stöger, I. (2012). DNA Extraction, Preservation, and Amplification. En: Kress, W. (Ed.) *DNA Barcodes. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.
  47. Kolmodin, L. y Birch, D. (2002). Polymerase Chain Reaction. En: Chen, B. (Eds.) *PCR Cloning Protocols. Methods in Molecular Biology, Humana Press, 192*. Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.
  48. Lazo, V. y Mu, A. (2012). Evaluación experimental del clorotalonil en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en plantaciones de plátano (*Musa spp* .AAB), *Dialnet*, 24(2), 127–134.
  49. Ley DOF 18-03-2005 (2005). Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Recuperado de: <http://www.cofepris.gob.mx/MJ/Paginas/Leyes.aspx>.
  50. Loeffelholz, M. y Deng, H. (2006). PCR and Its Variations. En: *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. DOI: [https://doi.org/10.1007/0-387-32892-0\\_11](https://doi.org/10.1007/0-387-32892-0_11).
  51. López, M. (2011). *Autenticación de Maíz Tradicional y Genéticamente Modificado en Productos Comerciales en México*. Tesis de Ingeniería. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
  52. Mafra, I., Ferreira, I. y Oliveira, M. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227(3), 649-665. DOI: <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s00217-007-0782-x>.
  53. Magaña, G., Islas, O., Yepiz, P. y Calderón, A. (2003). Detección por PCR de un transgen en productos de soya utilizados para formular alimentos. *Fitotecnia Mexicana*, 26(4), 263-269.
  54. Manzo, S., Orozco, S. y Martínez, B. (2016). Enfermedades de importancia cuarentenaria y económica del cultivo de banano (*Musa spp.*) en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(2), 89-107.
  55. MAPAMA, Ministerio de agricultura y pesca, alimentación y medio ambiente (2013). *El plátano*. Recuperado de: <http://www.mapama.gob.es/es/>.
  56. Marchelli, R., Tedeschi, T. y Tonelli, A. (2012). DNA Analyses in Food Safety and Quality: Current Status and Expectations. En: Spoto, G. (Ed.) *Detection of Non-*

- Amplified Genomic DNA. Soft and Biological Matter.* Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.
57. Marín, D., Romero, R., Guzmán, M. y Sutton, T. (2003). Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease* 87(3), 208-222. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.3.208>.
  58. Mathur, V., Javid, L., Kulshrestha, S., Mandal, A. y Reddy, A. (2017). World Cultivation of Genetically Modified Crops: Opportunities and Risks. En: Lichtfouse, E. (Ed.) *Sustainable Agriculture Reviews*. Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.
  59. McIver, C., Jacques, C., Chow, S., Munro, S., Scott, G., Roberts, J., Craig, M. y Rawlinson, W. (2005). Development of multiplex PCRs for detection of common viral pathogens and agents of congenital infections. *J. Clin. Microbiol*, 43, 5102–5110. DOI: 10.1128/JCM.43.10.5102–5110.2005.
  60. McKeon, T. (2003). Genetically modified crops for industrial products and processes and their effects on human health. *Trends in Food Science y Technology*, 14(5-8), 229-241. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0924-2244\(03\)00071-2](http://doi.org/10.1016/S0924-2244(03)00071-2).
  61. Milena, S., Moreno, C., Inés, G. y Gil, E. (2016). Genetic Modifications, Their History and Ethical Implications in the Contemporary Scientific Field, 19, 13–26.
  62. MINAGRI, Ministerio de Agricultura y Riesgo. (2014). *Tendencias de la producción y el comercio del banano en el mercado internacional y nacional*. Recuperado de: <http://repositorio.minagri.gob.pe/handle/MINAGRI/26>.
  63. Mohandas, S. y Ravishankar, K. (2016). *Banana: Genomics and Transgenic Approaches for Genetic Improvement*. Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.
  64. Mondragón, A. (2001). *Composición química de 4 alimentos de alto consumo en la República Mexicana*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
  65. Moreiras, T., Carbajal, A. y Cuadrado, V. (2013). *Tablas De Composición De Alimentos (Ciencia Y Técnica)*. Madrid: Pirámide.
  66. Nain, G., Lim, M., González, J., Ortiz, J., Aguilar, M. y Sandoval, J. (2002). *Generación de banano (C.V. Gran Nain) transgénico conteniendo genes antifúngicos para conferir resistencia contra Sigatoka Negra*. Colombia: AUGURA.
  67. Nandeshwar, S. (2015). Genetically Modified Crops. En: Bahadur, B. (Ed.) *Plant Biology and Biotechnology*. Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.

68. Nelson, S. (2006). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. *Permanent Agriculture Resources (PAR)*, 1–18.
69. Office of the Gene Technology Regulator. (2008). The Biology of Musa (Banana). *Australian environment, 1*. Recuperado de: <http://www.ogtr.gov.au/>.
70. OMS, Organización Mundial de la Salud. (2005). Biotecnología moderna de los alimentos, salud y desarrollo humano: estudio basado en evidencias. *Departamento De Inocuidad De Los Alimentos\* Organización Mundial De La Salud*, 1–97. DOI: <http://doi.org/ISBN 9241593059>.
71. Ouyang, B., Gu, X. y Holford, P. (2017). Plant genetic engineering and biotechnology: a sustainable solution for future food security and industry. *Plant Growth Regulation*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0300-5>.
72. Padilla, C., Diez, J., Martínez, E., Bárcena, J. y García, C. (2011). Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de ADN plasmídico. *Departamento de Bioquímica Y Biología Molecular*, 1–8.
73. Pantoja, A., Álvarez, E., Gañan, L. y Ceballos, G. (2013). *Estado del arte y opciones de manejo del Moko y la Sigatoka negra en América Latina y el Caribe*. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/a-as124s.pdf>.
74. Peña, O. (2014). Nuevas tecnologías en el control de la seguridad alimentaria (10° ed.). *3Ciencias Tecnología*, 3(3), 180-191. Recuperado de: <https://www.3ciencias.com>.
75. Perrier, X., De Langhe, E., Donohue, M., Lentfer, C., Vrydaghs, L., Bakry, F. y Denham, T. (2011). Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa spp.*) domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(28), 11311–11318. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1102001108>.
76. Pillay, M. y Tripathi, L. (2007). Banana. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*, 4, 281–297. Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.
77. Podzorski, R., Loeffelholz, M. y Hayden, R. (2006). Detection and Characterization of Molecular Amplification Products: Agarose Gel Electrophoresis, Southern Blot Hybridization, Restriction Enzyme Digest Analysis, and Enzyme-Linked Immunoassay. En: *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.

78. ProMUSA. (2016). *Diversity of banana cultivars portal*. ProMUSA. Recuperado de: [http://www.promusa.org/Diversity+of+banana+cultivars+portal?page\\_ref\\_id=15](http://www.promusa.org/Diversity+of+banana+cultivars+portal?page_ref_id=15).
79. ProMUSA. (2017a). *Morphology of the banana plant*. ProMUSA. Recuperado de: <http://www.promusa.org/Morphology+of+banana+plant>.
80. ProMUSA. (2017b). *Banana leaf*. ProMUSA. Recuperado de: <http://www.promusa.org/Banana+leaf>.
81. Qaim, M. (2016). *Genetically Modified Crops and Agricultural Development*. DOI: 10.1057/9781137405722.
82. Radonic, M. (2010). *Nuevas estrategias para la transformación y expresión de genes de interés en girasol*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
83. Ramírez, E., Gómez, H., Francisco, L. y Mayorga, J. (2011). *Manual de producción de banano para la región del Soconusco. Estrategias para el manejo de la Sigatoka negra*. DOI: 978-607-425-541-6.
84. Rimache, A. (2008). *Cultivo de plátano y banano*. Lima: Macro.
85. Robinson, J. y Galán, S. (2012). *Plátanos y bananas*. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias.
86. Saeed, T. y Shahzad, A. (2016). Basic Principles behind Genetic Transformation in Plants. En: Shahzad, A. (Ed.) *Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers*. Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.
87. Sambrook, J. y Russel. (2001). *Molecular cloning a laboratory manual (3° ed.)*. E.U.A: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
88. Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. (2000). Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica, Montreal.
89. Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. (2011a). Protocolo de Nagoya–Kuala Lumpur sobre la Responsabilidad y Compensación Suplementario al Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología, Montreal.
90. Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. (2011b). Protocolo de Nagoya sobre Acceso a los Recursos Genéticos y Participación Justa y Equitativa en los

Beneficios que se Deriven de su Utilización al Convenio sobre la Diversidad Biológica, Montreal.

91. SEMARNAT, Secretaría de medio ambiente y recursos naturales. (2008). Reglamento de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Diario Oficial de la Federación.
92. SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2016). *Regulación Nacional de OGM's*. Recuperado de: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/regulacion-nacional-de-ogm>.
93. Serrato, D., Flores, R., Aportela, C. y Sierra, P. (2014). *PCR: reacción en cadena. Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos Y Prácticos*. Recuperado de: <https://www.researchgate.net>.
94. SIAP, Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera. (2012). *Plátanos y bananas*. Recuperado de: <http://infosiap.siap.gob.mx/siaprendes/contenidos/2/04-platano/contexto-2.html>.
95. SIAP, Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera. (2016). *Atlas Agroalimentario 2016*. México: SIAP.
96. Silencers, E., Tata, Á. y Caat, Á. (2014). *Plant Promoters: An Approach of Structure and Function*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9713-1>.
97. Simmonds, N. (1973). *Los Plátanos*. Barcelona, España: Blume.
98. Singh, R. y Gupta, R. (2017). *Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future*. Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.
99. Smirnova, O., Tishchenko, E., Ermakov, A. y Shummy, V. (2015). Promoters for Transgenic Horticultural Plants. En: Kanayama, Y. (Ed.) *Abiotic Stress Biology in Horticultural Plants*. Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.
100. Temple, J., Wilson, T. y Jacobs, D. (2012). Nutritional Health. Strategies for Disease Prevention (3° ed.). *Humana Press*. DOI: 10.1007/978-1-61779-894-8.
101. Turner, D., Fortescue, J., y Thomas, D. (2007). Environmental physiology of the bananas (*Musa spp.*). *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(4), 463–484. DOI: <http://doi.org/10.1590/S1677-04202007000400013>.

102. Valerio, C. y De García, E. (2008). Transformación genética de plátano (*Musa sp. cv. hartón*) mediante biobalística aplicada a tejidos meristemáticos. *Interciencia*, 33(3), 225–231.
103. Viedma, I., López, N., Serrano, M. y Balanza, G. (2014). Actitud del consumidor frente a los alimentos genéticamente modificados. Universidad de Valladolid. *Revista Digital de sociología del sistema tecnocientífico*, (4), 1-15.
104. Waters, D. y Shapter, F. (2014). The Polymerase Chain Reaction (PCR): General Methods. En: Henry, R. (Ed.) *Cereal Genomics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Recuperado de: <http://www.springer.com/la/>.
105. Westermeier, R. (2016). *Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*. DOI: 10.1002/3527603468.
106. Xu, W. (2016). Development of Accurate Nucleic Acid Detection Technology for Target Quantification. En: *Functional Nucleic Acids Detection in Food Safety*. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-981-10-1618-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-10-1618-9_8).

## ANEXOS

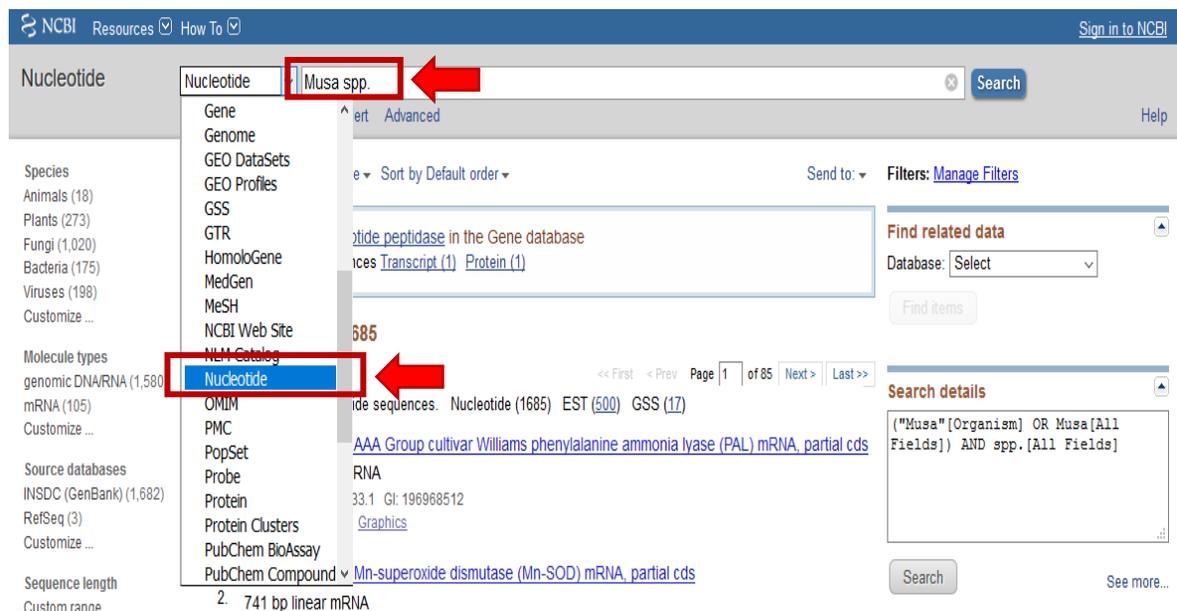
### Anexo 1. Diseño de Primers de plátano

#### 1. Ingresar a la base de datos GenBank del NCBI.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).



#### 2. Seleccionar la base de datos correspondiente a nucleótidos y colocar el nombre de la especie de interés, procediendo a buscar.



3. Elegir uno de los enlaces proporcionados.



Sequence length  
Custom range...  [Musa acuminata Mn-superoxide dismutase \(Mn-SOD\) mRNA, partial cds](#)  
2. 741 bp linear mRNA  
Accession: HQ440215.1 GI: 332002323  
Release date  
Custom range... [GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

Revision date  
Custom range...  [Musa acuminata subsp. zebрина MSAP-RGA gene, partial cds](#)  
3. 249 bp linear DNA  
Accession: DQ264397.1 GI: 81248589  
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

[Clear all](#)

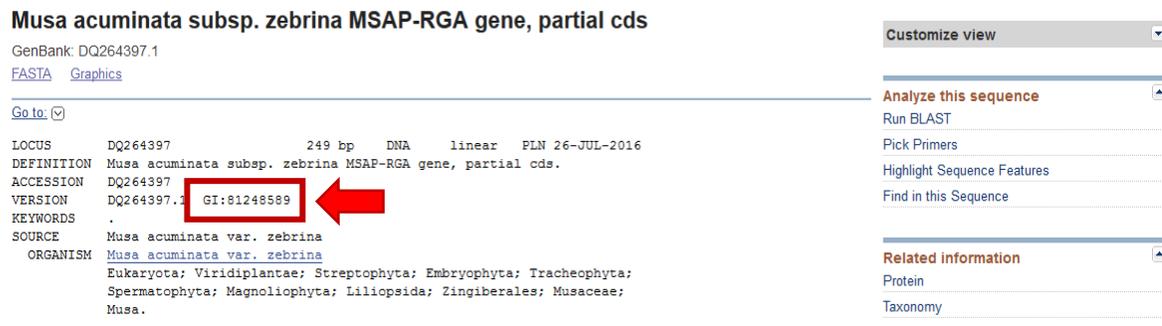
[Show additional filters](#)  [Musa acuminata subsp. burmannicoides isolate Calcutta 4 centromere-specific histone 3 \(CENH3\) mRNA, complete cds](#)  
4. 504 bp linear mRNA

Find items

Search details  
("Musa"[Organism] OR Musa[All Fields]) AND spp.[All Fields]

Search See more...

4. Copiar el número de identificación GI (81248589) que se encuentra en la parte superior.



**Musa acuminata subsp. zebрина MSAP-RGA gene, partial cds**  
GenBank: DQ264397.1  
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS DQ264397 249 bp DNA linear PLN 26-JUL-2016  
DEFINITION Musa acuminata subsp. zebрина MSAP-RGA gene, partial cds.  
ACCESSION DQ264397  
VERSION DQ264397.1 GI: 81248589  
KEYWORDS .  
SOURCE Musa acuminata var. zebрина  
ORGANISM Musa acuminata var. zebрина  
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Zingiberales; Musaceae;  
Musa.

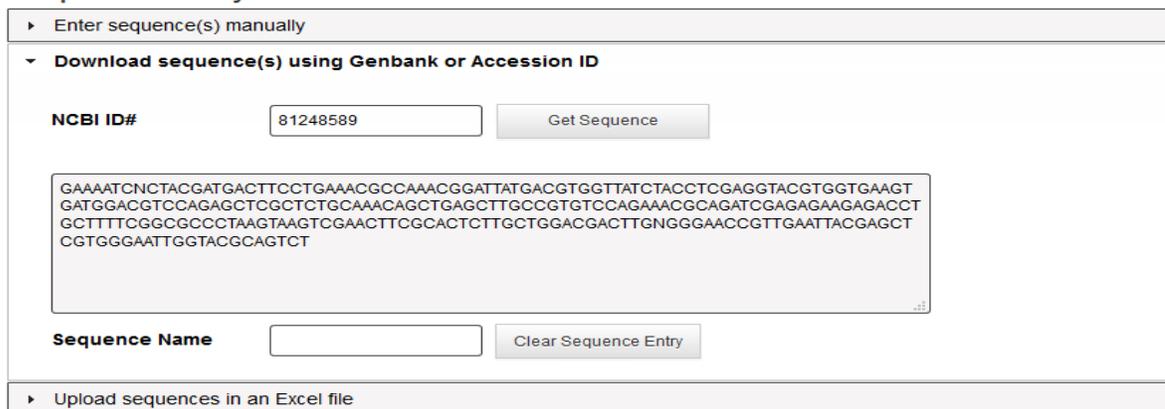
Customize view

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

Related information  
Protein  
Taxonomy

5. Abrir el programa Primerquest Tool y pegar el número de identificación GI en el apartado NCBI ID#, procediendo a obtener la secuencia. Elegir como diseño “PCR 2 Primers”.

Sequence Entry



Enter sequence(s) manually

Download sequence(s) using Genbank or Accession ID

NCBI ID#

```
GAAAATCNCTACGATGACTTCCTGAAAACGCCAAACGGATTATGACGTGGTTATCTACCTCGAGGTACGTGGTGAAGT
GATGGACGTCCAGAGCTCGCTCTGCAAAACAGCTGAGCTTGCCGTGTCCAGA AACGCAGATCGAGAGAAGAGACCT
GCTTTTCGGCGCCCTAAGTAAGTCGAACTTCGCACTCTTGCTGGACGACTTGNNGGAACCGTTGAATTACGAGCT
CGTGGGAATTGGTACGCAGTCT
```

Sequence Name

Upload sequences in an Excel file

Choose Your Design



PCR 2 Primers  qPCR 2 Primers

←  Primers + Probe  Intercalating Dyes

6. Elegir un set de secuencia de primers en donde la T<sub>m</sub> sea igual, el contenido de G-C sea del 50% y la longitud se encuentre entre 18 y 25pb (de preferencia que el par no rebase una diferencia de 3 nucleótidos). Dar click en la opción izquierda para ver de forma detallada.

Set 2 Sequence 1

Amplicon Length: 234  
[View Assay Details](#) 

		Start	Stop	Length	T <sub>m</sub>	GC%
Forward	<a href="#">Hairpin</a> <a href="#">Blast</a>	16	36	20	62	50
Reverse		231	250	19	62	52.6

Parameter Set: General PCR (Primers only)  
 Sequence Name: Sequence 1  
 Amplicon Length: 234

		Start	Stop	Length	T <sub>m</sub>	GC%
Forward	<a href="#">GACTTCCTGAAACGCCAAAC (Sense)</a>	16	36	20	62	50
Reverse	<a href="#">AGACTGCGTACCAATCCC (AntiSense)</a>	231	250	19	62	52.6

Base	Sequence
1	GAAAATCNCCTACGATGACTTCCTGAAACGCCAAACGGATTATGACGTGGTTATCTACCTCGAGGTACGTGGTGAAGTGATGGACGTCAGAGCTCGCTCT
101	GCAAAACAGCTGAGCTTGCCGTGTCCAGAAACGAGATCGAGAGAAGAGACCTGCTTTTCGGCGCCCTAAGTAAGTCGAACTTCGCACTCTTGCTGGACGA
201	CTTGNGGGAACCGTTGAATTACGAGCTCGTGGGAATTGGTACGCAGTCT

7. Seleccionar la opción “Hairpin” de cada primer para verificar que la T<sub>m</sub> de las estructuras sean distintas al T<sub>m</sub> de la PCR, en caso de ser parecidas no se podrán utilizar.

### Primer frontal

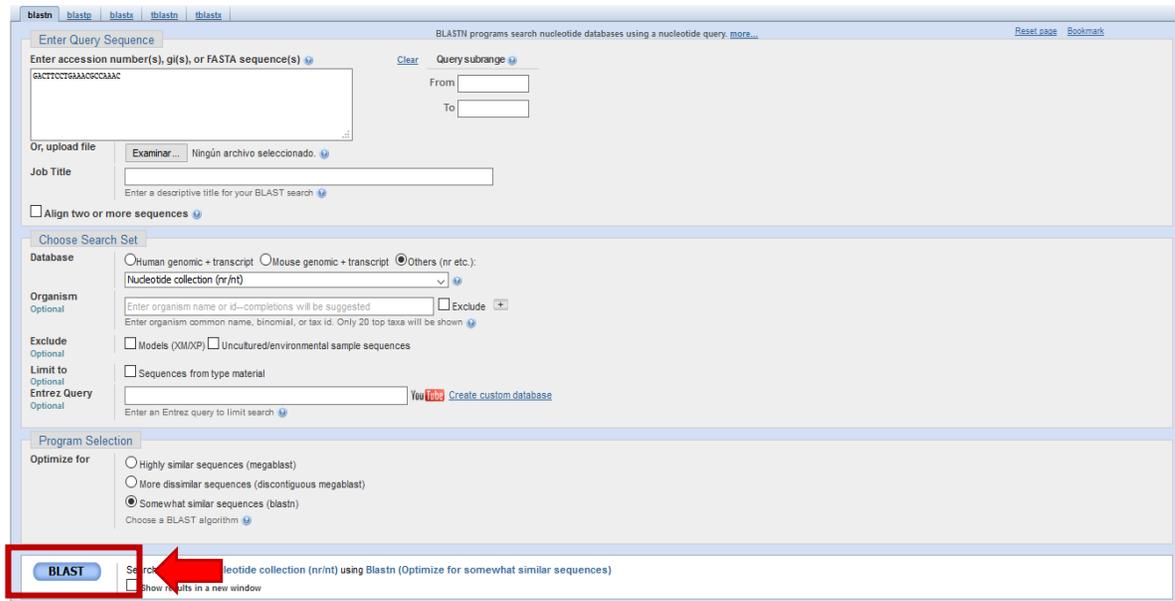
Structure Name	Image	ΔG (kcal.mole <sup>-1</sup> )	T <sub>M</sub> (°C)
1		1.35	1.5
2		1.55	-3.3
3		1.74	-7.2
4		1.77	-12.3
5		2.2	-186.5

### Primer reverso

Structure Name	Image	ΔG (kcal.mole <sup>-1</sup> )	T <sub>M</sub> (°C)
1		1.03	3.5
2		1.22	-0.8
3		1.31	-31.6
4		1.32	-17.2
5		1.88	7.2

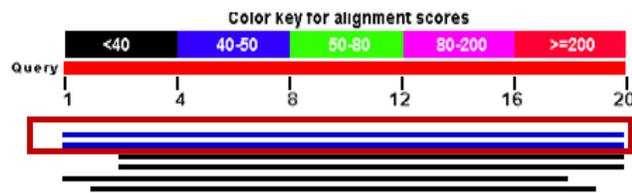
8. Dar click en la opción “Blast” de cada primer para corroborar que sólo amplifica en la especie de interés.

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward <a href="#">Hairpin</a> <b>Blast</b>	16	36	20	62	50
Reverse	231	250	19	62	52.6



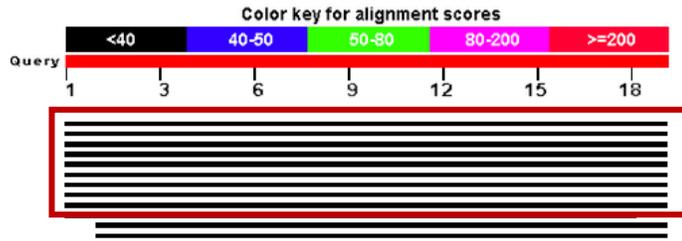
9. Verificar que la especie de interés sea la única que se encuentre al 100% en el apartado de “Query Cover” o en todo caso que no amplifique para especies cercanas.

### Primer frontal



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Musa acuminata subsp. malaccensis disease resistance protein RPS2-like (LOC103990283).mf</a>	40.1	40.1	100%	0.21	100%	<a href="#">gi 695040144 XM_009409362.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Musa acuminata subsp. zebryna MSAP-RGA gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.21	100%	<a href="#">gi 81248589 DQ264397.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Brassica napus protein QUIRKY-like (LOC106405004).mRNA</a>	36.2	36.2	90%	3.3	100%	<a href="#">gi 923841776 XM_013845633.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Brassica oleracea var. oleracea protein QUIRKY (LOC106309665).mRNA</a>	36.2	36.2	90%	3.3	100%	<a href="#">gi 922548472 XM_013746745.1</a>

## Primer reverso



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rallus elegans clone KiRa1a microsatellite sequence</a>	38.2	38.2	100%	0.84	100%	<a href="#">gij510787391 KC990034.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Phyllostachys edulis SSR marker 45 genomic sequence</a>	38.2	38.2	100%	0.84	100%	<a href="#">gij304436109 HM218996.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Eimeria maxima AFLP fragment Em_W163, strain Weybridge</a>	38.2	38.2	100%	0.84	100%	<a href="#">gij332205796 FN823302.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Eimeria maxima AFLP fragment Em_H299, strain Houghton</a>	38.2	38.2	100%	0.84	100%	<a href="#">gij332205779 FN823285.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Eimeria maxima AFLP fragment Em_H192, strain Houghton</a>	38.2	38.2	100%	0.84	100%	<a href="#">gij332205768 FN823274.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Eimeria maxima AFLP fragment Em_H173, strain Houghton</a>	38.2	38.2	100%	0.84	100%	<a href="#">gij332205766 FN823272.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTKKA1-c19</a>	38.2	38.2	100%	0.84	100%	<a href="#">gij259048794 FN552505.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Apis mellifera AFLP marker E5M3445-1.2 genomic sequence</a>	38.2	38.2	100%	0.84	100%	<a href="#">gij71483228 DQ147752.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Musa acuminata subsp. zebrina MSAP-RGA gene, partial cds</a>	38.2	38.2	100%	0.84	100%	<a href="#">gij81248589 DQ264397.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pilosocereus machrisii microsatellite Pmac180 sequence</a>	36.2	163	94%	3.3	100%	<a href="#">gij953067359 KR478588.1</a>

10. Regresar al Gene-Bank para buscar y asegurar la existencia de las secuencias de los primers anteriormente diseñados.

GenBank Send Change region shown

### Musa acuminata subsp. zebrina MSAP-RGA gene, partial cds

GenBank: DQ264397.1  
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS	DQ264397	249 bp	DNA	linear	PLN 26-JUL-2016
DEFINITION	Musa acuminata subsp. zebrina MSAP-RGA gene, partial cds.				
ACCESSION	DQ264397				
VERSION	DQ264397.1 GI:81248589				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Musa acuminata var. zebrina				
ORGANISM	Musa acuminata var. zebrina				
	Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;				
	Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Zingiberales; Musaceae;				
	Musa.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 249)				
AUTHORS	Gimenez,C.A., Palacios,G.A. and Colmenares,M.A.				
TITLE	Methylated DNA sequences associated with Mycosphaerella fijiensis toxins tolerance				
JOURNAL	Unpublished				

Customize view ▼

---

Analyze this sequence ▲

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence ←

---

Related information ▲

Protein

Taxonomy

---

Recent activity ▲

[Turn Off](#) [Clear](#)

11. Finalmente colocar la secuencia del primer frontal y reverso, procediendo a buscar dentro de la secuencia del gen.

### Primer frontal (5'-GACTTCCTGAAACGCCAAAC-3')

```

ORIGIN
  1 gaaaatcnc t acgatgactt cctgaaacgc caaacggatt atgacgtggt tatctacctc
  61 gaggtacgtg gtgaagtgat ggacgtccag agctcgctct gcaaacagct gagcttgccg
  121 tgtccagaaa cgcagatcga gagaagagac ctgcttttcg gcgccctaag taagtogaac
  181 ttgcactctt tgctggacga cttgnnggaa ccgttgaatt acgagctcgt gggaattggt
  241 acgcagtct
//

```

Search results for GACTTCCTGAAACGCCAAAC (1 of 1) in DQ264397 : 16-35

### Primer reverso (5'-AGACTGCGTACCAATTCCC-3')

```

ORIGIN
  1 gaaaatcnc t acgatgactt cctgaaacgc caaacggatt atgacgtggt tatctacctc
  61 gaggtacgtg gtgaagtgat ggacgtccag agctcgctct gcaaacagct gagcttgccg
  121 tgtccagaaa cgcagatcga gagaagagac ctgcttttcg gcgccctaag taagtogaac
  181 ttgcactctt tgctggacga cttgnnggaa ccgttgaatt acgagctcgt gggaattggt
  241 acgcagtct
//

```

Search results for GGGAATTGGTACGCAGTCT (1 of 1) in DQ264397 : 231-249

### Diseño de Primers del promotor *Arabidopsis*

El diseño de primers de *Arabidopsis* se realizó siguiendo el procedimiento anterior. El código de identificación GenBank de la secuencia que se utilizó es: X79702.1.

## Anexo 2. Calculo de la temperatura de hibridación (Tm).

Para poder establecer los programas de PCR a usar, se calculó la temperatura de hibridación de cada primer mediante la siguiente ecuación:

$$Tm = [((\text{número de G} + \text{número de C})4) + ((\text{número de A} + \text{número de T})2)] - 5$$

Procediendo a realizar un promedio de los valores obtenidos. Los resultados se muestran a continuación:

### ■ Primers de plátano

Primer frontal (5'-GACTTCCTGAAACGCCAAAC-3')

$$Tm \text{ frontal} = [((3+7) 4) + ((7+3)2)] - 5 = 55^{\circ}\text{C}$$

Primer reverso (5'-AGACTGCGTACCAATTCCC-3')

$$Tm \text{ reverso} = [((3+7) 4) + ((5+4)2)] - 5 = 53^{\circ}\text{C}$$

$$Tm = \frac{(Tm \text{ frontal})(Tm \text{ reverso})}{2} = \frac{55^{\circ}\text{C} + 53^{\circ}\text{C}}{2} = 54^{\circ}\text{C}$$

### ■ Primers de Arabidopsis.

Primer frontal (5'- GCGCAGTACAAATAAACAGTGG-3')

$$Tm \text{ frontal} = [((6+4) 4) + ((9+3)2)] - 5 = 59^{\circ}\text{C}$$

Primer reverso (5'- TCCGAAGAGGAGACAGTGAA-3')

$$Tm \text{ reverso} = [((7+3) 4) + ((8+2)2)] - 5 = 55^{\circ}\text{C}$$

$$Tm = \frac{(Tm \text{ frontal})(Tm \text{ reverso})}{2} = \frac{59^{\circ}\text{C} + 55^{\circ}\text{C}}{2} = 57^{\circ}\text{C}$$