



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Identificación de manzana genéticamente modificada en
productos industrializados en México aplicando PCR”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

KARINA GÓMEZ HERNÁNDEZ

ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA
COASESORA: M. EN C. JOSEFINA MORENO LARA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

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

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Identificación de manzana genéticamente modificada en productos industrializados en México aplicando PCR.

Que presenta la pasante: Karina Gómez Hernández

Con número de cuenta: 411090724 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 26 de Abril de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. Susana Patricia Miranda Castro	
SECRETARIO	Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
1er. SUPLENTE	L.A. Miriam Alvarez Velasco	
2do. SUPLENTE	M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza	

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

LMCF/cga*

«La ciencia no es perfecta, con frecuencia se utiliza mal, no es más que una herramienta, pero es la mejor herramienta que tenemos, se corrige a sí misma, está siempre evolucionando y se puede aplicar a todo. Con esta herramienta conquistamos lo imposible».

Carl Sagan

Agradecimientos

La realización de este trabajo no habría sido posible sin el apoyo que me brindaron para cumplir esta meta, con amor y sinceridad agradezco a:

Mi madre, por preocuparte por mí, por procurar siempre mi bienestar, por comprenderme y perdonar todas las veces que llegué de mal humor. Gracias por ser mi mejor compañera de equipo. Te amo mamá.

Mi padre, mil gracias por el esfuerzo incondicional que haces por mí y por brindarme todo aquello que he necesitado, sobre todo las palabras de aliento; gracias por ser mi ejemplo para seguir y por enseñarme a valorar la vida. Te amo.

Mi esposo, por tu amor y apoyo incondicional para cerrar este ciclo. Por confiar en mí y por compartir conmigo los mismos sueños. Que Dios me permita tenerte a mi lado en cada paso. Eres el amor de mi vida.

Mis hermanos, por estar siempre ahí para hacerme reír y enojar. A Ulises, por enseñarme que con tolerancia y perseverancia se cosechan grandes frutos. A Diana, por todas las sonrisas compartidas y por ser mi fortaleza e inspiración en cada uno de mis días.

Mis abuelos, que en la tierra y en el cielo rezan por mí. **A mis tíos y primos** que siempre han creído en mí y a toda mi familia que estuvo al pendiente durante este camino. Muchas gracias.

Mis amigas, por todas las aventuras en las que me acompañaron; sobre todo a ustedes, Caro, con quién compartí el lado más divertido de ser universitaria; a quienes a pesar de la distancia se han mantenido cerca, a Angie por escucharme siempre y a Ivonne por ser mi mejor consejera. Gracias por su amistad.

Agradecimientos técnicos

Al *Dr. Francisco Montiel Sosa* por la asesoría y apoyo brindado para la realización de este proyecto, gracias también por los conocimientos otorgados.

A la *M. en C. Josefina Moreno Lara* por la paciencia durante los muchos intentos realizados para culminar este proyecto con éxito y por su valiosa asesoría en cada uno de ellos.

A la *I.A. Vaely Coronel Flores* por haber sido mi instructora personal y gran apoyo durante la realización del trabajo, gracias por compartirme tu experiencia.

A todos y cada uno de los profesores que formaron parte de mi trayectoria académica, ya que sin ustedes no hubiera sido posible cumplir esta meta.

A la *UNAM, FES Cuautitlán* por abrirme sus puertas y cumplir con ello uno de mis sueños más grandes, por transformar mi vida al convertirme en una orgullosa puma, por brindarme la mejor formación académica, por enseñarme a elegir el camino correcto y en especial por todos los valores y conocimientos que adquirí al ser universitaria.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Índice

Índice de figuras	i
Índice de cuadros	iv
Resumen	1
Introducción.....	2
Capítulo 1. Importancia y generalidades del cultivo de la manzana	4
1.1 Generalidades de la manzana	4
1.1.1 Descripción	4
1.1.2 Variedades	5
1.1.3 Composición química y valor nutricional.....	9
1.2 Importancia económica	10
1.2.1 Importancia de la manzana en el mundo	10
1.2.2 Importancia de la manzana en México.....	12
1.2.3 Importación y exportación	14
1.2.4 Productos industrializados de manzana en México	15
Capítulo 2. Generalidades de los alimentos transgénicos	17
2.1 Organismos genéticamente modificados	18
2.1.1 Manzana transgénica.....	19
2.1.2 Efecto de la polifenoloxidasa en la manzana	21
2.1.3 Promotores y terminadores	22
2.2 Métodos para la transformación genética de la manzana	24
2.2.1 Métodos directos.....	24
2.2.2 Métodos indirectos.....	26
2.3 Situación de los organismos genéticamente modificados en México	28
Capítulo 3. Generalidades a cerca de los métodos utilizados para la identificación de alimentos transgénicos.....	30
3.1 Métodos para la identificación de transgénicos en alimentos	30
3.1.1 Métodos de análisis basados en la detección de proteínas	31

3.1.2	Métodos de análisis basados en la detección de ADN	31
3.1.3	Ventajas de la utilización de ADN para la identificación de transgénicos.....	32
3.2	Importancia de la identificación de transgénicos en alimentos por PCR.....	33
3.2.1	Principios de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	33
3.2.2	Componentes de la reacción	35
3.2.3	Etapas de la PCR	37
3.2.4	Consideraciones para el diseño de primers.....	39
3.2.5	Limitaciones y eficiencia de la PCR	40
3.2.6	Electroforesis	41
Capítulo 4.	Metodología experimental	43
4.1	Cuadro metodológico.....	43
4.2	Justificación	44
4.3	Descripción del cuadro metodológico	44
4.3.1	Objetivo general	45
4.3.2	Objetivo particular 1.....	45
4.3.3	Objetivo particular 2.....	45
4.3.4	Objetivo particular 3.....	46
4.3.5	Objetivo Particular 4.....	46
4.4	Materiales y métodos	47
4.4.1	Metodología de diseño de primers para la identificación de manzana (<i>Malus x domestica</i>)	47
4.4.2	Metodología del diseño de primers para identificación de manzana transgénica	49
4.4.3	Generalidades de las muestras.....	51
4.4.4	Extracción de ADN (Protocolo clásico Sambrook, 2001)	52
4.4.5	Cuantificación de ADN (Absorbancia).....	54
4.4.6	PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	55
4.4.7	Electroforesis en gel	59
Resultados y discusión	61	
	Primers para la detección de manzana en productos industrializados	61
	Primers para la identificación de manzana transgénica en productos industrializados.....	61

Extracción y cuantificación de ADN de las muestras	62
Integridad del ADN de manzana	63
Prueba de especificidad de primers para la detección de manzana	65
Amplificación de distintas variedades de manzana	67
Amplificación de manzana en productos industrializados	68
Prueba de especificidad de primers para la detección de manzana transgénica.....	70
Amplificación de manzana transgénica	71
Amplificación de manzana transgénica en productos industrializados.....	74
Conclusiones	80
Perspectivas del trabajo.....	82
Anexo 1.....	83
Diseño de primers.....	83
Anexo 2.....	89
Cálculo de temperatura de hibridación (T _m) de primers	89
Anexo 3.....	92
Hidratación de primers	92
Hidratación de primers para identificación de manzana en productos industrializados	92
Hidratación de primers para identificación de transgénicos	93
Bibliografía.....	94

Índice de figuras

Figura 1. Manzana Golden Delicious.....	6
Figura 2. Manzana Rome Beauty	6
Figura 3. Manzana Top Red.....	7
Figura 4. Manzana Red Delicious	7
Figura 5. Manzana Starking.....	7
Figura 6. Manzana Royal Gala	8
Figura 7. Manzana Granny Smith	8
Figura 8. Manzana Reineta Gris de Canadá	8
Figura 9. Manzana McIntosh.....	9
Figura 10. Principales países productores de manzana	11
Figura 11. Volumen de producción y precios mensuales.....	13
Figura 12. Volumen de producción en 2012 en ton y mdp en México	14
Figura 13. Principales destinos de la producción de manzana	15
Figura 14. Evolución de la producción de jugo concentrado de manzana 2002-2010	16
Figura 15. Principales productos industriales de la manzana	16
Figura 16. Comparación ente manzana convencional y manzana genéticamente modificada.....	20
Figura 17. Organización típica del gen	22
Figura 18. Secuencia de nucleótidos del promotor CaMV 35S.....	23
Figura 19. Amplificación exponencial del ADN mediante PCR.....	34
Figura 20. Representación gráfica de la PCR.....	39
Figura 21. Cámara de electroforesis con gel de agarosa	42
Figura 22. Programa de PCR con Tm calculada para detección de manzana (<i>Malus x domestica</i>) ..	49

Figura 23. Programa de PCR para la identificación de manzana transgénica	50
Figura 24. Gel de agarosa al 3% a 90 V extraído mediante el protocolo de Sambrook para evaluar la integridad del ADN de manzana en electroforesis; (M1) manzana Granny Smith, (M2) manzana Golden Delicious, (M3) manzana Royal Gala, (M4) manzana Red Delicious.....	64
Figura 25. Gel de agarosa al 3% a 90 V, para evaluar mediante electroforesis la especificidad de primers diseñados para la identificación de manzana; (MP) marcador molecular de 100 pb, (BCO) blanco, (OL) manzana Golden Delicious, (CE) cerdo, (PO) pollo, (GY) guayaba, (DL) manzana Red Delicious y (UV) uva.	66
Figura 26. Gel de agarosa al 3% a 60 V para la detección de manzana mediante electroforesis; (MP) Marcador molecular de 100 pb, (Bco) Blanco, (M+) Control positivo, manzana Red Delicious, (M4U), manzana Red Delicious USA, (M1) manzana Granny Smith, (M4W) Manzana Red Delicious Washington, (M3C) manzana Royal Gala USA y (M3U) manzana Royal Gala USA.....	67
Figura 27. Gel de agarosa al 3% y a 60 V para la detección de manzana en productos industrializados mediante electroforesis; (Marcador) marcador molecular de 100 pb, (Bco) Blanco, (YM) yogurt, (RM) refresco, (JM) jugo, (VM) vinagre, (TM) té, (SM) sidra, (PM) puré, (MS) manzana seca.....	69
Figura 28. Gel de agarosa al 3% y 60 V para la prueba de especificidad mediante electroforesis del ADN de los controles positivo (maíz transgénico con promotor CaMV 35S, MTCaMv y con terminador Tnos, MTTnos) y negativo (algodón tradicional con promotor CaMV 35S, AlCaMV y con terminador Tnos, AlTnos).	70
Figura 29. Gel de agarosa al 3% y a 60 V para la detección del promotor CaMV en las muestras de manzana mediante electroforesis; (MP) marcador de peso molecular, (Bco) blanco, (M+) Control positivo de maíz transgénico para CaMV, (M1) Granny Smith, (M2) Golden Delicious, (M3) Royal Gala y (M4) Red Delicious.....	72
Figura 30. Gel de agarosa al 3% y 60 V para la detección del terminador Tnos mediante electroforesis en las muestras de manzana; (MP) marcador de peso molecular de 100 pb, (Bco) blanco, (M+) control positivo de maíz transgénico para Tnos, (M1) Granny Smith, (M2) Golden Delicious, (M3) Royal Gala y (M4) Red Delicious.	73
Figura 31. Gel de agarosa al 3% y a 60 V para la detección del terminador Tnos en las muestras de manzana mediante electroforesis; (MP) marcador de peso molecular de 50 pb, (Bco) blanco, (M+) control positivo de maíz transgénico para Tnos, (M1) Granny Smith y (M4) Red Delicious.....	73

Figura 32. Gel de agarosa al 3% a 60V para la detección del promotor CaMV en productos industrializados de manzana mediante electroforesis; (MP) marcador de peso molecular, (Bco) blanco, (M+) Control positivo de maíz transgénico para CaMV, (JM) jugo de manzana, (RM) refresco de manzana, (VM) vinagre de manzana, (PM) puré de manzana y (YM) yogurt de manzana. 75

Figura 33. Gel de agarosa al 3% y a 60 V para la detección del promotor CaMV en productos industrializados de manzana mediante electroforesis; (MP) marcador de peso molecular, (Bco) blanco, (M+) Control positivo de maíz transgénico para CaMV, (SM) sidra de manzana, (TM) té de manzana y (MS) manzana seca..... 76

Figura 34. Gel de agarosa al 3% y a 60 V para la detección del terminador Tnos en productos industrializados de manzana mediante electroforesis; (MP) marcador de peso molecular, (Bco) blanco, (M+) Control positivo de maíz transgénico para Tnos, (JM) jugo de manzana, (RM) refresco de manzana y (VM) vinagre de manzana, (PM) puré de manzana y (YM) yogurt de manzana. 77

Figura 35. Gel de agarosa al 3% y a 60V para la detección del terminador Tnos en productos industrializados de manzana mediante electroforesis; (MP) marcador de peso molecular, (Bco) blanco, (M+) Control positivo de maíz transgénico para Tnos, (SM) sidra de manzana, (TM) té de manzana y (MS) manzana seca..... 78

Índice de cuadros

Cuadro 1. Valor nutricional de la manzana (<i>Malus x domestica</i>)	9
Cuadro 2. Producción nacional de manzana por entidad 2012	14
Cuadro 3. Productos transgénicos e inocuos en México para consumo humano	28
Cuadro 4. Comparación resumida de los métodos ELISA y PCR	32
Cuadro 5. Criterios para la selección de primers	40
Cuadro 6. Primers diseñados para la detección de manzana (<i>Malus x domestica</i>).....	48
Cuadro 7. Condiciones de operación de PCR directa para la detección de manzana.....	48
Cuadro 8. Promotor CaMV 35S y Terminador Tnos para la identificación de manzana transgénica	49
Cuadro 9. Condiciones de operación PCR para identificación de manzana transgénica	50
Cuadro 10. Generalidades de las muestras de manzana	51
Cuadro 11. Generalidades de las muestras de productos industrializados	51
Cuadro 12. Componentes de la PCR punto final	56
Cuadro 13. Componentes de la PCR directa	58
Cuadro 14. Concentración de ADN de muestras de manzana	62
Cuadro 15. Concentración de ADN de muestras de productos industrializados.....	63
Cuadro 16. Muestras empleadas para la evaluación de la especificidad de primers de identificación de manzana.....	65
Cuadro 17. Resultados de la detección de OGM en distintas variedades de manzana.....	79
Cuadro 18. Resultados de la detección de OGM en productos industrializados elaborados con man- zana.....	79

Resumen

En México la manzana es un fruto de gran importancia económica debido a su calidad nutrimental y a la variedad de productos que se pueden obtener a partir de su industrialización. La demanda de alimentos de alta calidad comercial, con mejores propiedades nutrimentales y de mayor rendimiento agrícola e industrial; ha enfocado a la ingeniería genética en la creación de alimentos “mejorados” a partir de la adición de genes de organismos de diferentes especies en su genoma. Por tal motivo, se seleccionó esta especie *Malus x domestica* para su estudio, teniendo como objetivo identificar fragmentos de ADN transgénico insertado en manzana y en productos industrializados comercializados en México, derivados de ella, empleando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Mediante el uso de software bioinformático, se realizó el diseño de primers que permitieran identificar el ADN (Ácido Desoxirribonucleico) de manzana en 4 variedades del fruto y en 9 muestras de productos industrializados (jugo, té, refresco, sidra, vinagre, mermelada, puré, yogurt y fruto seco) en México; para lo cual fue necesario extraer y cuantificar el ADN de las muestras realizando el Protocolo de Sambrook y absorbancia, respectivamente; además de emplear un Kit de PCR directa que permitiera llevar a cabo la reacción de manera más eficiente.

La PCR se llevó a cabo para amplificar las secuencias de ADN y detectar la presencia de manzana transgénica mediante una evaluación posterior con electroforesis en gel de agarosa. Se encontró que en México se comercializan algunas variedades de manzana transgénica y también se detectó presencia de material transgénico en productos industrializados y comercializados en México. Tal es el caso del gen del virus del Mosaico de la coliflor (CaMV 35S) y de la nopalina sintetasa (Tnos), que se utilizaron en este proyecto como herramientas de detección de manzana transgénica, debido a que la mayoría de los alimentos genéticamente modificados contienen uno, el otro o ambos.

A pesar de que en México existe una legislación que demanda a la industria alimentaria a declarar el uso de transgénicos en el etiquetado de productos, se concluye que ninguno de los productos en estudio que resultó ser transgénico lo declara en su etiquetado, razón por la cual el consumidor no puede elegir libremente a cerca de la ingesta de estos alimentos.

Introducción

La manzana presenta propiedades nutritivas muy útiles para la alimentación humana. Debido a su versatilidad de uso, ocupa en el país un lugar significativo dentro de la producción y consumo frutícola, sin embargo, su oferta no satisface la demanda interna, por lo que se tiene que incurrir a la importación de Estados Unidos y Chile principalmente. Por su importancia económica, el cultivo de manzana se ha modificado genéticamente para mejorar algunas de sus características fisicoquímicas, principalmente el retraso de la oxidación causado por enzimas polifenoloxidasas (PPOs).

Los cultivos transgénicos son organismos creados en el laboratorio con una técnica que permite insertar genes de bacterias, plantas o animales a cultivos como la manzana. También se les conoce como Organismos Genéticamente Modificados (OGM). Estas técnicas permiten a los científicos intercambiar genes entre especies que naturalmente no podrían cruzarse.

En México está prohibido sembrar transgénicos que no han sido liberados ante la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA); sin embargo, se han otorgado permisos para siembra experimental de transgénicos tales como soya, algodón, calabaza, alfalfa, papaya, plátano, tomate y papa, entre otros. La autoridad sanitaria permite la comercialización para consumo humano de transgénicos de soya, canola, maíz, algodón, remolacha, papa, jitomate y alfalfa. Estos ingredientes entran en la dieta sin control alguno y sin el consentimiento expreso del cliente.

Sin embargo, la preocupación de los consumidores con relación a la composición de los alimentos es cada vez mayor, dado que la elección de un producto puede estar relacionada con un estilo de vida, problemas de salud o temas religiosos. Por lo tanto, en algunos países europeos las regulaciones sobre etiquetado y comercialización de alimentos transgénicos demandan su detección en diversos productos alimenticios, pero en México no hay obligatoriedad de etiquetado de transgénicos (Kok, Aarts, Van Hoef, Kuiper, 2002, p. 798). En este proyecto se emplearon métodos suficientemente sensibles para detectar transgénicos en productos alimenticios industrializados, elaborados con manzana.

En Estados Unidos, el Departamento de Agricultura del país (USDA) ha aprobado nuevas variedades de manzanas transgénica, Arctic Golden y Arctic Granny; las cuales son resultantes de la modificación genética realizada en las variedades Golden Delicious y Granny Smith. Estas variedades de manzanas se basan

en la desarrollada por la empresa Okanagan Specialty Fruits, una variedad denominada Artic, cuya característica principal es que no se oxida al pelarla, es decir, no se produce el pardeamiento enzimático, causado por enzimas denominadas polifenol oxidasas (PPOs).

Se calcula que más del 20% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden por acción de reacciones enzimáticas, provocadas por PPOs. No hay ningún método de conservación que ofrezca protección frente a todos los riesgos posibles durante un periodo ilimitado de tiempo de los alimentos, por eso es de suma importancia conocer los métodos que existen para evitar la acción enzimática, ya que esto nos ayuda a mantener en buen estado los alimentos y a expandir la vida de anaquel de estos. La modificación genética es una estrategia para limitar el pardeamiento enzimático.

Hoy en día se conocen distintos métodos para la detección de transgénicos, uno de los más utilizados es la amplificación del ADN por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de secuencias específicas de nucleótidos por medio de primers. Se utilizan primers que detecten las secuencias utilizadas para la inserción del transgén en el genoma de la planta, tal es el caso del promotor CaMV 35S del virus del mosaico de la coliflor y el terminador de la nopalina sintetasa (Tnos) (Stram, Vilk y Klinger, 2000, p. 604).

Capítulo 1. Importancia y generalidades del cultivo de la manzana

1.1 Generalidades de la manzana

México es uno de los principales países productores de frutas, los productos agrícolas del país están bien catalogados en el mundo por sus altos niveles de diversidad, sanidad e inocuidad; situación que permite a los productores nacionales realizar exportaciones a 43 países del mundo con los que se tienen acuerdos comerciales, principalmente países europeos y asiáticos que cuentan con los más rigurosos estándares de calidad. Tal es el caso de la manzana, desde que fue introducida en América sirvió de alimento vital para nuestros antepasados, los cuales además las utilizaban con efectos medicinales como antiséptico y estimulante, de acuerdo con sus distintas preparaciones (SAGARPA, 2012).

El cultivo del manzano es importante debido a que es una fruta de consumo en fresco, también se le atribuye el consumo de productos elaborados de la industrialización de este. La cosecha y tratamiento de la fruta camino al mercado, con pocas excepciones sigue procedimientos eficientes, de tal modo que es poco el porcentaje de fruta sana y atractiva que llega a su destino. Como tal, la fruta que adquiere el consumidor no puede competir con la manzana importada que presenta mejor aspecto (Rimache, 2007, p. 44).

Se cree que el cultivo de variedades de manzanas resistentes representa la estrategia más prometedora para reducir la necesidad de químicos, para reducir el trabajo, el costo y para hacer la producción de frutos más compatible con la demanda del consumidor para una producción ecológica de frutos. La tecnología del ADN recombinante promete superar las limitaciones del proceso de mejoramiento clásico y de los cultivares de manzana establecidos sin efectos secundarios adversos.

1.1.1 Descripción

El manzano es originario del sudoeste asiático, entre los mares Caspio y Negro. Los manzanos que empezaron a vegetar en esta área fueron plantas de las especies *Malus pumila* y *Malus bacatta*, ambos de constitución genética $2n=34$ cromosomas y la especie *Malus silvestis* Mill con $2n=34$ cromosomas y $3n=51$ cromosomas. Los frutos de estas especies se han caracterizado por su tamaño relativamente pequeño, de forma esférica y sabor ácido (Rimache, 2007, p. 21).

El manzano se encuentra en estado silvestre y se ha cultivado desde la prehistoria. Aparece principalmente en regiones montañosas poco elevadas, en suelos con pH de 6.5 a 6.8 y los principales países productores de manzana se encuentran en regiones de climas templados como Europa, Estados Unidos, Turquía y China.

El manzano pertenece a la familia *Rosaceae*, a la especie *Pyrus malus L.* posee un tronco derecho y normalmente alcanza de 6 a 10 m de altura, con corteza cubierta de lenticelas, lisa, adherida, de color ceniciento verdoso sobre los ramos, escamosa y gris pardo sobre las partes viejas del árbol, tiene una copa globosa y una vida de 60 a 80 años (Ramírez, Cepeda, 1988, p. 41).

La floración de esta especie tiene lugar en primavera, generalmente por abril o mayo, las manzanas más precoces maduran en junio, aunque existen razas que mantienen el fruto durante la mayor parte del invierno e incluso se llegan a recoger en marzo o abril, debido a que actualmente se conocen infinidad de variedades que se clasifican de acuerdo con la época de maduración y por caracteres morfológicos (SAGARPA-UNIFRUT, 2013).

Su fruto es un pomo climatérico y globoso, con pedúnculo corto y numerosas semillas de color pardo brillante en distintas tonalidades tales como verde, rojo, amarillo y bicolores; todas ellas con sabores, aromas y calidad de tejido diferentes. La pulpa puede ser dura o blanda, pero jugosa y su sabor va desde muy dulce a muy ácido (Hermosillo, 2015, p. 32).

El fruto se utiliza fundamentalmente en la alimentación humana para el consumo en fresco, repostería, transformados (gelatina, mermelada, etc.) y para la fabricación de bebidas (sidra, licores y zumos), contiene vitaminas, ácido pantoténico, minerales, agua y azúcares.

1.1.2 Variedades

Existen más de mil variedades de manzanas en el mundo, con características propias que se pueden clasificar en cinco grupos en función de su aspecto visual: amarillas, rojas, verdes, bicolors y reinetas.

Otra clasificación se realiza de acuerdo con sus características morfológicas y organolépticas, sin embargo, en México, debido a la limitación que ofrece el mercado es común hallar únicamente las variedades que se describen a continuación (Fresh Produce Journal, 2010):

- “Golden Delicious”: Se conoce desde principios del siglo pasado. Se produjo en Estados Unidos al final del s. XIX a partir de una semilla. El fruto es grande o muy grande, alargado, ligeramente truncado de forma redonda y regular. De piel amarilla verdosa, es jugosa, crujiente y aromática.



Figura 1. Manzana Golden Delicious

- “Rome Beauty”: Estas manzanas son grandes, de forma redondeada algo achatada, bien coloreadas, rayadas de rojo y bastante atractivas. Su pulpa es blanca, con un refrescante sabor ácido. Es apta para consumo en fresco y para cocinar. Se conserva muy bien en cámaras frigoríficas. Las principales zonas productoras son Argentina, Italia y el sur de Alemania.

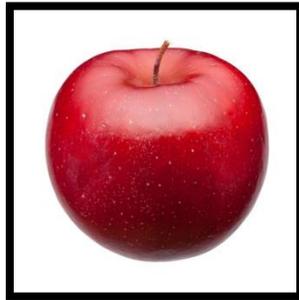


Figura 2. Manzana Rome Beauty

- “Top Red”: De coloración roja estriada, su piel es brillante sobre todo el fruto. Su forma troncocónica posee unos prominentes lóbulos. La carne tierna y consistente, puede perder textura con el tiempo, pero manteniendo siempre un agradable sabor dulzón. Es utilizada para su consumo en fresco, cocinada o asada, y se encuentra a la venta desde septiembre, cuando se recolecta, hasta junio.

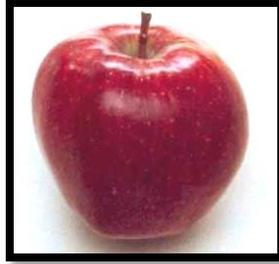


Figura 3. Manzana Top Red

- “Red Delicious”: Piel suave, color rojo oscuro, algunas veces se presenta en bandas sobre fondo amarillo. Su forma es algo alargada. La pulpa es de color blanco, suave y jugosa, aunque rápidamente se vuelve blanda. No se conserva durante mucho tiempo. Es de origen americano y se cultiva extensamente por Europa, principalmente en Francia e Italia. Está disponible en los mercados durante todo el año.



Figura 4. Manzana Red Delicious

- “Starking”: Es una mutación de Red Delicious. Es un fruto grande, de forma cónica que tiene cinco lóbulos alrededor del ojo muy marcado. Su carne es color amarillo, es crujiente y de sabor muy agradable. Su epidermis es de color rojo vinoso y con estrías más oscuras. Se caracteriza por su buena conservación en frigorífico y se recolecta en el mes de octubre.

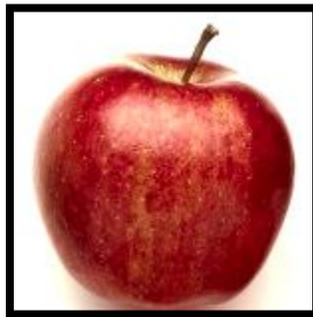


Figura 5. Manzana Starking

- “Royal Gala”: Tiene la piel brillante y con estrías rojo-anaranjadas sobre un fondo de color amarillo verdoso. Su forma, aunque muy irregular, es troncocónica. Su carne blanca, tierna, crujiente y consistente, es aromática y de excelente sabor. Es ideal para el consumo en fresco. Su recolección va desde finales de agosto, hasta finales de diciembre.

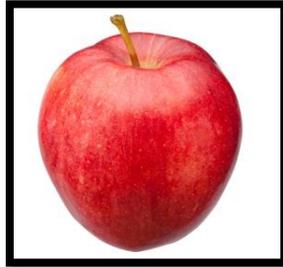


Figura 6. Manzana Royal Gala

- “Granny Smith”: De color completamente verde, presentan lenticelas blancas muy aparentes. Su carne es blanca, muy crujiente, jugosa, consistente y posee un agradable sabor ligeramente ácido. De forma redondeada, es ideal para el consumo en fresco.

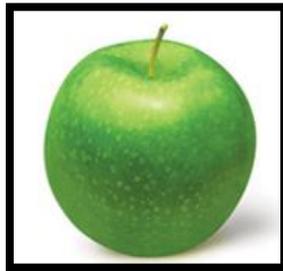


Figura 7. Manzana Granny Smith

- “Reineta gris de Canadá”: Se caracteriza por el color gris dorado de su piel, es dura y áspera. Tiene forma irregular, muy achatada y pedúnculo muy corto. Su carne, perfumada y consistente tiene un sabor acidulado. Se utiliza en repostería y es ideal para cocinar. Se encuentra en el mercado desde septiembre hasta marzo.

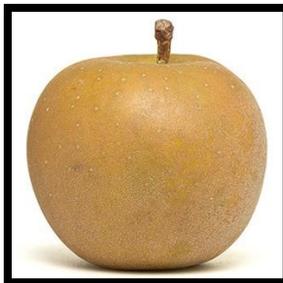


Figura 8. Manzana Reineta Gris de Canadá

- “McIntosh”: Forma es redondeada y de color rojo uniforme. Carne blanca y sabrosa. Debido a que su carne no se oxida tanto como otras variedades, se recomienda para ensaladas, tartas y mermeladas y para personas con dentadura delicada o falsa, por su piel frágil y su carne blanda. Es originaria del Canadá.

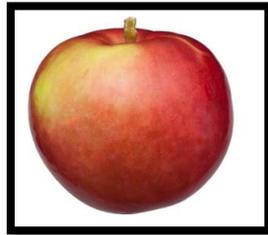


Figura 9. Manzana McIntosh

1.1.3 Composición química y valor nutricional

Las cualidades desde el punto de vista dietético de la manzana están ampliamente reconocidas, tanto por los profesionales de la nutrición como a nivel popular. Es especialmente elevado su contenido en potasio y bajo en sodio. El contenido en vitamina C es variable según el tipo de variedad y las condiciones de almacenamiento (Rimache, 2007, p. 60).

El valor nutricional que tiene la manzana se determina por su composición química, los constituyentes de cada 100 g de la parte comestible del fruto del manzano se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Valor nutricional de la manzana (*Malus x domestica*)

Valor nutricional de la manzana en 100 g de sustancia comestible	
Agua	80 %
Calorías	56
Proteínas	2 g
Grasas	0.6 g
Carbohidratos	14.1 g
Vitamina A	90 u.i.
Vitamina B1	0.03 mg
Niacina	0.1 mg
Vitamina C	7 mg
Calcio	7 mg
Fósforo	10 mg
Fierro	0.3 mg
Sodio	1 mg
Potasio	110 mg

Fuente: Ramírez et al., 1988

1.2 Importancia económica

El manzano es la especie vegetal más cultivada a escala mundial debido fundamentalmente a su facilidad de adaptación a diferentes climas y suelos; su valor alimenticio y terapéutico; la calidad y la diversidad de productos que se obtienen en la industria transformadora, así como a su adaptación a climas muy fríos y resistencia a las más bajas temperaturas, lo que ha permitido cultivarlo a gran escala en todos los países de clima relativamente fríos, y en particular en todos los de Europa (Infoagro, 2018).

De la producción mundial de frutas de pomos que alcanza unos 90 millones de toneladas, el 7.5 % corresponde a América del Norte y Central y el 5.5% a América del Sur. La producción mundial de manzanas que supera los 65 millones de toneladas se incrementó en el 2014 en un 2% con respecto al año anterior, llegando a un récord de 67.5 millones de toneladas. Debido fundamentalmente a una cosecha récord en China.

En cuanto a la cadena de la manzana, las actividades que están incluidas son la siembra, cosecha, empaque, conservación, industrialización y comercialización de esta fruta. La producción de manzana se destina en un 56% al consumo en fresco y 44% a la industrialización de jugos y sidra (USDA/FAS, 2015).

El consumo de frutas frescas está aumentando en la mayoría de los países. La gente está interesada en dietas más sanas, alimentos naturales, productos orgánicos y en la comodidad y diversidad de los alimentos. La industria productora responde a la demanda de productos fáciles de preparar por parte del consumidor aumentando la cantidad de frutas listas para el consumo e incluyéndolas junto con otros productos alimenticios en programas comerciales de “home meal replacement” (Knee, 2002, p. 56).

1.2.1 Importancia de la manzana en el mundo

La disponibilidad a nivel mundial de las frutas continúa aumentando en términos del número de especies y cultivares y también se prolonga la oferta mediante la producción en países de los hemisferios norte y sur. De los más de 4 000 millones de toneladas métricas de fruta producida, 36 millones se dedican a exportación mundial. La manzana se encuentra dentro de las diez primeras frutas de comercio internacional. El cultivo a nivel mundial de manzana es importante en virtud del volumen, de la mano de obra que ocupa, al igual que los ingresos que de él se obtienen, debido a que gran parte de la producción se destina

a la exportación y a la industrialización. La Figura 10 muestra los principales países productores de manzana.

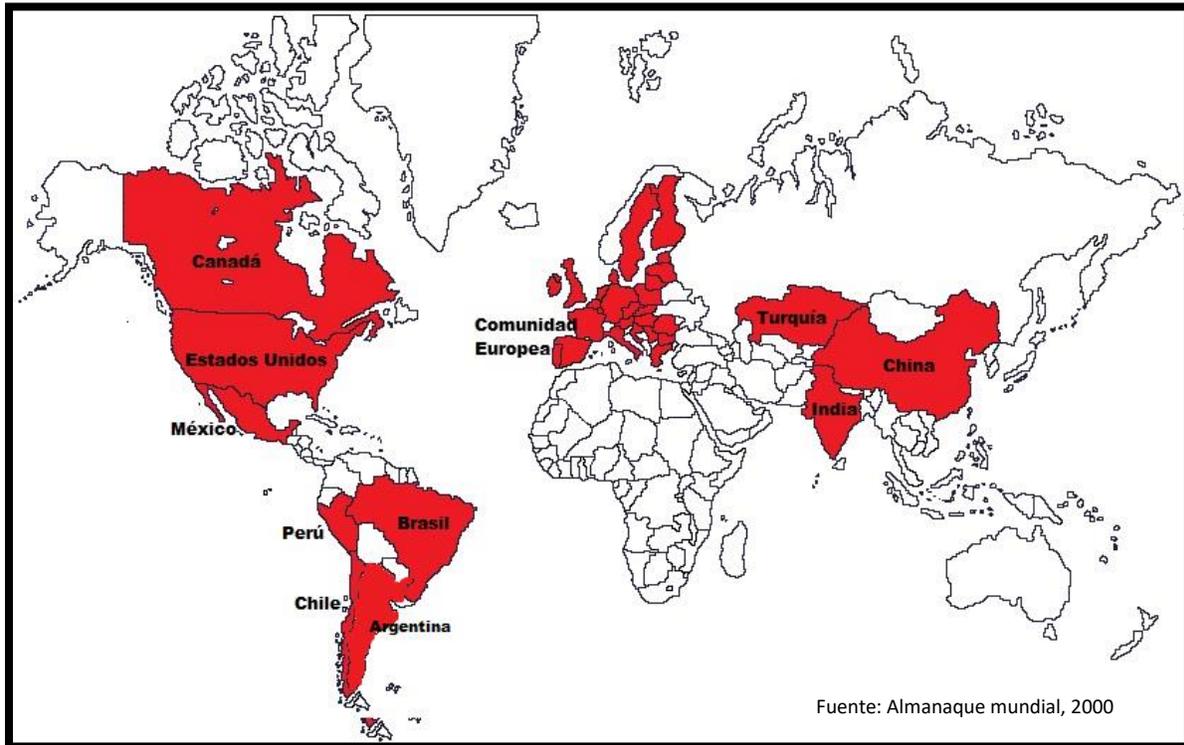


Figura 10. Principales países productores de manzana

De acuerdo con el Anuario estadístico del campo, 2014; la situación de la manzana en los principales países productores se describe a continuación:

En China su producción se incrementó en un 6% llegando al récord de 38 millones de toneladas debido a mejores prácticas hortícolas, una continua expansión en el área y los incentivos del gobierno. Se espera que el consumo se incremente en un 5% debido a mayor demanda por frutas frescas y los esfuerzos del gobierno por promover una dieta saludable. Así las exportaciones se incrementarían un 9% llegando a 1.1 millones de toneladas en respuesta a la expansiva demanda de Rusia y los cercanos mercados asiáticos.

En la Unión Europea la producción disminuyó un 6% alcanzando los 11.3 millones de toneladas debido a condiciones climáticas desfavorables. El consumo en fresco se espera descienda un 10%. Las exportaciones no se modifican siendo la Unión Europea el principal exportador mundial. Por otra parte, las importaciones se estiman en un 2% menos llegando a 515 000 toneladas debido a los incrementos en los costos de transporte marítimo.

En Estados Unidos la producción de manzana descendió un 3% llegando a los 4.1 millones de toneladas debido a las malas condiciones climáticas sobre todo en los estados centrales y del Este. Sin embargo, la oferta en fresco se incrementó en el estado de Washington. Las exportaciones se esperan aumenten un 5% llegando a las 880 000 toneladas para alcanzar la mayor demanda de Canadá y México. Las importaciones son significativamente menores debido a menores ofertas de Chile que fueron tomadas por Argentina.

En Turquía la producción se incrementó en un 7% llegando a un récord de 2.9 millones de toneladas debido a condiciones climáticas favorables. A pesar de que el área no cambió en los últimos 5 años, muchas plantaciones fueron reemplazadas por cultivos más eficientes con variedades Premium.

En Chile su producción disminuyó un 4% a 1.3 millones de toneladas debido a las heladas seguidas por granizo que afectaron la floración y el desarrollo de la fruta. Como resultado, las exportaciones se reducirían en un 10% llegando a las 700 000 toneladas.

En Rusia la producción se incrementó en un 8% alcanzando los 1.2 millones de toneladas, lo que sería un regreso a los niveles récord de tres años atrás, atribuibles a incentivos gubernamentales, nuevas plantaciones, mejoras en infraestructura y facilidades de post cosecha. Se espera que las importaciones se incrementen en un 8% a 1.3 millones de toneladas para satisfacer el consumo doméstico. Rusia continúa siendo el mayor importador mundial.

En Brasil la producción disminuyó un 3% llegando a 1.2 millones de toneladas debido a condiciones climáticas desfavorables. Los mayores costos de producción y los menores beneficios continuarán limitando la expansión. Sin embargo, se espera que las exportaciones se incrementen a 90 000 toneladas (Almanaque mundial, 2000).

1.2.2 Importancia de la manzana en México

En los años recientes la producción de manzana en México ha aumentado notablemente debido a la demanda que tiene esta fruta para como consumo fresco en el país, así como para su industrialización. La manzana ocupa en el país un lugar significativo dentro de la producción y consumo frutícola con una producción anual de 551 466 toneladas según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2017 en Chihuahua que es el estado de mayor producción; pero desafortunadamente la oferta de esta

fruta no alcanza a satisfacer la demanda interna, por lo que se tiene que incurrir a las importaciones de manzana, las cuales provienen de Estados Unidos y Chile principalmente.

De acuerdo con el cierre 2016, esta fruta presentó una producción total de 716 930 toneladas, con un valor de 4.66 mil millones de pesos, en una superficie cosechada de 54 248 hectáreas.

Chihuahua es el mayor productor de manzana del país, en el año 2016 participó en promedio con del 81.8% del volumen nacional recolectado. Durango y Puebla son también entidades importantes en el cultivo de esta fruta y generaron el 5.9% y 5.2% del volumen, respectivamente y el 26.5% del valor (SIAP, 2017).

La cosecha de manzana se realiza entre mayo y diciembre, sin embargo, el 96% del volumen producido se concentra en tres meses: agosto, septiembre y octubre (SHCP, 2014). En la Figura 11 se muestra el volumen de producción de manzana y su precio mensual.

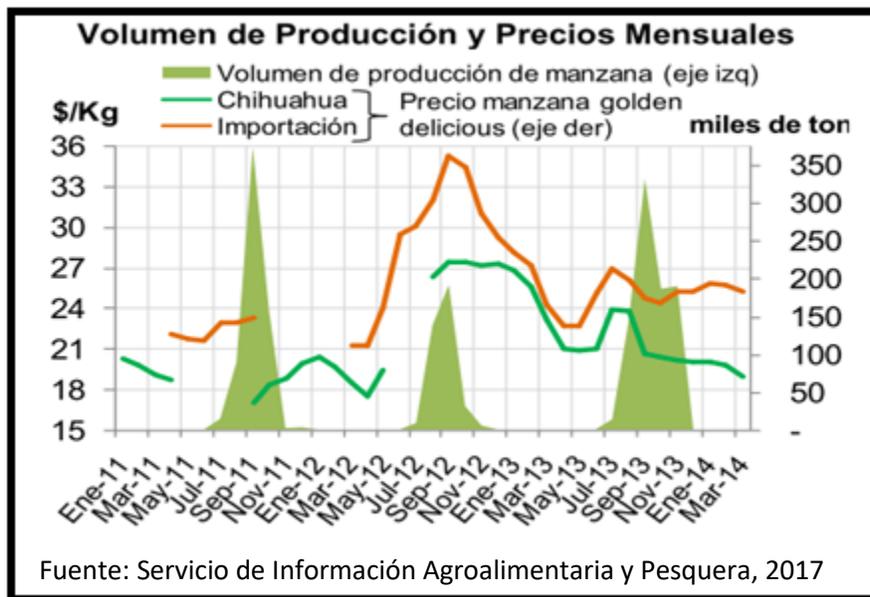


Figura 11. Volumen de producción y precios mensuales

En el Cuadro 2 se observan los datos de producción de manzana de los estados mayormente productores en el año 2012 según su volumen y valor. Mientras que la Figura 12 muestra los volúmenes y valores de producción en los diferentes estados de la república.

Cuadro 2. Producción nacional de manzana por entidad 2012

Estados	Volumen		Valor	
	Miles de Toneladas	Participación	mdp	Participación
Chihuahua	207.1	55.2%	1,913.1	63.6%
Durango	61.1	16.3%	376.8	12.5%
Coahuila	36.8	9.8%	387.2	12.9%
Puebla	34.1	9.1%	112.2	3.7%
Resto del país	35.9	9.6%	219.5	7.3%
Total Nacional	375.0	100.0%	3,008.9	100.0%

Fuente: SAGARPA, 2013

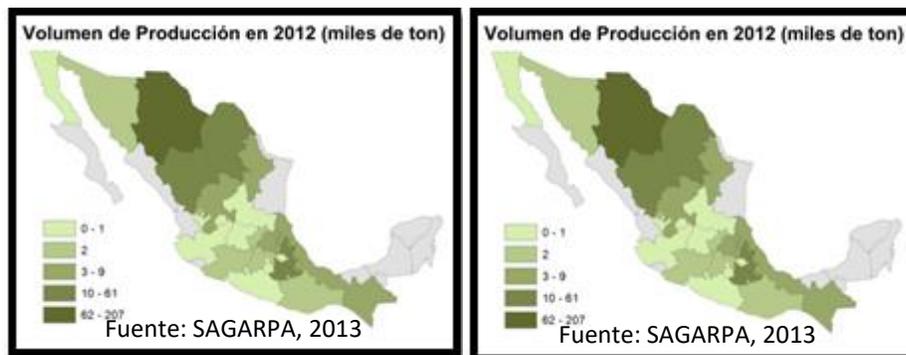


Figura 12. Volumen de producción en 2012 en ton y mdp en México

1.2.3 Importación y exportación

En México, el consumo aparente de manzana es cercano a 800 mil toneladas anuales y las importaciones en los últimos diez años han sido en promedio de 210 mil toneladas, es decir, entre el 21% y 30% del consumo.

A lo largo del año 2015 más de 22 mil personas laboraron en la producción de manzanas en alguna de las 28 515 hectáreas dedicadas a este fruto en Chihuahua. No obstante, dichas fuentes de empleo y más de 2 500 productores mexicanos están en riesgo ante las grandes importaciones de manzana de Estados Unidos.

Durante los meses de enero a julio se importaron 11 648 763 cajas de manzana, 99% de ellas desde Estados Unidos, siendo récord histórico (Agencia de Noticias del Estado Mexicano, 2015).

Los productores se han visto imposibilitados para colocar el volumen adicional de producción en vista de la mayor importación y de la baja capacidad para refrigerar la fruta y evitar inundar el mercado (Ramírez, Cepeda, 1988, p. 54).

1.2.4 Productos industrializados de manzana en México

Una vez cosechada, la fruta puede dirigirse al mercado interno tanto para su consumo en fresco o como industrialización (en caso de no alcanzar la calidad adecuada) y/o a la exportación. La mayor o menor participación relativa de cada uno de estos destinos está determinada por factores estructurales (mejores condiciones del sistema productivo en términos de especies, variedades y calidades obtenidas) y coyunturales (buenas condiciones climáticas durante una cosecha se reflejarán en mayores volúmenes destinados al consumo fresco) (Dirección Nacional de Desarrollo Regional, 2015). En la Figura 13 se observa el destino de la manzana fresca en función de las toneladas consignadas a cada sector.

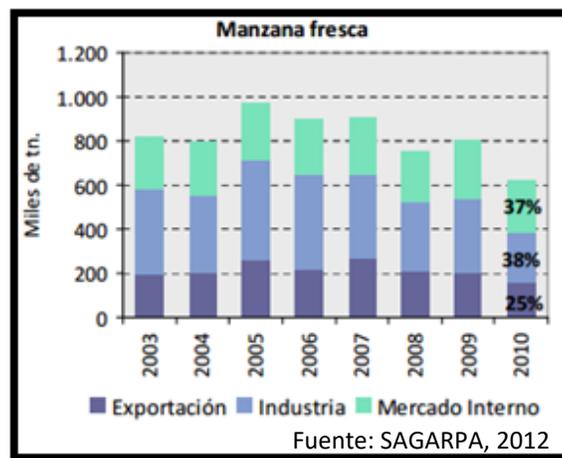


Figura 13. Principales destinos de la producción de manzana

En los últimos años, la participación de cada uno de los destinos se ha mantenido relativamente estable. En el caso de la manzana, la mayor proporción se dirige al mercado interno (75%) y el resto se envía al exterior.

El alto porcentaje de manzanas que son industrializadas refleja los problemas de calidad e inserción en el mercado de fruta fresca que presenta este producto debido a que, pese a la reconversión productiva de los últimos años, aún existen montos que no alcanzan los niveles mínimos de eficiencia ni de calidad, arrojando un porcentaje elevado de descarte de fruta. Al respecto, la participación del descarte ronda del 40% al 50%, superando el nivel promedio de los países del hemisferio sur, que es del 30%, según USDA (2015).

La fruta que no se destina al consumo en fresco se procesa con fines industriales: en manzana, los productos procesados representan el 40% de la producción. El principal producto elaborado es el jugo concentrado y, en menor medida, la sidra y las conservas. En el caso de la manzana, el jugo representa más de la

mitad de la producción industrial (55%), seguido por la sidra con el 38%. El jugo es un producto fuertemente orientado al mercado de exportación: se destina el 95% de la producción. Constituye un comodín de bajo valor agregado que, mayormente, se vende a granel, para ser utilizado como insumo por otras industrias alimenticias (mayormente como endulzante para la fabricación de bebidas gaseosas).

La Figura 14 muestra las toneladas de manzana empleada para la producción de jugo concentrado en los años 2003 a 2010.

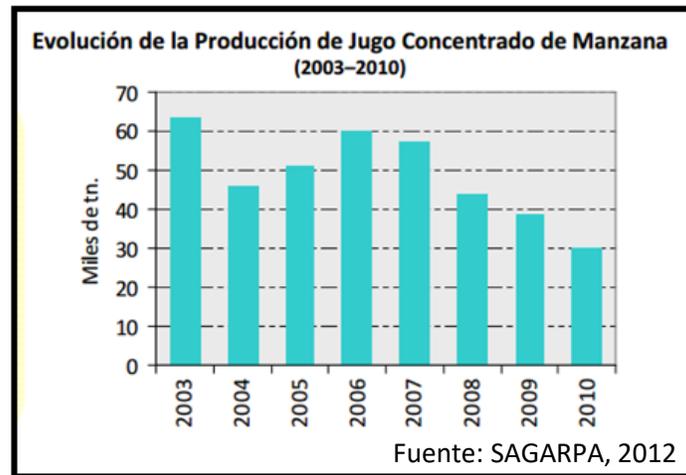


Figura 14. Evolución de la producción de jugo concentrado de manzana 2002-2010

En la Figura 15 se observan los porcentajes de participación que presentaron los principales productos industriales elaborados a partir de manzana en el año 2010.

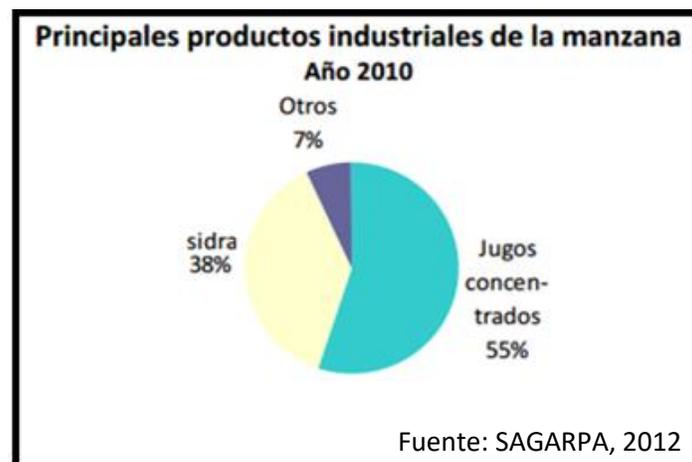


Figura 15. Principales productos industriales de la manzana

Entre 2003 y 2010, la producción de jugo concentrado de manzana cayó el 10% anual, por encima del total de elaborados (3%). Dicha caída se vincula, por un lado, con una mayor disponibilidad de fruta para consumo en fresco (pasó del 53% de la producción en 2003 al 62% en 2010) y por el otro, con la caída del 24% de la producción primaria.

Capítulo 2. Generalidades de los alimentos transgénicos

La genética es uno de los principales ejes del desarrollo tecnológico y el conocimiento impulsor de la economía. En el área agrícola, el hombre cultivaba plantas desde tiempos remotos, y la genética ofreció los conocimientos para hacer más eficiente este trabajo, emplear caracteres heredables y velar por el manejo varietal en aquellos casos cuya expresión estuviera muy influida por la interacción con el ambiente.

Las principales dificultades que se debían vencer por las nuevas variedades adicionaron paulatinamente requisitos a alcanzar para elevar el rendimiento agrícola y sus componentes, el rendimiento industrial o la calidad comercial, la resistencia a enfermedades y plagas, la tolerancia a las condiciones adversas y hacer frente a la diversificación agrícola.

La mayoría de las variedades agrícolas modernas provienen del mejoramiento genético. Otros métodos tales como la inducción de mutaciones y la transferencia de genes foráneos por ingeniería genética se han usado en la mejora para caracteres específicos a fin de extender la vida agrícola de algunas variedades (Cornide, 2002, p. 62).

En los avances que se han dado en las ciencias biológicas, los seres humanos tienen la posibilidad de crear organismos vivos que nunca hubieran existido de manera natural y que nunca habían estado en el planeta. Los organismos genéticamente modificados son el resultado de ese avance científico a través de la biotecnología, que surge de la necesidad de tener una mejor calidad de vida para el ser humano (Martínez, 2007, p. 26).

Las plantas transgénicas o genéticamente modificadas se generan a partir de células vegetales a las que previamente se les introducen genes modificados o extraídos de otras especies. La introducción de estos genes puede proporcionar a la planta características y capacidades nuevas, por ejemplo, mayor y más rápido crecimiento, rendimiento, productividad, mejores frutos y semillas resistentes a plagas y enfermedades, tolerancia al calor, frío, sequía y salinidad.

La tecnología de transformación de plantas se ha convertido en una plataforma excelente para conseguir la mejora de cultivos, así como para llevar a cabo el estudio de la función de los genes en las plantas. Este éxito representa la culminación de muchos años de esfuerzos en mejorar las técnicas de cultivo de tejidos, las técnicas de transformación y la ingeniería genética (Calva y Pérez, 2005, p. 15).

2.1 Organismos genéticamente modificados

Un organismo genéticamente modificado (OGM) también conocido como organismo vivo modificado (OVM) se define como un organismo (vegetal, animal o microorganismo) en el cual se ha introducido o incorporado de manera estable en el genoma, un segmento de ácido nucleico mediante un proceso deliberado con el fin de obtener un genotipo definido: la introducción se lleva a cabo de una manera en la que el ácido nucleico no podría haber sido adquirido por el organismo a través de mutaciones, recombinaciones u otros fenómenos de transferencia genética reconocidos como mecanismos que operan en la naturaleza sin intervención humana (Trigo, Traxler, Pray y Echeverría, 2002, p. 3).

La ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados publicada en marzo de 2005, define a los OGM como 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 que se definen en la propia ley, siempre que se utilicen técnicas que establezcan en la misma o en normas oficiales mexicanas que deriven de ella.

Todos los seres vivos están compuestos por unidades llamadas células, dentro de ellas existe una molécula llamada ácido desoxirribonucleico (ADN). Este ADN, específicamente los cromosomas, son la única sustancia orgánica conocida capaz de auto replicarse. Largas cadenas de este ADN conforman el material genético o genoma, y es justo aquí donde se almacena la información para la generación y regulación de las estructuras de cada organismo.

El genoma se encuentra organizado en diversos elementos que expresan la información genética. De ahí que los paquetes de información genética dentro del genoma, llamados genes, posean las “instrucciones” para diseñar específicamente cada proteína, función y característica de un ser vivo (Leal G., 2005, p.7).

Con ciertas técnicas moleculares y biotecnológicas, los genes pueden cortarse del genoma de un organismo y pegarse en el organismo de otro, ya sea de la misma especie o incluso de otra del reino animal,

vegetal, microorganismos, etcétera; a los seres resultantes de la incorporación estable de los genes, que les proporcionan nueva información genética, se les llama genéticamente modificados (OGM).

En los últimos años se ha incrementado a nivel mundial la aplicación de la ingeniería genética en vegetales con diversos propósitos, como el de aumentar la producción de la actividad agrícola, la vida en anaquel de los productos perecederos y su resistencia a plagas y enfermedades (Bolívar, 2003, p.36).

Los OGM, son cultivados con fines comerciales desde 1994, cuando Estados Unidos aprobó el uso y liberación al ambiente de un tipo de tomate denominado "FlavSavr®", el cual tenía la cualidad de maduración tardía. En el año 2010 aproximadamente 10% de la superficie total mundial de cultivos fue plantada con OGM.

En el año 2011, en México se plantaron 161 500 hectáreas de algodón transgénico, lo que equivale a una tasa de adopción del 87% y 14 7000 hectáreas de soya para un total de 175 500 hectáreas del país, en comparación con 71 000 hectáreas en 2010; con un aumento de 146% (James, 2011, p. 42).

Los alimentos, en particular los nuevos o genéticamente modificados no están sujetos a escrutinio de demostrar mediante documentación extensiva su seguridad y eficacia antes de ser de uso público. Prácticamente no hay datos experimentales que puedan permitir una valoración adecuada de los efectos en la salud humana por del consumo de organismos genéticamente modificados. Pocos estudios de industrias patrocinadas han publicado en revistas una evaluación toxicológica y epidemiológica de los efectos de consumir estos alimentos modificados genéticamente, aunque se dice que no se han publicado los efectos potenciales en la salud (Taylor, 2007, p. 110).

2.1.1 Manzana transgénica

Desde hace muchos años, la búsqueda de métodos que inhiban o retrasen la aparición de las clásicas manchas oscuras en frutas y verduras que tanto repelen al consumidor, ha sido uno de los objetivos prioritarios de la industria alimentaria. Tradicionalmente se han empleado métodos como la adición de sulfitos, de boratos, de sal, el empleo de un tratamiento térmico adecuado, la eliminación del oxígeno, la disminución del pH del medio u otros similares. Sin embargo, la mayoría de ellos llevan asociados problemas nutricionales, sanitarios, etc. por lo que se están buscando nuevas alternativas. Dentro de los nuevos métodos

para inhibir el pardeamiento enzimático, están las modificaciones genéticas para retrasar el oscurecimiento de frutas (SCIENTIA, 2015).

En Estados Unidos han sido aprobadas nuevas variedades de manzana transgénica por el Departamento de Agricultura del país, se trata de las variedades Arctic Golden y Arctic Granny, las cuales se pueden observar en la Figura 16; son resultantes de la modificación genética realizada en las variedades Golden Delicious y Granny Smith. Estas variedades de manzanas se basan en la desarrollada hace algo más de dos años por empresa Okanagan Specialty Fruits, una variedad denominada Arctic, cuya característica principal es que no se oxida al pelarla, es decir, no se produce el pardeamiento enzimático, causado por unas proteínas denominadas polifenol oxidasas (PPOs).

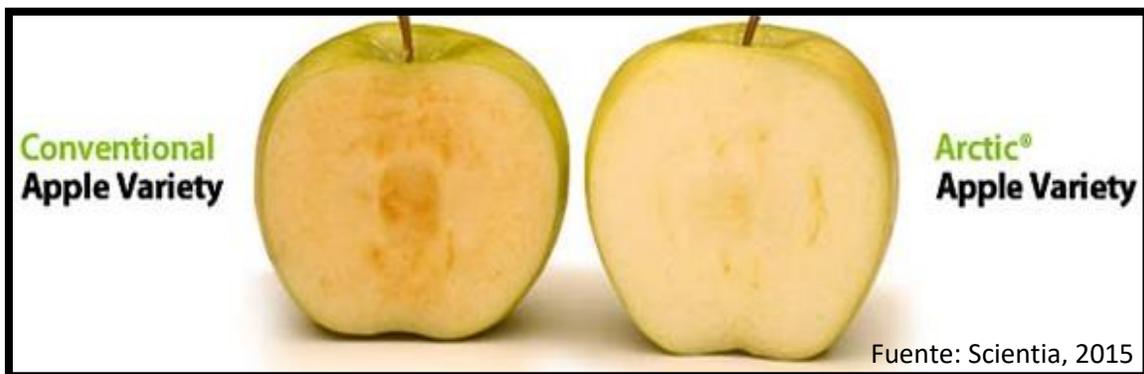


Figura 16. Comparación entre manzana convencional y manzana genéticamente modificada

Para poder evitar el pardeamiento, se silenciaron los genes PPOs de las papas, esta técnica se ha aplicado a las manzanas, logrando que produzcan hasta un 10% menos de proteínas PPOs. Lo que hicieron los expertos en ingeniería genética fue insertar el gen denominado GEN-03 en el ADN de la variedad de manzanas a modificar, los responsables del desarrollo de esta variedad de manzanas aseguran que se mantienen perfectamente las cualidades organolépticas, y lo único que cambia es la anulación del oscurecimiento al pelarlas.

El problema del pardeamiento representa un coste significativo en los eslabones de la cadena de suministro y procesamiento de las manzanas; poniéndole solución se logra reducir las pérdidas económicas a la industria y se brinda comodidad a los consumidores, ya que pueden pelar las manzanas sin temor a que vayan perdiendo su atractivo a medida que pasen los minutos. Estas manzanas pueden mantener un buen aspecto tras pelarlas y trocearlas durante 17 días, sin riesgo a que se oscurezcan por la oxidación (Javier, 2015).

2.1.2 Efecto de la polifenoloxidasas en la manzana

Los vegetales son tejidos biológicamente activos que contienen una gran cantidad de enzimas y que además están compuestos por agua en mayor porcentaje. El nivel de agua interno de las plantas limita la actividad de las enzimas de manera natural, mientras que el aire cataliza la oxidación de compuestos fenólicos naturales o quinonas que evolucionan de manera espontánea a pigmentos que producen pardeamiento.

La polifenoloxidasas (PPO) es una enzima presente en vegetales que actúa como catalizador de una reacción de oxidación que transforma los o-difenoles de la manzana en o-quinonas, las cuales son muy reactivas y atacan a una gran variedad de componentes celulares y favorece la formación de polímeros negro-marrón. Se encuentran en los cloroplastos y el citoplasma de la célula, unida a las membranas, tiene un peso aproximado de 60 000 Da y su fracción soluble aumenta durante la maduración del vegetal, además contiene 0.2% de Cu^{++2} , el cual es su centro activo que debe reducirse a Cu^{+1} para ligarse al O_2 . Al encontrarse en vegetales, recibe el nombre de catecolasa, los sustratos de esta enzima pueden ser compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas y taninos (Whitaker, 1994, p.126).

El pardeamiento en vegetales se representa por cambios en su apariencia, en el color (genera tonalidades oscuras), en las propiedades organolépticas (sabor y textura), desprendimiento de olores y un efecto nutricional negativo; lo que representa pérdidas económicas para los productores y para la industria. Sin embargo, la actividad de las enzimas PPOs es deseable para algunas industrias productoras de jarabe de malta y arce, para el horneado del pan, tostado del café, cocoa o nueces y cereales; en la industria del vino, frutas secas, sidra y té la actividad enzimática es benéfica para el desarrollo de colores característicos (Heimdal, Falk, Poll y Larsen, 1995, p. 1265).

La PPO es activada como resultado de la interrupción de la integridad de la célula y cuando el contenido plásmico y vacuolar se mezclan. Durante el procesamiento de las frutas se presenta la desintegración de la estructura celular, debido a la cual se liberan enzimas endógenas que pueden perjudicar al producto; afecta principalmente a frutos frescos cortados ocasionándoles pérdida de calidad y la reducción de la vida de anaquel (Marc, Hendrickx, Ludikhuyze, Van y Volker, 2001, p. 495).

Se han encontrado diferentes métodos para inhibir las PPOs, algunos son tratamientos preventivos que actúan sobre la enzima, el sustrato, la disponibilidad de oxígeno o de los productos de la reacción y otros

métodos de conservación como térmicos y químicos. Existen métodos físicos de inhibición mediante escaldado, recubrimientos comestibles, aplicación de calor, refrigeración o conservación en atmósfera controlada y programable. Y hay otros métodos con tratamiento no térmico tales como altas y/o bajas temperaturas, ondas electromagnéticas, reducción de disponibilidad de oxígeno, irradiación, altas presiones o pulsos eléctricos. Hoy en día, la modificación genética es otra técnica de inhibición enzimática aplicable a vegetales tales como la manzana.

2.1.3 Promotores y terminadores

Desde un punto de vista estructural, el genoma se considera un mosaico de instrucciones moleculares independientes para la fabricación de componentes celulares individuales. Sin embargo, es evidente que en la ejecución de estos planes la coordinación cobra un valor absoluto para la supervivencia. El descubrimiento de genes reguladores y operadores de la regulación represora de la actividad de genes estructurales revela que el genoma contiene no sólo una serie de planos, sino un programa coordinado de síntesis de proteínas, junto con los medios para controlar su ejecución (Lewin, 2014, p. 312).

Aunque el gen de interés puede ser de cualquier origen, siempre debe ir acompañado de elementos que permitan su correcta expresión en la planta hospedadora (esto es, que pueda obtenerse la proteína a partir del gen, por lo tanto, la característica deseada). Para eso, y por ingeniería genética, se arma una construcción que contiene al gen de interés, rodeado de dos elementos o secuencias: un promotor, que asegura el inicio de la expresión, y un terminador, que garantiza la terminación correcta del mensaje. En la Figura 17 que muestra la organización típica de un gen.

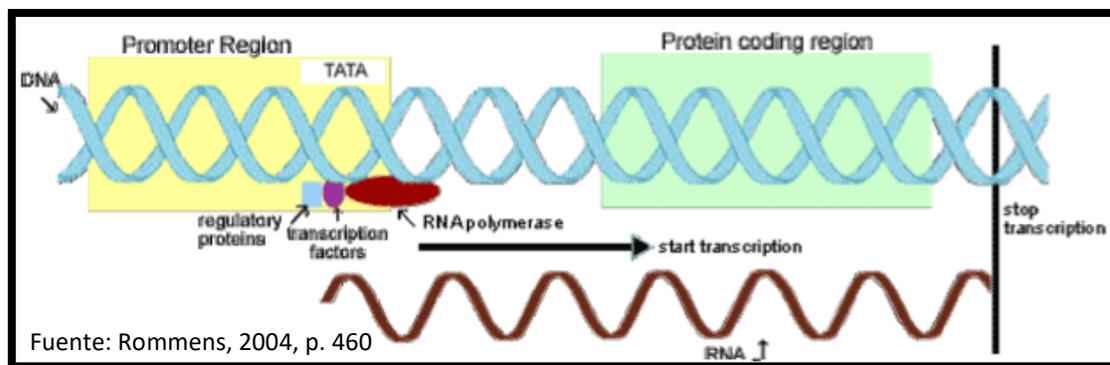


Figura 17. Organización típica del gen

Los promotores y terminadores son secuencias muy bien caracterizadas y provienen de genes vegetales (plantas o virus y bacterias que infectan plantas). La construcción a su vez se inserta en una molécula de ADN llamada vector, cuya estructura depende del método de transformación elegido. Aunque todas las células de un organismo contienen más o menos la misma información genética, algunos genes se activan y se desactivan en diferentes lugares y momentos durante el ciclo de vida de un organismo. Los elementos reguladores son cruciales para la expresión genética (ArgenBio, 2015).

Los promotores son secuencias de ADN que se unen a la enzima ARN polimerasa II, que es responsable de la generación de ARN. Generalmente se asume a la región promotora cis como la región clave reguladora que controla la transcripción de la región codificadora adyacente en el ácido ribonucleico mensajero (ARNm), que luego se traduce directamente en proteínas. Las secuencias de ADN dentro de los promotores pueden ser identificadas como sitios para factores que actúan en trans, factores de transcripción, que pueden causar activación o represión de la transcripción de unión.

El virus del mosaico de la coliflor existe en la naturaleza e infecta de forma natural vegetales pertenecientes a la familia de las crucíferas como la coliflor, repollo, brócoli, col de Bruselas, etcétera. A principios de la década de 1980, Chua y colaboradores en la Universidad Rockefeller aislaron el promotor responsable de la transcripción de todo el genoma de un virus del mosaico de la coliflor (CaMV). El promotor fue nombrado promotor 35S de CaMV ("promotor 35S") debido al coeficiente de sedimentación de la transcripción viral, cuya expresión es impulsada de forma natural por este promotor 35S (Patent Lens, 2010).

La actividad del promotor CaMV35S es adecuada para que el gen se exprese y para conferir a las células transformadas la resistencia suficiente para los agentes selectivos (Upadhyaya, Zhou y Zhu, 2000, p. 30). En la Figura 18 se muestra la secuencia de nucleótidos que conforman al promotor CaMV 35S.

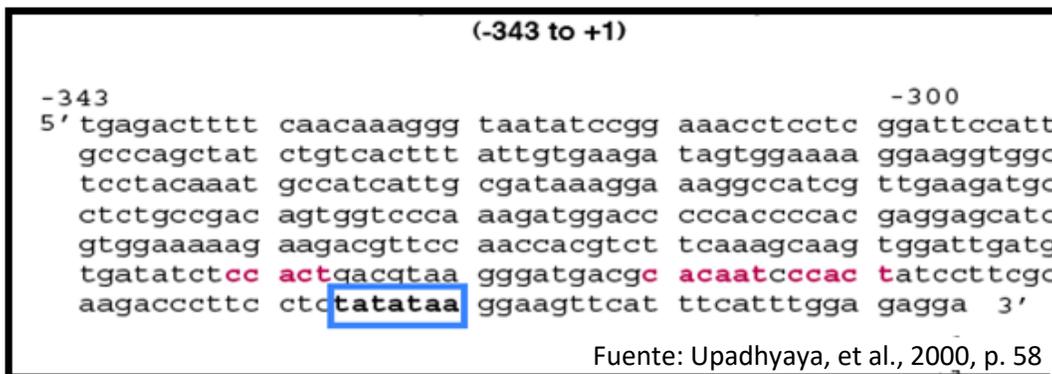


Figura 18. Secuencia de nucleótidos del promotor CaMV 35S

El sitio de poliadenilación de ARN (que indica el final de la transcripción) de la secuencia de T-nos proveniente de *Agrobacterium tumefaciens*, gen de nopalina sintasa, ha servido como un sitio de poliadenilación en algunas de las mismas construcciones.

Las pruebas para detectar la presencia de secuencias de CaMV 35S y Tnos se han utilizado comúnmente como una herramienta de detección de material vegetal transgénico ya que la mayoría o la totalidad de alimentos genéticamente modificados y/o productos en el comercio contienen uno o el otro, o ambos. La detección de cualquiera de estos elementos requiere ensayos adicionales para la identificación de rasgos o hechos específicos. Esto implica el uso de ensayos de PCR con los productos separados por electroforesis en gel (Lipp, et al. 2005, p. 391).

2.2 Métodos para la transformación genética de la manzana

La transformación de plantas usa una amplia gama de herramientas mediante las cuales es posible la introducción de información genética foránea, sin afectar las cualidades agronómicas y de mercadeo de los cultivos. La transformación de plantas se ha definido como la incorporación estable de genes foráneos y la expresión de estos en las plantas transformadas (Sharma, Seetharama y Ortiz, 2002, p. 106).

La transformación genética en plantas presenta varios métodos que permiten la introducción e integración de ADN foráneo en el genoma para poder seleccionar eficientemente las células transformadas, permitiendo la regeneración completa de las células transformadas, este ADN puede ser introducido a la planta de interés de diferentes formas, *Agrobacterium tumefaciens*, o directamente, por bombardeo con partículas o por microinyección (Neuhaus y Spangenberg, 1990, p. 215).

Los sistemas de transformación con los que se cuenta en la actualidad se clasifican en métodos indirectos y métodos directos, de acuerdo con el mecanismo utilizado para la transferencia del material genético hacia la célula vegetal (Mohan, Sajeena, Seetharaman y Reddy, 2003, p. 1077).

2.2.1 Métodos directos

Son métodos basados en la utilización de vectores biológicos, empleando sus características naturales de patogenicidad en plantas, para la introducción de los genes de interés al genoma vegetal (Rao *et al.*, 2009, p. 758).

Sistema Agrobacterium tumefaciens

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria presente en el suelo, se caracteriza por el crecimiento de neoformaciones en los tejidos vegetales. Esos crecimientos tumorales son la integración estable en el genoma vegetal de un segmento de ADN, ADN-T (ADN transferido), proveniente de un vector plasmídico, Ti (plásmido inductor de tumor), el cual está presente en un pequeño porcentaje de las poblaciones naturales de *A. tumefaciens* (Zupan, Muth, Draper y Zambryski, 2000, p. 12).

El sistema *Agrobacterium* es el más empleado en la producción de plantas transgénicas, debido a que posee varias ventajas tales como simplicidad técnica de los protocolos; no requiere de equipos sofisticados; pueden ser empleados diferentes tipos de tejidos vegetales; la integración del ADN-T es un proceso relativamente preciso; la región de ADN a ser transferido es definida; baja probabilidad de re arreglos; permite la introducción de segmentos largos de ADN y bajo número de copias del ADN-T (Veluthambi, Gupta y Sharma, 2003, p. 372).

Este proceso inicia cuando se producen heridas en las células de la planta, se liberan al medio compuestos fenólicos y monosacáridos, que son reconocidos por *Agrobacterium*, induciendo una unión entre la bacteria y las células vegetales. Los compuestos fenólicos, monosacáridos y condiciones de pH que presenta el medio circundante son importantes para la activación del sistema de regulación de dos componentes VirA/VirB, que activa la transcripción del regulon Vir. Posteriormente, por la acción cooperativa de las proteínas VirD1 y VirD2 permite la síntesis del ADN-T; la proteína VirD2 se une covalentemente al extremo 5' del ADN-T, mientras que la proteína VirE2 cubre a toda la hebra de ADN-T. Finalmente, este complejo es translocado a las células vegetales, mediante un sistema de secreción tipo IV, que está constituido por un Pili y un canal de secreción, formados por las proteínas VirB y VirD4. Una vez el ADN-T ha llegado a la célula vegetal, las proteínas VirE2 y VirD2 contribuyen a su direccionamiento hacia el núcleo y posterior integración en el genoma vegetal. Cabe mencionar que durante todo el proceso de infección de *Agrobacterium*, se da una continua interacción con las proteínas y sistemas propios de la célula vegetal a ser infectada (Gelvin, 2010, p. 59).

Entre las desventajas del sistema de *Agrobacterium*, se han reportado: el tejido a infectar debe presentar daño físico; los vectores están diseñados solo para infectar el núcleo; se requiere la eliminación de la bacteria de los tejidos infectados mediante el uso de antibiótico; el rango de hospederos está limitado a que estos sean susceptibles a la infección; sin embargo, muchas de estas deficiencias han sido superadas con la implementación de nuevas técnicas y procedimientos (Hansen y Wright, 1999, p. 228).

2.2.2 Métodos indirectos

Liposomas

Los liposomas son vesículas formadas por varias bicapas de lípidos que, al estar compuestos tanto por una fracción lipídica como por una fracción acuosa, pueden alojar sustancias lipofílicas y/o sustancias hidrofílicas, poseen diámetros del orden de nanómetros, con diferentes formas y tamaños. Pueden estar formados por fosfolípidos, fosfatidiletanolamina, ácidos grasos o cationes bivalentes. Los liposomas presentan una tendencia natural a ligarse a células y tejidos interactuando con estos por absorción, fusión o intercambio lipídico (Morigaki y Walde, 2007, p. 77).

En este método, el fragmento de ADN es encapsulado en un liposoma, que permite o facilita su paso, a través de la célula vegetal por endocitosis, ya sea por el plasmodesmo o directamente por la pared celular, hasta el núcleo.

Los métodos de transferencia mediados por liposomas poseen algunas ventajas, como son: protección contra la degradación por nucleasas; capacidad de portar grandes fragmentos de ADN; biocompatibilidad con membranas; no requiere de un portador para el ADN. Los problemas que se han reportado con este sistema de transformación son: frecuencia de transformación muy baja; inserción del ADN en tándem; preparación de los liposomas y encapsulación del material genético a transferir (Vasil, 2007, p. 388).

Biobalística

Se basa en la utilización de micro proyectiles recubiertos del ADN que se desea transferir, que son disparados sobre los tejidos vegetales a altas velocidades, atraviesan la pared y la membrana celular y llevan al interior de la célula los genes de interés para su posterior integración en el genoma vegetal (Vasil, 2007, p. 390).

El mecanismo de disparo se basa en una pistola especial que lanza las partículas a más de 400 m/s sobre el tejido, de forma que penetran sin destruir la membrana celular. Todo el sistema funciona en un vacío moderado para evitar el rozamiento con el aire, condiciones que las células vegetales soportan durante uno o dos minutos. Tras el bombardeo, el ADN se desprende de los micro proyectiles, debido a las modificaciones del entorno iónico. De acuerdo con la localización de los micro proyectiles en la célula, el ADN

se puede integrar de forma estable en núcleo, cloroplastos o mitocondrias de las células vegetales, mediante recombinación al azar. Finalmente, los tejidos son colocados en condiciones adecuadas para la regeneración de plantas, mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Cabe anotar que los tejidos vegetales empleados son sometidos a un tratamiento osmótico pre y pos-bombardeo, con el fin de evitar el daño de las células por el procedimiento (Rao, 2009, p. 761).

Esta técnica fue propuesta, inicialmente, para introducir material genético en el genoma nuclear de plantas, pero en los últimos años se ha usado para transformar bacterias, protozoos, hongos, algas, insectos, tejidos animales y plantas in vivo. Además, en la actualidad, constituye el único método de transformación, que permite transformar organelos celulares (Mohan et. al, 2003, p.1080).

Electroporación

Con esta metodología se busca permeabilizar las membranas mediante el aumento significativo de la conductividad eléctrica, causado por un campo eléctrico aplicado externamente. Las membranas, se desestabilizan originando una pérdida temporal de la permeabilidad produciendo poros reversibles, por los que se produce el paso de macromoléculas, fuga de iones, escape de metabolitos y mayor absorción de ADN, por parte de las células (Fox *et al.*, 2006, p. 477).

Durante la electroporación, se utilizan campos entre los 200 V/cm hasta los 600 V/cm. Cuando el voltaje que atraviesa una membrana plasmática excede su rigidez dieléctrica, siendo esta la resistencia que oponen los materiales a transmitir la electricidad, se forman poros en la membrana. Si la fuerza del campo eléctrico aplicado y la duración de la exposición al mismo se eligen correctamente, los poros formados por el pulso eléctrico se sellan tras un corto periodo de tiempo, durante, el cual, los compuestos extracelulares tienen la oportunidad de entrar a la célula; sin embargo, una exposición excesiva a campos eléctricos puede causar daños irreversibles a las membranas, causando la muerte de las células.

La electroporación se lleva a cabo en un electroporador que utiliza descargas de capacitores para producir pulsos de alto voltaje, originando una corriente eléctrica, que se hace pasar a través de la suspensión, que contiene las células a las cuales se les desea permitir la entrada del ADN foráneo, con el que se pretende transformar las células. El ADN foráneo por introducir debe estar presente en la solución con las células a transformar; este ADN se encuentra contenido en un plásmido, aunque también pueden estar en forma de molécula lineal de ADN (Chen, Smye, Robinson y Evans, 2006, p. 8).

2.3 Situación de los organismos genéticamente modificados en México

Lo que hoy se conoce como ingeniería genética o ADN recombinante, parte del hallazgo en 1970 por Hamilton Smith y Daniel Nathans de la enzima (*restrictasa*) capaz de reconocer y recortar el ADN en secuencias específicas, dio origen al desarrollo de lo que hoy se conoce como ingeniería genética o Biotecnología que permite clonar cualquier gen en un virus, microorganismo, célula de animal o de plantas.

Desde los años 80 México ha desarrollado una destacada red de investigación biotecnológica de calidad reconocida a nivel nacional e internacional. La institución responsable de la regulación en México de los organismos genéticamente modificados es la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM). Dicha comisión agrupa a seis Secretarías de Estado y al CONACYT.

Desde 1995 la Secretaría de Salud ha aprobado algunos productos biotecnológicos para consumo humano por considerarlos inocuos, González (s. f.) los cuales se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Productos transgénicos e inocuos en México para consumo humano

Producto	Característica introducida
1995	
Jitomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) de maduración retardada.	Gen de poligalacturinas del jitomate en antisentido.
1996	
Papa (<i>Solanum tuberosum</i>) resistente a la catarinita de la papa	Gen Cry IIIA de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Tenebrionis
Algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>) resistente a insectos lepidópteros	Gen Cry I(C) de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki
Canola (<i>Brassica napus</i>) resistente al herbicida glifosfato	Gen 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa de <i>Agrobacterium sp.</i> Cepa 4
Jitomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) de maduración retardada.	Gen de poligalacturonasa con actividad reducida, del jitomate
Soya (<i>Glycine max</i> L) resistente al herbicida glifosfato	Gen 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa de <i>Agrobacterium sp.</i> Cepa 4
1998	
Jitomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) de maduración retardada.	Fragmento del gen de la aminociclopropano ácido carboxílico sintetasa del jitomate
1999	
Canola (<i>Brassica napus</i>) resistente al herbicida glufosinato de amonio	Gen de fosfotricina acetil transferasa de <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
2000	
Algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>) resistente al herbicida glifosfato	Gen EPSPS de <i>Agrobacterium spp.</i> Cepa 4
2001	

Canola (<i>Brassica napus</i>) resistente al herbicida glufosinato de amonio	Gen de fosfotricina acetil transferasa de <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
Papa (<i>Solanum tuberosum</i>) resistente a la catarinita de la papa y al virus de enrollamiento de la hoja de la papa	Gen Cry IIIA de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Tenebrionis</i> y gen de la replicasa del virus PLRV
Papa (<i>Solanum tuberosum</i>) resistente a la catarinita de la papa y al virus de la papa	Gen Cry IIIA de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Tenebrionis</i> y gen de la capsida del virus PVY
2002	
Algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>) resistente al herbicida glifosfato y a insectos lepidópteros	Gen Cry I(C) de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Kurstaki</i> HD-73 y gen CP4 SPSPS de <i>Agrobacterium spp.</i> Cepa 4

Fuente: González (s. f.)

En la actualidad se siembran 56.6 millones de hectáreas con cultivos genéticamente modificados en 13 países del mundo, incluyendo México. A partir de 1995, se hace la primera aprobación de comercialización y cultivo de un alimento biotecnológico en México: jitomate Bt (*Bacillus thuringiensis*) de maduración retardada, dicho cultivo se hizo en el Estado de Sinaloa y el permiso fue otorgado a la empresa Campbell's Sinaloplasta. Con esta aprobación de vegetales, devienen como se puede observar en el cuadro anterior, la aprobación de los cultivos biotecnológicos resistentes a insectos y herbicidas, tales como son la soya, papa, canola y el algodón.

En el año de 1998 el maíz transgénico se comienza a importar a México y de ahí en adelante se han autorizado para su introducción y venta para consumo humano, poco más de 31 alimentos transgénicos, entre ellos la papa, alfalfa, calabaza, calabacita, piña, plátano, cártamo, clavel, chile, limón, melón, trigo y tabaco.

Para el primero de junio del 2003 en México se habían autorizado un total de 248 ensayos de cultivos transgénicos a diferentes compañías. La compañía estadounidense Monsanto (empresa líder en la aplicación biotecnológica en alimentos) encabeza la lista con 79 autorizaciones en nuestro país, de las 248.

Todas las variedades de alimentos transgénicos mencionados con anterioridad se cultivan en el norte y el sureste del país respectivamente, en Baja California, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Morelia, Nayarit, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Oaxaca y Veracruz.

Es así como México se convierte en uno de los diez principales países que siembran cultivos modificados genéticamente en el mundo. De esta manera este país se ha consolidado como una de las naciones en desarrollo de América Latina, más avanzadas en lo que a biotecnología se refiere.

Capítulo 3. Generalidades a cerca de los métodos utilizados para la identificación de alimentos transgénicos

La base de todas las técnicas de detección de OGM consiste en explotar la diferencia entre la variedad no modificada y la planta transgénica. Esto puede hacerse detectando el nuevo ADN transgénico que se ha insertado, o la nueva proteína expresada, o (si la proteína actúa de enzima) utilizando el análisis químico para detectar el producto de la reacción enzimática.

Hay dos planteamientos científicos que se utilizan generalmente en la actualidad para detectar modificaciones genéticas en plantas como la soya, el maíz, el algodón y otras. Uno es estudiar la presencia de proteínas específicas, explotando la especificidad de la unión entre un antígeno expresado y un anticuerpo diana; el otro se basa en la detección de secuencias nuevas de ADN insertadas en el genoma de la planta. Estos métodos muestran la ausencia o presencia del OGM en la muestra, pero a veces también pueden dar una indicación cuantitativa sobre la muestra estudiada (Querci, Jermini y Van den Eede, 2007).

3.1 Métodos para la identificación de transgénicos en alimentos

La incorporación de este tipo de alimentos a la dieta ha llevado a muchos países a introducir una legislación específica para el control de su producción y comercialización. En los últimos años se aprobaron diversas normas que imponen la obligación de identificar los OGM a través de leyendas en el rótulo o bien mediante la exhibición de listas de esos productos en los puntos de venta al público (Schiavone, Morón y Lema, 2006).

Existe falta de comunicación efectiva acerca de los riesgos reales de la producción y el consumo de alimentos transgénicos sobre los recursos de los cultivadores, la salud de los consumidores y el medio ambiente. Es por eso por lo que el consumidor debe tener la decisión propia de adquirir este tipo de alimentos o no, por tal motivo, es necesaria la identificación de transgénicos en alimentos mediante técnicas de análisis biotecnológico; como es el caso de los productos industrializados elaborados a base de manzana que son comercializados en México (Sharma et al., 2002, p. 111; Rommens, 2004, p. 458)

3.1.1 Métodos de análisis basados en la detección de proteínas

El método de proteínas utiliza anticuerpos específicos de la proteína de interés. La técnica de ELISA, por sus siglas en inglés “Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay”, detecta o mide la cantidad de proteína de interés en una muestra que puede contener otras muchas proteínas diferentes. Utiliza un anticuerpo para ligar la proteína específica, un segundo anticuerpo para amplificar la detección (fase optativa) y un conjugado de anticuerpo con una enzima, cuyo producto genera una reacción colorida, que es fácil de observar y cuantificar comparando con una curva patrón de la proteína de interés (Danilova, 2007, p. 572).

La técnica de ELISA es menos sensible que la PCR; tiene elevados costos iniciales para el desarrollo del ensayo y la obtención de anticuerpos y patrones de proteínas, pero su costo se reduce cuando se elaboran los reactivos; no discrimina entre diferentes modos y modelos de expresión de diferentes productos transgénicos que expresan características proteínicas similares. Por lo anterior en la detección de OGM se tiene claro que la PCR y el ELISA deben considerarse mutuamente complementarios y no se excluyen entre sí (Job, 2002, p. 1107).

3.1.2 Métodos de análisis basados en la detección de ADN

La biotecnología moderna implica el manejo del material genético, por lo cual los métodos analíticos basados en la técnica de la PCR permiten la detección, identificación y cuantificación de secuencias de ADN asociadas con OGM. La PCR permite la amplificación selectiva de segmentos de ADN presentes en una muestra (Díaz, Zappacosta, Franzone y Ríos, 2004).

La PCR es una técnica de laboratorio cuya realización exige personal capacitado y equipo especializado. Permite detectar la presencia de una sola secuencia de ADN presente en una muestra por lo que deben extremarse las medidas de bioseguridad en la manipulación de las muestras, evitando la contaminación cruzada y por lo tanto emitir falsos positivos.

El análisis de la muestra lleva un día aproximadamente; sin embargo, los métodos de diagnóstico para identificar productos transgénicos específicos necesitan más tiempo para su realización y actividades de validación (SENASICA, 2016).

La PCR es capaz de detectar la mayoría de los OGM cuya comercialización está autorizada actualmente (Lipp, Brodmann, Pietsch, Pauwels y Anklam, 1999, p. 925). Es un método de análisis eficaz que si realiza en laboratorios provistos del equipamiento especializado podría generar resultados hasta en 3 días.

Este método, según Pietsch, Waiblinger, Brodmann y Wurz (1997), se basa en la detección de las secuencias de control que flanquean al gen introducido, y que son el promotor 35S y el terminador Tnos. A continuación, en el Cuadro 4 se muestra la comparación resumida entre las técnicas de PCR Y ELISA.

Cuadro 4. Comparación resumida de los métodos ELISA y PCR

Método	Objeto	Duración	Facilidad de uso	Resultados
ELISA	Proteínas	2-8 h	Moderada; exige conocimiento de las prácticas de laboratorio; los ensayos son específicos de especie y de variedad.	Confirma una modificación genética específica y permite la cuantificación.
PCR	ADN	1-3 días	Escasa; requiere formación y material especializado	Muy sensible; tiende a falsos positivos; confirma la presencia de ADN GM y permite la cuantificación

Fuente: Creación propia

3.1.3 Ventajas de la utilización de ADN para la identificación de transgénicos

Los métodos basados en la detección de ADN se utilizan para la identificación de alimentos transgénicos que han sido procesados o tratados fisicoquímicamente (calor, presión, etc.), ya que en ellos las proteínas pueden desnaturalizarse o degradarse en el proceso, y los métodos analíticos de proteína se ven afectados por estos cambios. Sin embargo, el ADN puede fragmentarse durante el procesado en trozos pequeños, pero esto no implica que no pueda ser detectado. Aunque el ADN también se degrada durante algunos procesos como la esterilización por calor durante el enlatado de alimentos, todavía es posible obtener pequeños fragmentos con suficientes diferencias de secuencias como para hacer posible la diferencia entre especies cercanas. Por lo general se utiliza el ADN mitocondrial debido a que tiene un mayor número de copias por célula que el ADN nuclear, tiene la capacidad de identificar muestras biológicas mucho más pequeñas, dañadas o degradadas; aunque también se utilizan secuencias procedentes de genes de la familia lactina. Ambos tipos de secuencias cumplen con las características necesarias para ser utilizadas como indicativos de especie, al estar presentes en todas las especies y presentar una gran variabilidad entre las mismas (López, Mallorquín y Vega, 2003, p. 46).

3.2 Importancia de la identificación de transgénicos en alimentos por PCR

Aunque en algunos países no hay obligatoriedad de etiquetado de transgénicos, la comercialización internacional exige rastreabilidad de los productos que se importan o exportan. Así, de una u otra forma, se requieren métodos suficientemente sensibles para detectar la presencia de transgenes en ingredientes y productos alimenticios (Kok, Aarts, Van Hoef, Kuiper, 2002, p. 799).

Uno de los métodos más sensibles utilizados actualmente, es la amplificación del ADN por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). 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 (CaMV 35S), el terminador de la nopalina sintetasa (Tnos), la octopina sintetasa (OCS) y los terminadores CaMV (Stram et al., 2000, p. 605). También se pueden detectar genes que confieren resistencia a antibióticos, ya que se utilizan como marcadores de selección de la inserción del transgen en el genoma hospedero.

Para permitir la PCR, el ADN debe tener la integridad, pureza y concentración adecuadas. El procesamiento del ingrediente o alimento completo a analizar ya sea térmico, con solventes o de otro tipo, afecta la calidad del ADN. El uso en conjunto de PCR y geles de electroforesis capilar parece ser una buena alternativa para la detección de organismos transgénicos en alimentos, basados en el análisis de ADN. En combinación con PCR competitiva, el análisis de electroforesis permite la detección precisa de los diversos transgenes amplificados, como una alternativa a PCR (Kuiper, 1999, p. 342; Terry, Harris y Parkes, 2002, p. 770).

3.2.1 Principios de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La reacción en cadena de la polimerasa, desarrollada por Kary Mullis es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos. Se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar. El principio de la PCR consiste en determinar la secuencia de interés y seleccionar pequeños segmentos de nucleótidos llamados primers, iniciadores o cebadores, complementarios con la secuencia de nucleótidos de los extremos opuestos de las cadenas que flanquean a dicha secuencia, a partir de

los cuales mediante la acción de la Taq polimerasa, se inicia la elongación o síntesis de nuevas cadenas en el extremo 3' de cada iniciador, para obtener múltiples copias de dicho segmento (Rodríguez y Barrera, 2004, p. 325).

Las aplicaciones de la PCR son múltiples, algunas de ellas son la amplificación de fragmentos de genes, modificación de fragmentos de ADN, detección sensible de microorganismos y sus mutaciones importantes en enfermedades hereditarias, transformación maligna o tipaje de tejidos, el análisis de marcadores genéticos para aplicaciones forenses, pruebas de paternidad y mapeo de rasgos hereditarios, estudio de expresión de genes, confirmación con fiabilidad y rapidez de la calidad y pureza de los alimentos y productos alimenticios, farmacogenómica, etc. (Costa, 2004, p. 303).

Esta técnica permite amplificar pequeñas cantidades de ADN entre cientos de miles de millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta más de 2 mil nucleótidos de longitud. El segmento de ADN que sirve de molde no requiere estar en estado puro, si no que puede ser parte de mezclas complejas (Kuiper, 1999, p. 346). La Figura 19 muestra el esquema de amplificación exponencial del ADN mediante PCR.

La amplificación, que es el número final de ejemplares de la secuencia diana, se expresa con la siguiente ecuación: $(2^n - 2n)x$ donde n es el número de ciclos, 2n es el número de moléculas del primer producto obtenidas tras el primer ciclo y de los segundos productos obtenidos tras el segundo ciclo con longitud indefinida, x es el número de ejemplares del ADN molde original (Sambrook y Russell, 2001, p. 2100).

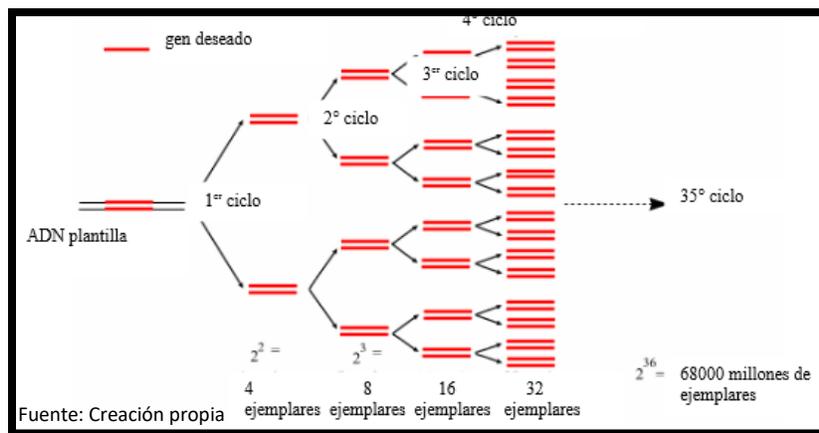


Figura 19. Amplificación exponencial del ADN mediante PCR

3.2.2 Componentes de la reacción

ADN diana

Se utiliza el ADN que se requiere amplificar. Puede efectuarse la amplificación por PCR si está presente al menos un ejemplar intacto del gen diana.

El tamaño de la secuencia diana puede variar y la cantidad total de ADN utilizada normalmente para la PCR está entre 0,05 y 1,0 μg , lo que permite la detección de ejemplares solos de la secuencia diana. Aunque las muestras no tienen que estar muy purificadas, sí es necesario eliminar algunos contaminantes, como la heparina, el formol, los agentes quelantes de Mg^{2+} o los detergentes, para evitar que inhiban el proceso de amplificación.

Primers

Los oligonucleótidos, iniciadores o primers son fragmentos complementarios que van a unir cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN. La posición de los iniciadores debe ser relativa a los codones de inicio y terminación.

Las concentraciones óptimas de los primers son generalmente entre 0.1 y 0.5 μM . Esto resulta suficiente para al menos 30 ciclos de amplificación. Altas concentraciones de primer pueden promover acumulación de producto no específico y puede incrementar la probabilidad de generar un templado independiente llamado dímero de primer.

Los productos no específicos y los dímeros de primers son por si mismos sustratos para PCR y compiten con el producto deseado por la enzima, dNTPs y primers, resultando en un bajo rendimiento del producto deseado.

Los primers pueden contener extensiones en el extremo 5' para incorporar sitios de enzimas de restricción, un codón de inicio ATG, o secuencias promotoras en la secuencia blanco. Pueden ser usados primers de- generados para extraer genes nuevos en base a su similitud o su secuencia de aminoácidos.

Nucleótidos

Los nucleótidos se diluyen en agua, la solución debe ser protegida, si no, un pH ácido promoverá la hidrólisis del dNTP en dNDP y dNMP y los hará inútiles para las reacciones de polimerización del ADN. Los stocks son diluidos a 10 mM, alicuotados y almacenados a -20 °C. Es recomendado usar un stock de trabajo que contenga 1mM de cada dNTP.

La estabilidad de los dNTP durante ciclos repetidos de PCR es tal que aproximadamente el 50% permanece como dNTP después de 50 ciclos. Concentraciones entre 20 y 200 μ M resultan en un balance óptimo entre rendimiento, especificidad y fidelidad. Los cuatro dNTP deben ser usados en concentraciones equivalentes para minimizar errores de incorporación de bases. Se debe decidir la más baja concentración adecuada de dNTP para la longitud y composición de la secuencia blanco.

Enzima ADN polimerasa

Aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*. Aunque esta enzima es probablemente la más utilizada a efectos de la PCR, en el comercio pueden encontrarse algunas otras. La temperatura óptima de funcionamiento de esta enzima es de 70 a 80 °C, a la que la bacteria sintetiza ADN a la velocidad de 35 – 100 nucleótidos. Se conoce como posesividad el número medio de nucleótidos que incorpora una enzima al ADN antes de separarse del ADN molde.

Otros componentes de la reacción

Un buffer recomendado para PCR es de 10-50 mM de Tris-HCl (pH entre 8.3 -8.8). Tris es un buffer iónico bipolar que tiene un pKa de 8.3 a 20°C, sin embargo, el verdadero pH de un buffer 20mM de Tris (pH 8.3 a 20°C) varía entre 7.8 y 6.8 durante las condiciones típicas del termociclador.

Hasta 50 mM de KCl puede ser incluido en la mezcla de reacción para facilitar el alineamiento de los primers. NaCl a 50 mM o KCl arriba de 50 mM inhibe la actividad de la Taq polimerasa.

La gelatina o la albúmina bovina (100 µg/ml) y detergentes no iónicos como el tween 20 o laureth 12 (0.05 a 0.1%) son incluidos para ayudar a estabilizar la enzima, sin embargo, muchos protocolos trabajan bien sin estos componentes (Cortázar y Silva, 2004, p. 24).

3.2.3 Etapas de la PCR

La reacción de la cadena de la polimerasa presenta varias etapas, que cumplen funciones diferentes en el proceso, algunas se dan una sola vez mientras que otras se repiten n veces dando lugar a ciclos de amplificación. Consta de cuatro pasos los cuales son: desnaturalización de la muestra, hibridación o annealing, extensión y desnaturalización.

Desnaturalización inicial

Se da por el aumento de temperatura y solo se realiza una vez. La muestra de ADN se desnaturaliza para dar lugar a hebras simples. El calentamiento inicia a unos 95° durante un periodo de 3 a 5 minutos suficiente para desnaturalizar por completo el ADN genómico, el cual, en las condiciones en las que tiene lugar la reacción, ya no vuelve a renaturalizarse por completo.

Desnaturalización

Las hélices de ADN formadas se separan por aumento de la temperatura a 90 - 95 °C. Esta fase suele ser más corta que la primera y depende del diseño de cada PCR.

Hibridación o annealing

Disminuye la temperatura del medio para que pueda darse la unión de los primers a sus dianas en el ADN, la temperatura en esta fase se determina empíricamente según las características de los primers, oscila entre 50-60 °C. La temperatura se selecciona de manera que el procedimiento tenga el máximo nivel de

especificidad y sensibilidad. Las temperaturas bajas aumentan la sensibilidad del proceso, al tiempo que la especificidad disminuye; las temperaturas elevadas disminuyen la sensibilidad y aumentan la especificidad. El éxito de la unión de los primers va a depender del número de copias del ADN diana y de si hay tiempo suficiente para que estos se unan a su secuencia complementaria. El tiempo de hibridación de los primers suele ser de 20 y 40 s, aunque depende del tipo de termociclador que se utilice.

Extensión

La temperatura del medio se incrementa hasta alcanzar la temperatura óptima de funcionamiento del ADN polimerasa; en el caso de la Taq polimerasa, se encuentra alrededor de 72 °C. Normalmente suele dar buenos resultados la utilización de tiempos de elongación que van desde 20 segundos, para fragmentos de 500 pares de bases, hasta 40 s para fragmentos por encima de 1.2 kilobases.

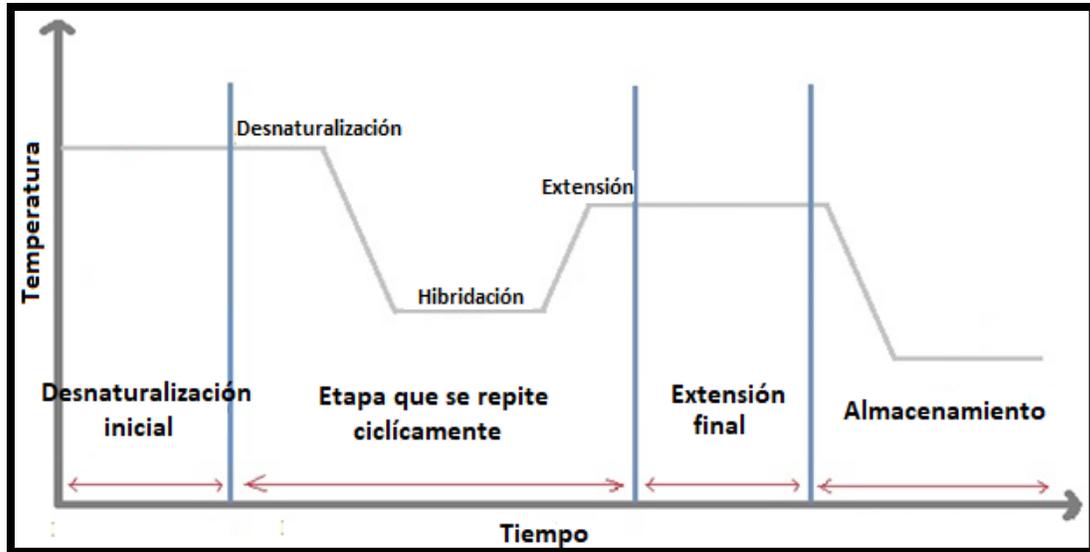
Extensión final

Normalmente tras el último ciclo se añade un periodo de incubación a 72 °C de 5 a 12 minutos, para permitir que se complemente la elongación de los productos que hayan quedado parcialmente sintetizados (Roa, Jordi y Rodríguez, 2004, p.73).

Todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, el cual permite calentar y enfriar los tubos de reacción controlando la temperatura y el tiempo necesario para cada etapa de la reacción. La automatización del proceso se debe al descubrimiento de la enzima Taq polimerasa termoestable, que eliminó el inconveniente de agregar enzima fresca en cada paso de la reacción (Watson, 2006, p. 522).

Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa.

Las etapas de la PCR se representan mediante una gráfica como la que se muestra en la Figura 20.



Fuente: Creación propia

Figura 20. Representación gráfica de la PCR

3.2.4 Consideraciones para el diseño de primers

La selección de primers es muy importante en la reacción de la cadena de la polimerasa porque de este paso depende el éxito en el laboratorio ya que si no existe una unión perfecta entre el ADN diana y el extremo 3' del primer puede conducir a un fallo en la PCR, por ello se requiere un diseño cuidadoso para la obtención de los primers. Es recomendable que el primer frontal se encuentre más o menos a 35 pb del inicio de la secuencia que codifica, de la misma forma el cebador reverso debe localizarse 35 pb después de la región que codifica.

Existen programas en la red que ayudan al diseño de primers, algunos de ellos se enlistan a continuación:

- Primer-BLAST
- Primer Premier 5
- OLIGO Primer Analysis Software
- Osprey
- Primer 3
- Net Primer y PrimerQuest

En el Cuadro 5 se muestran los criterios a considerar para la selección adecuada de los primers.

Cuadro 5. Criterios para la selección de primers

Característica	Diseño óptimo
Longitud	20-25 nucleótidos de longitud, generalmente: 18-30 nucleótidos de longitud
Concentración	Entre 0.1 y 0.5 μ M
Tm	55-62 °C
Base en el extremo 3'	Debe ser una G o una C
Contenido GC	40-60 %
Autocomplementariedad	Debe ser evitada para minimizar la formación de estructuras secundarias
Similitud	Debe tener un 100% de apareamiento con el molde
Especificidad	Secuencia única dentro del ADN a amplificar

(Somma y Querci, 2007, p. 116)

3.2.5 Limitaciones y eficiencia de la PCR

Entre los problemas que plantea la PCR, está la presencia de inhibidores en las muestras. Diversos productos orgánicos que se hallan naturalmente en las muestras pueden inhibir la reacción.

También hay que tener en cuenta que solo se puede amplificar fragmentos de ADN de una determinada longitud más allá de la cual la polimerasa deja de actuar. El tipo de polimerasa entre otros parámetros condiciona la longitud del fragmento que puede sintetizarse eficazmente.

Para poder construir oligonucleótidos específicos que actúen como cebadores para la amplificación selectiva de una secuencia particular de ADN, se necesita disponer de alguna información previa sobre la propia secuencia a amplificar. Esto implica, por regla general, que la región de interés ya haya sido parcialmente caracterizada, a menudo mediante la aplicación de métodos de clonación basados en sistemas celulares.

Otro problema son las contaminaciones que pueden ser de dos tipos: la contaminación puntual de una muestra negativa por otra positiva durante el proceso inicial de extracción del ADN y la contaminación general del laboratorio con los amplificadores de una PCR previa (Perera, Tormo y García, 2002, p. 225).

3.2.6 Electroforesis

La electroforesis constituye parte importante del procedimiento rutinario del análisis de los ácidos nucleicos. Así como el microscopio permite visualizar microorganismos y estructuras similares, la electroforesis ayuda a observar los ácidos nucleicos al final de un procedimiento como PCR.

La concentración e integridad del ADN extraído, así como el tamaño de distintos fragmentos de ADN pueden ser verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. La electroforesis consiste en la separación de moléculas (proteínas, isoenzimas, ácidos nucleicos) a través de una matriz tamponada (agarosa, acrilamida, almidón).

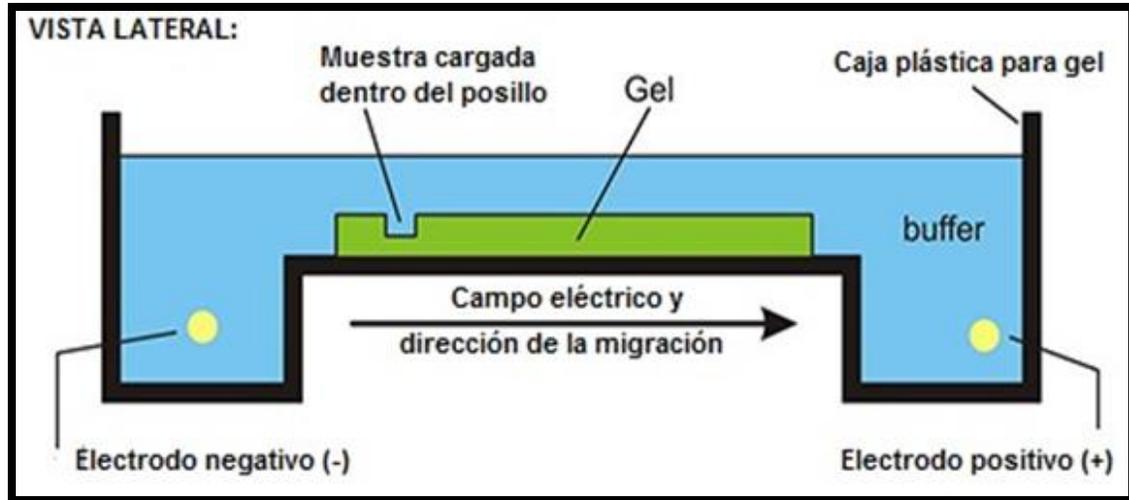
La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo con el tamaño y la carga neta que poseen. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable por la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis.

En la electroforesis de tipo vertical, se analizan tanto moléculas de ADN como proteínas, mientras que en la electroforesis horizontal generalmente se trabaja con ADN o ARN.

La técnica para la cuantificación de ADN consiste simplemente en la utilización de una secuencia de concentraciones de solución patrón de ADN con la que se comparan muestras de ADN de concentración desconocida. El cálculo de las concentraciones se hace bajo la luz ultravioleta según la fluorescencia. Debe evitarse la exposición prolongada a la luz ultravioleta, incluso con máscara de protección. La estimación de las concentraciones de ADN puede realizarse sobre una fotografía digital del gel tomada bajo luz ultravioleta si se cuenta con un analizador de imágenes.

La concentración de agarosa y el voltaje con los que se debe trabajar dependen del tamaño del segmento de ADN que se quiera visualizar. Para los segmentos de ADN de gran tamaño, deben trabajarse concentraciones del 0.8 % y voltajes de 60 V para evitar la fragmentación de este. Los segmentos de 1500 pb en adelante con geles al 1 %, los segmentos de 500 pb a 1500 pb en geles 1.5 % o 2 % y los pequeños segmentos de 100 pb a 500 pb en geles al 4 % o 6 %. Para estos el voltaje puede variar de 20 V a 120 V dependiendo de la velocidad a la que quiera que migre el ADN, a voltajes elevados corren más rápido las muestras (Posso y Ghneim, 2008, p. 23).

El equipo utilizado para la electroforesis se esquematiza en la Figura 21.

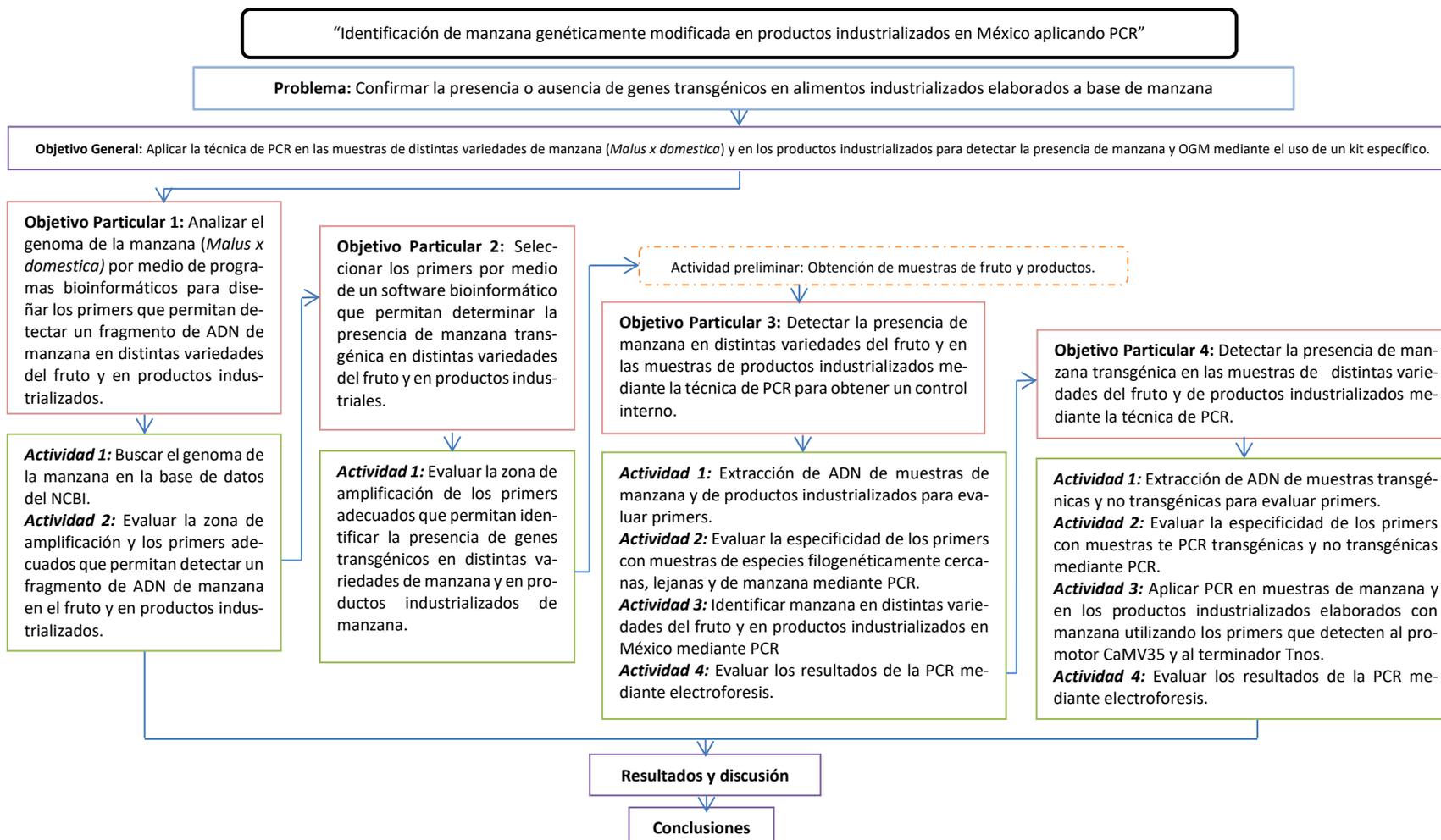


Fuente: Creación propia

Figura 21. Cámara de electroforesis con gel de agarosa

Capítulo 4. Metodología experimental

4.1 Cuadro metodológico



4.2 Justificación

El consumo de frutas en la dieta diaria tiene un efecto nutrimental benéfico para el ser humano. Los consumidores de alimentos tanto de frutas como de los productos derivados de ellas exigen alta calidad constante y buscan variedades con propiedades mejoradas de salud, conveniencia o sabores novedosos, objetivos que en la actualidad son cumplidos al producir alimentos procesados mediante tecnologías de ingeniería genética.

La producción de manzana en México alcanza cerca de 3 mil mdp anuales y la superficie destinada a este cultivo es de 62 mil hectáreas, principalmente en el norte del país. En la actualidad, debido a la economía abierta, los productores nacionales deben enfrentarse a la competencia externa, y solo podrán hacerlo aquellos que ofrezcan mejor calidad, presentación y precio, además de que sus costos de producción sean competitivos en el mercado.

A pesar de que en México es poca la producción de cultivos transgénicos, se importan granos y alimentos provenientes de Estados Unidos, el principal productor de cultivos y alimentos transgénicos; por lo tanto, es probable que los productos que ofrece la industria alimentaria sean alimentos elaborados a partir de materias primas transgénicas. Resulta complicado enunciar con certeza qué productos del mercado son transgénicos debido a que en México y Estados Unidos los alimentos transgénicos no son etiquetados como tales.

Este estudio permite evaluar la presencia de genes modificados en manzana sin procesar y en productos industrializados a base de manzana como lo son jugo, puré, mermelada, fruto seco, yogurt, sidra, vinagre, té y refresco de marcas comerciales con la finalidad de conocer si en México se utiliza manzana transgénica en la industria.

4.3 Descripción del cuadro metodológico

Para la elaboración de este proyecto se cumplirán los cuatro objetivos particulares que se describen a continuación, con la finalidad de identificar si en México los consumidores de manzana y de productos derivados de ella, incluyen transgénicos en su dieta, sin estar conscientes de ello al no estar declarado en el etiquetado de los alimentos.

4.3.1 Objetivo general

Aplicar la técnica de PCR en las muestras de distintas variedades de manzana (*Malus x domestica*) y en los productos industrializados para detectar la presencia de manzana y OGM mediante el uso de un kit específico.

4.3.2 Objetivo particular 1

Analizar el genoma de la manzana (*Malus x domestica*) por medio de programas bioinformáticos para diseñar los primers que permitan detectar un fragmento de ADN de manzana en distintas variedades del fruto y en productos industrializados.

Actividad 1

Buscar el genoma de la manzana en la base de datos del NCBI.

Actividad 2

Evaluar la zona de amplificación y los primers adecuados que permitan detectar un fragmento de ADN de manzana (*Malus x domestica*) en el fruto y en productos industrializados.

4.3.3 Objetivo particular 2

Seleccionar los primers por medio de un software bioinformático que permitan determinar la presencia de manzana transgénica en distintas variedades del fruto y en productos industriales.

Actividad 1

Evaluar la zona de amplificación de los primers adecuados que permitan identificar la presencia de genes transgénicos en distintas variedades de manzana (*Malus x domestica*) y en productos industrializados derivados de ella.

4.3.4 Objetivo particular 3

Detectar la presencia de manzana (*Malus x domestica*) en distintas variedades del fruto y en las muestras de productos industrializados mediante la técnica de PCR para obtener un control interno.

Actividad 1

Extracción de ADN de muestras de manzana (*Malus x domestica*) y de productos industrializados para evaluar primers.

Actividad 2

Evaluar la especificidad de los primers con muestras de especies filogenéticamente cercanas y lejanas de manzana (*Malus x domestica*) mediante PCR.

Actividad 3

Identificar manzana en distintas variedades del fruto y en productos industrializados en México mediante PCR.

Actividad 4

Evaluar los resultados de la PCR mediante electroforesis.

4.3.5 Objetivo Particular 4

Detectar la presencia de manzana transgénica en las muestras de distintas variedades del fruto y de productos industrializados mediante la técnica de PCR.

Actividad 1

Extracción de ADN de muestras de manzana y de productos industrializados para evaluar primers.

Actividad 2

Evaluar la especificidad de los primers con muestras de PCR transgénicas y no transgénicas mediante PCR.

Actividad 3

Aplicar PCR en muestras de manzana (*Malus x domestica*) y en los productos industrializados elaborados con manzana (*Malus x domestica*) utilizando los primers que detecten al promotor CaMV35 y al terminador Tnos.

Actividad 4

Evaluar los resultados de la PCR mediante electroforesis.

4.4 Materiales y métodos

4.4.1 Metodología de diseño de primers para la identificación de manzana (*Malus x domestica*)

Los primers empleados en este proyecto se diseñaron mediante el análisis del genoma de la especie *Malus x doméstica*, mejor conocida como manzana. Se ingresó en la página del National Center for

Biotechnology Information, NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), con el fin de obtener una pareja de primers que permitieran la detección de un fragmento específico de ADN de manzana en muestras de distintas variedades y en muestras de productos industrializados elaborados con manzana. La metodología del diseño empleada para obtener los primers en la página del NCBI, se describe en el Anexo 1. En el Cuadro 6 se observa la pareja de primers diseñados para la detección de manzana (*Malus x domestica*).

Cuadro 6. Primers diseñados para la detección de manzana (*Malus x domestica*)

Secuencia de primers (5' - 3')			Amplificado (pb)	Codifica para
Frontal	GTCGGTTACATCTTCCGATCTT	22 pb	287	Cromosoma 2
Reverso	ACCCACAATACCCGATTCTTC	21 pb		

Fuente: Creación propia

Después de realizar el diseño de primers, se calculó su temperatura de hibridación (T_m) empleando la herramienta "Tm Calculator" (<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/.../tm-calculator.html>). La metodología para el cálculo de T_m se muestra en el Anexo 2.

Posteriormente se realizó el programa de la PCR para el cual se emplearon las condiciones descritas en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Condiciones de operación de PCR directa para la detección de manzana

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	5 min	1
Desnaturalización	98	5 s	40
Hibridación	63.9	5 s	
Elongación	72	20 s	
Etapa final	72	1 min	1

Fuente: Creación propia

Para la detección de manzana en productos industrializados se utilizó el programa propuesto en el Kit Phire Plant Direct[®] (Figura 22).

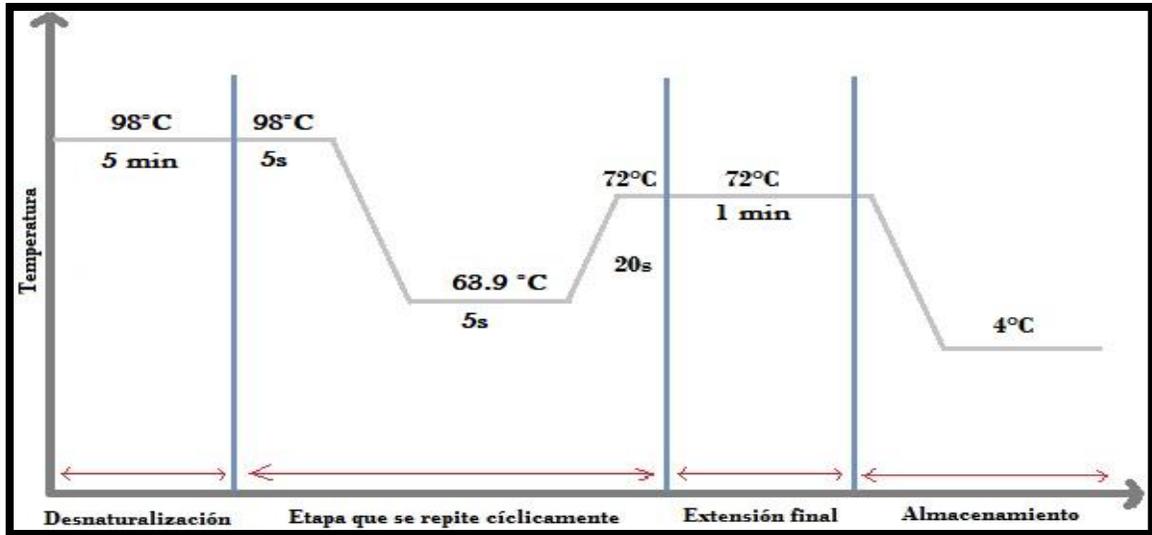


Figura 22. Programa de PCR con Tm calculada para detección de manzana (*Malus x domestica*)

4.4.2 Metodología del diseño de primers para identificación de manzana transgénica

Para identificar la presencia de manzana transgénica en las muestras de manzana (*Malus x domestica*) y en los productos industrializados elaborados con manzana, se utilizó el promotor CaMV 35S y el terminador Tnos; de acuerdo con lo reportado por Holden, Levine, Scholdberg, Haynes y Jenkins, 2010, p. 277; en su artículo: “The use of 35S and Tnos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials”, su secuencia se muestra en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Promotor CaMV 35S y Terminador Tnos para la identificación de manzana transgénica

Secuencia de primers (5' - 3')			Amplificado (pb)
Promotor CaMV 35S (Virus del mosaico de la coliflor)	Frontal	GCTCCTACAAATGCCATCA	195
	Reverso	GGATAGTGGGATTGTGCGTC	
Terminador Tnos (Terminador de la nopaline sintetasa)	Frontal	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	180
	Reverso	TTATCCTAGTTTGCGCGCTA	

Fuente: Creación propia

La temperatura de hibridación (T_m) calculada para los primers, tanto frontal como reverso, del CaMV 35S y Tnos se muestra en el Anexo 2 y fue de 60 °C; sin embargo, las condiciones de operación para la prueba de PCR que se emplearon en este proyecto se tomaron de referencia de acuerdo con lo establecido en el Kit Phire Plant Direct[®] y se muestran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Condiciones de operación PCR para identificación de manzana transgénica

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	5min	1
Desnaturalización	98	5 s	35
Hibridación	60.7	5 s	
Elongación	72	20 s	
Etapa final	72	1 min	1

Fuente: Creación propia

La programación del termociclador para la identificación de manzana transgénica en los productos industrializados de manzana, aplicando la técnica de PCR directa se describe en la Figura 23.

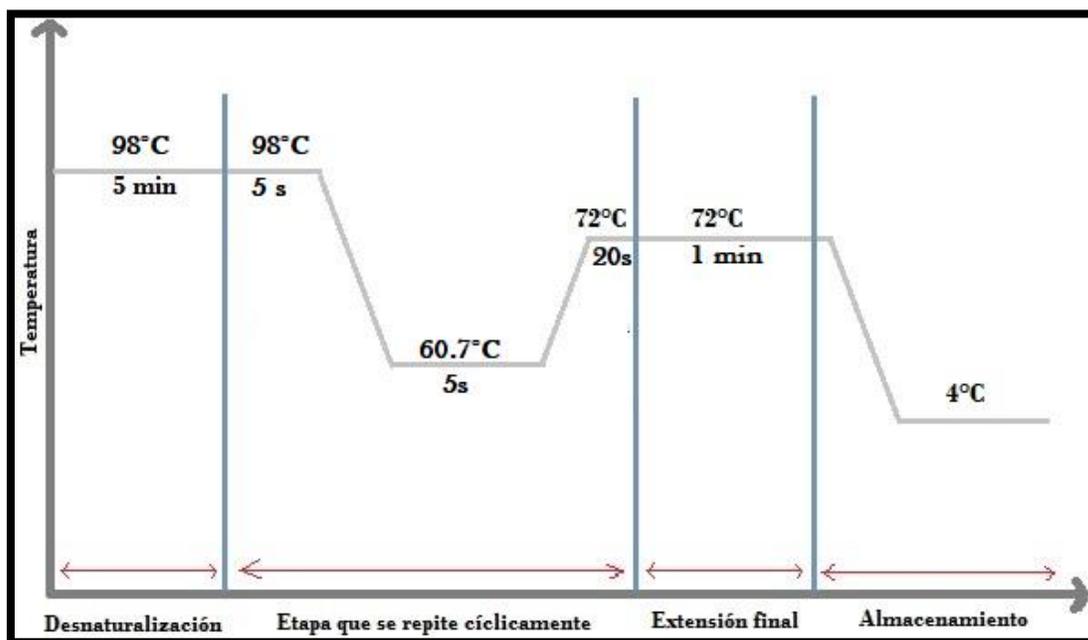


Figura 23. Programa de PCR para la identificación de manzana transgénica

4.4.3 Generalidades de las muestras

Para la elaboración de este proyecto se eligió estudiar 4 variedades de manzana obtenidas en un mercado local de Cuautitlán Izcalli y 9 productos industrializados elaborados a base de manzana y de marcas comerciales, que fueron obtenidos en tiendas de autoservicio.

En el Cuadro 10 y en el Cuadro 11 se muestran las generalidades de las muestras de manzana y de productos industrializados, respectivamente.

Cuadro 10. Generalidades de las muestras de manzana

No.	Muestra	Código	Precio por Kg (\$)	Origen
1	Granny Smith	M1	94.00	USA
2	Golden Delicious	M2	26.00	México
3	Royal Gala	M3	56.00	Chile/USA
4	Red Delicious	M4	24.90	México

Fuente: Creación propia

Cuadro 11. Generalidades de las muestras de productos industrializados

No.	Muestra	Código	Marca	Contenido	Precio (\$)	Lote y caducidad
1	Jugo de manzana	JM	Del Valle	450 mL	9.50	L 345 43K3 14/oct/16
2	Refresco	PM	Peñafiel	355 mL	8.50	33456 21/Ene/16
3	Sidra	SD	El Pomar	680 mL	42	L 1031
4	Té	TM	Apple Cinder	21 g	8.00	Mayo/2017 CA5132
5	Vinagre	VM	Clemente Jaques	500 mL	10.20	L 7 04/Mayo/17
6	Puré de manzana	PM	Gerber	113 g	10.20	51734511C1 Jun/17
7	Mermelada de manzana con canela	MM	Agave Sweet	340 g	31.90	1248 30/May/17
8	Yogurt bebible de manzana	YM	Lala	240 g	6.20	33 117 M2 02/Nov/15
9	Manzana seca	MS	Arte sano	250 g	27.50	No especificado

Fuente: Creación propia

Se asignó un código a cada muestra para su posterior identificación. Dichos productos fueron seleccionados ya que según la guía roja y verde de alimentos transgénicos (Greenpeace, 2014) los fabricantes como Coca Cola, Lala, Del Valle, Clemente Jaques, Peñafiel y Nestlé no pueden garantizar que sus productos no contengan transgénicos. Por tal motivo, algunos de los productos en estudio pertenecen a estas compañías, tales como el puré de manzana Gerber (Nestlé), yogurt de manzana bebible (Lala), vinagre de manzana (Clemente Jaques), refresco de manzana (Peñafiel) y jugo de manzana Del Valle (Coca Cola). La mermelada Agave Sweet es comercializada en tiendas de auto-servicio tales como Superama y Walmart, sin embargo, no declara contener transgénicos en su etiquetado, al igual que la sidra, la manzana seca y el té, muestras conseguidas en un mercado local de Cuautitlán Izcalli.

4.4.4 Extracción de ADN (Protocolo clásico Sambrook, 2001)

MATERIAL BIOLÓGICO

- Jugo, puré, mermelada, vinagre, té, refresco, manzana seca, yogurt, sidra, manzana de distintas variedades.

MATERIAL DE LABORATORIO

- Tubos eppendorff esterilizados
- Kit de micropipetas de 5 – 1 000 μL
- Puntas para micropipetas
- Guantes
- Marcadores para etiquetar tubos
- Bata de laboratorio
- Contenedores de desechos líquidos
- Contenedores de puntas utilizadas

REACTIVOS

- Agua libre de nucleasas con pH de 7
- Solución de lisis (Tris base 0.05 M, pH 8, EDTA 0.1M, SDS 0.5%)
- Enzima proteinasa K
- Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico
- Etanol frío

EQUIPO

- Balanza analítica electrónica, VELAR VE-300
- Vortex Mixer, Apollo CLP S0100
- Termoblok, Thermomixer compact Eppendorff
- Microcentrífuga

METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE ADN

Disgregación del tejido

1. Se pesaron 0.125g de muestra en un tubo eppendorff.
2. Se agregaron 1 250 μ L de solución de lisis.
3. Se adicionaron 7 μ L de proteinasa K.
4. Se incubaron los tubos a 50°C en el termoblok por 2 horas.
5. Se elevó la temperatura de incubación a 60 °C por 1 hora, para desactivar la enzima.

Extracción de proteína y polisacáridos de ADN

1. Se agregaron 250 μ L de mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico a cada tubo con muestra.
2. Se mezcló el tubo suavemente para que la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico pudiera interactuar de forma adecuada con todos los demás componentes.
3. Se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Se recuperó la fase acuosa superior que contiene el ADN evitando recuperar cualquier otra de las fases.
5. Se trasladó la fase recuperada a dos tubos eppendorff esterilizados.

Precipitación de ADN

1. Se añadieron 1 500 μ L de etanol frío a cada tubo y se mezclaron suavemente.
2. Se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 minutos.

3. Se decantó el etanol y se dejó secar el ADN en la incubadora a 37 °C durante 30 minutos.
4. Se adicionó agua libre de nucleasas para re suspender el ADN agitando suavemente el tubo hasta que estaba completamente diluido.
5. Se cuantificó el ADN por medio de absorbancia.

4.4.5 Cuantificación de ADN (Absorbancia)

Este método es empleado para cuantificar ácidos nucleicos, ya que detecta cualquier compuesto que absorba la luz significativamente a 260 nm, tales como ADN, ARN, EDTA y fenol. La relación de absorbancia 260 nm se utiliza como prueba de contaminación de una preparación de ADN y ARN con proteína, puesto que los aminoácidos aromáticos absorben la luz a 280 nm. En este caso, sólo un nivel significativo de proteína en la preparación puede causar un cambio significativo en la relación de absorbancia de ambas longitudes de onda.

Para cuantificar la cantidad de ADN, las lecturas se toman a 260 y 280 nm. Una unidad de densidad óptica corresponde a aproximadamente 60 ng/ μ L de ADN. La relación entre las lecturas a 260 y 280 nm proporciona un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. Las preparaciones puras de ADN generalmente tienen valores de 1.8, mientras que valores de 2, muestran presencia de ARN. Si existe contaminación significativa con fenol o proteínas, la relación 260/280 será menor de 1.8 (Sambrook y Russell, 2001, p. 2391).

MATERIAL DE LABORATORIO

- Micropipetas
- Puntas para micropipeta

REACTIVOS

- Soluciones de ADN
- Agua libre de nucleasas

EQUIPO

- Nanoespectrofotómetro, Accesolab Nano Drop ND-100

METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ADN POR MEDIO DE ABSORBANCIA

1. Se encendió el nanoespectrofotómetro (Nanodrop).
2. Se utilizó el software “Nanodrop” desde la computadora.
3. Se seleccionó la opción “Ácidos nucleicos” desde el software.
4. Se colocaron 2 μL de agua libre de nucleasas para iniciar y limpiar el equipo seleccionando “Ok”.
5. Se limpió el sensor con un pañuelo y se pusieron 2 μL de agua libre de nucleasas en el sensor.
6. Se seleccionó la opción “Blanco” desde el software para realizar la lectura de datos, los cuales en este caso debían ser igual a cero.
7. Se colocaron 2 μL de la muestra que se deseaba cuantificar y permitir la lectura de datos.
8. Los valores que se registraron fueron la relación 260/280 que idealmente debe ser 1.8 y la concentración expresada en $\text{ng}/\mu\text{L}$ que debe ser de 60 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

4.4.6 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Los primers utilizados para la PCR se hidrataron previamente con agua libre de nucleasas a 38 °C en el Termoblock Termomixer compact durante 4 horas, los cálculos para su hidratación se muestran en el Anexo 3.

PCR CON MASTER MIX ®

MATERIAL BIOLÓGICO

- Muestras de distintas variedades de manzana
- Muestras de ADN de jugo, refresco, vinagre, té, puré, mermelada, yogurt, sidra y manzana seca
- Primer frontal y reverso

MATERIAL DE LABORATORIO

- Tubos eppendorff esterilizados
- Kit de micropipetas de 0.2 µL-1 000 µL
- Puntas para micropipetas esterilizadas

EQUIPO

- Microcentrífuga Minispin plus eppendorff 14 000 RPM
- Termociclador ATC 4011 Apollo Instrumentation
- Termoblok Termomixer compact

REACTIVOS

- Agua libre de nucleasas
- Kit de PCR Master Mix[®]

METODOLOGÍA

La reacción para PCR punto final se realizó de acuerdo con el protocolo de Promega[®] para el Kit de Máster Mix[®]. Para preparar la reacción se siguieron las recomendaciones propuestas por el Kit, empleando las cantidades que se muestran en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Componentes de la PCR punto final

Componente	Proporción por muestra (µL)
Kit Máster Mix [®]	12.5
Primer F	0.5
Primer R	0.5
ADN	1
Agua libre de nucleasas	10.5
Volumen total	25.0

Fuente: Creación propia

1. Se colocó en tubos eppendorf 1 μL de ADN de cada una de las muestras y se etiquetaron.
2. Se agregaron los demás componentes de la reacción de PCR en cada tubo eppendorf, según el Cuadro 12, obteniendo un volumen final de 25 μL en cada uno.
3. Para cada reacción de PCR se incluyó una muestra blanco (la cual contiene agua libre de nucleasas en lugar de ADN) y un control positivo.
4. Posteriormente los tubos se introdujeron en el termociclador y se programó a las diferentes condiciones del programa de PCR.

PCR DIRECTA

MATERIAL BIOLÓGICO

- Muestras de distintas variedades de manzana
- Muestras de jugo, refresco, vinagre, té, puré, mermelada, yogurt, sidra y manzana seca
- Primer frontal y reverso

MATERIAL DE LABORATORIO

- Tubos eppendorff esterilizados
- Kit de micropipetas de 0.2 μL -1 000 μL

EQUIPO

- Microcentrífuga Minispin plus eppendorff 14 000 RPM
- Termociclador Thermo Scientific ABKTIK

REACTIVOS

- Agua libre de nucleasas
- Nitrógeno líquido
- Kit de PCR Thermo Scientific Phire Plant Direct[®]

METODOLOGÍA

Las muestras de las distintas variedades de manzana (1.25 g de cada una) empleadas para la PCR directa se sumergieron en un baño de 5 mL de nitrógeno líquido antes de ser trituradas en un mortero. Las muestras de los productos industriales jugo, refresco, té, sidra, vinagre y puré se desgasi-
ficaron y se centrifugaron en tubos eppendorf durante 4 ciclos de 5 minutos a 13 000 RPM. Al término de cada ciclo de centrifugación, se retiró la fase líquida superior de cada tubo y se llenó nuevamente con producto sin centrifugar.

El tejido tratado bajo las condiciones descritas previamente se empleó para preparar la reacción de PCR directa, de acuerdo con el protocolo propuesto en el Kit para PCR directa Phire Plant Direct[®].

Los componentes empleados para la reacción de PCR directa se muestran en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Componentes de la PCR directa

Componente	Proporción por muestra (µL)
Phire Hot Start II DNA Polymerase	0.4
Primer F	0.5
Primer R	0.5
ADN	0.5
Agua libre de nucleasas	8.1
2X Phire Plant PCR Buffer	10.0
Control Primer Mix	10.0

Fuente: Creación propia

1. Se colocaron dentro de tubos eppendorf 0.5 µL de tejido de cada una de las muestras y 40 µL de Control Primer Mix, se etiquetaron y se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Se colocaron los demás componentes de la reacción de PCR en cada tubo eppendorf, según el Cuadro 13, tomando 0.5 µL de ADN de la reacción en reposo y obteniendo un volumen final de 20 µL en cada uno.
3. Para cada reacción de PCR se incluyó una muestra en blanco como control negativo (la cual contiene agua libre de nucleasas en lugar de ADN) y un control positivo.

4. Los tubos se colocaron en la microcentrífuga durante 5 segundos, aproximadamente.
5. Se colocaron los tubos dentro del termociclador y se programó a las diferentes condiciones del programa de PCR directa.

Después de preparar los componentes de la reacción y de establecer las condiciones de operación, se programó el termociclador Apollo ATC 401 CLP para los primers correspondientes y se realizó la electroforesis para observar los productos amplificados.

4.4.7 Electroforesis en gel

La evaluación de los amplificados de la reacción de PCR se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%.

MATERIAL BIOLÓGICO

- Muestras amplificadas en PCR

MATERIAL DE LABORATORIO

- Puntas estériles para micropipetas
- Gradilla
- Probeta graduada de 100 mL
- Kit de micropipetas de 0.2 μ L-10 μ L
- Parafilm
- Espátula
- Matraz Erlenmeyer de 200 mL

REACTIVOS

- Agua libre de nucleasas
- Agarosa Gibco ERL
- Bromuro de etidio en concentración de 10 mg/mL
- Tinte cargador Blue/Orange 6X Promega

- Marcador de peso molecular Invitrogen 100 pb ADN Ladder
- TAE 1X

EQUIPO

- Balanza analítica electrónica, VELAR VE-300
- Fuente de poder Bio-Rad-Powerpac 200
- Cámara de electroforesis Apollo 75.10
- Fotodocumentador

METODOLOGÍA

Preparación del gel de agarosa al 3%

1. Se pesaron 1.5 g de agarosa en la balanza electrónica.
2. Se disolvieron en 50 mL de solución TAE 1X como solución búfer.
3. Se calentó la solución en el horno de microondas durante 1 minuto en periodos de 10 segundos y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
4. Se añadió 1 gota de Bromuro de etidio (BrEt) y se homogeneizó.
5. La mezcla se vertió en el soporte cuidando que no se formaran burbujas, se colocaron los peines y se esperó a que la solución gelificara.
6. Se retiraron los peines y se colocó el soporte con gel en la cámara de electroforesis.
7. Se agregó TAE 1X a la cámara.

Carga y corrida del gel

1. Sobre un trozo de parafilm se colocaron 3 μ L de BrEt, 3 μ L de colorante blue/orange y 5 μ L de la muestra resultante de la PCR, se homogeneizaron y se colocó cada muestra en el gel dentro de cada pocillo.

2. Se colocaron también 3 μL de BrEt, 3 μL de colorante blue/orange y 2.5 μL de marcador de peso molecular de 100 kilbases y se homogeneizaron.
3. Se activó el campo eléctrico a 60 V. El cátodo se conectó en el extremo cercano a los pocillos de modo que la molécula migrara hacia el ánodo.
4. Se esperó a que el colorante se visualizara en el extremo opuesto de donde se colocó.

Visualización de fragmentos

1. El gel se colocó dentro del fotodocumentador.
2. Se centró el gel y se encendió el equipo y la cámara fotográfica.
3. Se fotografió el gel y se envió la imagen a una computadora.

Resultados y discusión

Primers para la detección de manzana en productos industrializados

El diseño de los primers que amplificaron para reconocer al gen MaltDom del cromosoma 2 de la manzana (*Malus x domestica*) de la especie Golden Delicious, se realizó según los pasos indicados en el Anexo 1. Se analizó la secuencia para la cual amplifican y se determinó que al llevar a cabo la PCR con las muestras de las distintas variedades de manzana y con los productos industrializados derivados de ella, el tamaño esperado del amplificado sería de 287 pb en caso de que se identificara el fragmento de ADN delimitado por los primers.

Primers para la identificación de manzana transgénica en productos industrializados

Los primers que se utilizaron en este proyecto se diseñaron y probaron experimentalmente con los programas bioinformáticos para verificar que podían ser empleados para la detección de manzana, en el Anexo 1 se presenta la metodología a seguir para el diseño de primers.

La selección de primers que amplifican la zona de CaMV 35S y T-NOS se basa en el artículo de Holden *et al.*, 2010: “The use of 35S and Tnos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials”.

Extracción y cuantificación de ADN de las muestras

Una vez que se seleccionaron los primers para la detección de manzana tradicional y manzana transgénica, se realizó la extracción y cuantificación del ADN de las muestras de manzana y de los productos industrializados elaborados con manzana, empleando el protocolo de Sambrook y el equipo Nanodrop, respectivamente.

Debido a que la concentración del ADN es un parámetro que controlar para que se realice de manera correcta la PCR, se requirió que las muestras tuvieran una concentración de entre 40-80 ng/μL. Sin embargo, algunas presentaron concentraciones muy altas así que se diluyeron con agua libre de nucleasas hasta alcanzar una concentración óptima para la correcta replicación del ADN, permitiendo la hibridación adecuada de los primers.

Las concentraciones obtenidas del ADN de manzana y de los productos industrializados se presentan en el Cuadro 14 y Cuadro 15, respectivamente. Cabe mencionar que las muestras fueron identificadas por el código que se muestra a continuación.

Cuadro 14. Concentración de ADN de muestras de manzana

Muestra	Código	Concentración inicial		Concentración posterior a dilución	
		260/280	ng/uL	260/280	Ng/uL
Granny Smith	M1	1.64	100.8	1.50	77.30
Golden Delicious	M2	1.74	157.0	1.67	81.70
Royal Gala Chile	M3C	1.65	71.30	*	*
Royal Gala USA	M3U	1.65	59.60	*	*
Red Delicious Washington	M4W	1.65	50.20	*	*
Red Delicious USA	M4U	1.68	78.1	*	*

Fuente: Creación propia

*Las muestras de estas variedades no requirieron diluirse debido a que los valores obtenidos de la concentración y pureza estaban dentro del rango óptimo.

Cuadro 15. Concentración de ADN de muestras de productos industrializados

Muestra	Código	Concentración inicial		Concentración posterior a dilución	
		260/280	ng/uL	260/280	Ng/uL
Jugo de manzana	JM	1.65	88.0	1.53	67.9
Refresco	RM	1.74	109.6	1.67	77.7
Té	TM	1.40	200.0	1.43	62.9
Vinagre	VM	1.58	114.3	1.66	60.2
Sidra	SD	2.02	423.7	1.67	69.0
Puré de manzana	PM	1.59	154.6	1.55	59.6
Mermelada de manzana con canela	MM	1.70	1228.0	1.62	68.3
Yogurt bebible de manzana	YM	1.67	250.0	1.58	64.9
Manzana seca	MS	1.86	2723.2	1.53	74.5

Fuente: Creación propia

Además, se determinó la pureza del ADN mediante la relación 260/280, el cual es un valor importante ya que, si éste no es lo suficientemente puro, la Taq polimerasa no funciona correctamente. Valores cercanos a 1.8 indican que el ADN extraído tiene la pureza óptima para la PCR, lo cual no se cumplió para la mayoría de las muestras en estudio. Los valores por debajo de 1.8 no se eliminaron por completo durante la extracción. Sin embargo, se realizó una prueba de integridad del ADN que se analizó y caracterizó, mediante electroforesis en gel de agarosa.

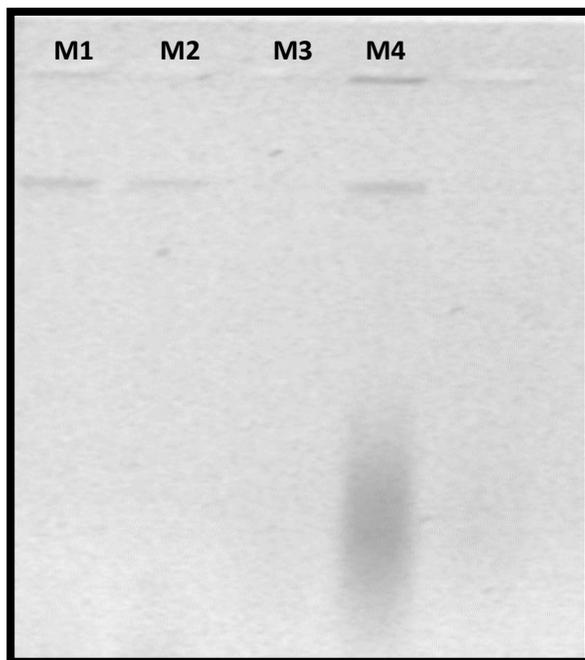
Integridad del ADN de manzana

Se corrieron muestras de ADN concentrado de las 4 distintas variedades de manzana en un gel de agarosa al 1% a 90 V para determinar la presencia del ADN extraído.

El resultado de la evaluación de la integridad del ADN en electroforesis únicamente mostró una banda de alto peso molecular para la variedad Red Delicious, como se muestra en la Figura 24.

Sin embargo, para las variedades Granny Smith y Golden Delicious, solo se observó una banda en la parte superior del gel debido a que el ADN estaba fragmentado o a que los valores obtenidos de

pureza y concentración en la absorbancia reportaban ADN impuro posiblemente con grandes cantidades de pigmentos, proteínas o polisacáridos y no de ADN. Mientras que para la manzana Royal Gala no se observó nada en el gel.



Fuente: Creación propia

Figura 24. Gel de agarosa al 3% a 90 V extraído mediante el protocolo de Sambrook para evaluar la integridad del ADN de manzana en electroforesis; (M1) manzana Granny Smith, (M2) manzana Golden Delicious, (M3) manzana Royal Gala, (M4) manzana Red Delicious.

Los productos industrializados elaborados a partir de manzana, en ocasiones durante su procesamiento requieren ser sometidos a tratamientos bajo condiciones extremas de temperatura, presión, pH, entre otras; lo cual dificulta las técnicas de extracción de ADN porque es difícil que conserve su integridad. Así mismo, la degradación del ADN puede ser ocasionada por la presencia de altas concentraciones de compuestos orgánicos presentes en vegetales; en la manzana, tal es el caso de las enzimas polifenoloxidasas.

Por tal motivo, en la prueba de integridad del ADN extraído de los productos industrializados mediante el protocolo de Sambrook, no se obtuvo ninguna banda de alto o bajo peso molecular que permitiera determinar su uso para realizar pruebas de PCR; los valores de concentración y pureza reportados en el Cuadro 15 no son representativos para estas muestras ya que no se asegura la presencia de ADN o que el ADN extraído cumpla con las condiciones óptimas.

Fue necesario emplear un método de análisis adecuado para la detección del ADN de manzana en las muestras que permitiera eliminar las sustancias inhibidoras durante la reacción de PCR y conservar la integridad del ADN. Por tal motivo, se empleó la PCR directa que, mediante el uso de una enzima más eficiente, permitió la detección de ADN de manzana en distintas variedades del fruto y en los productos industrializados.

Prueba de especificidad de primers para la detección de manzana

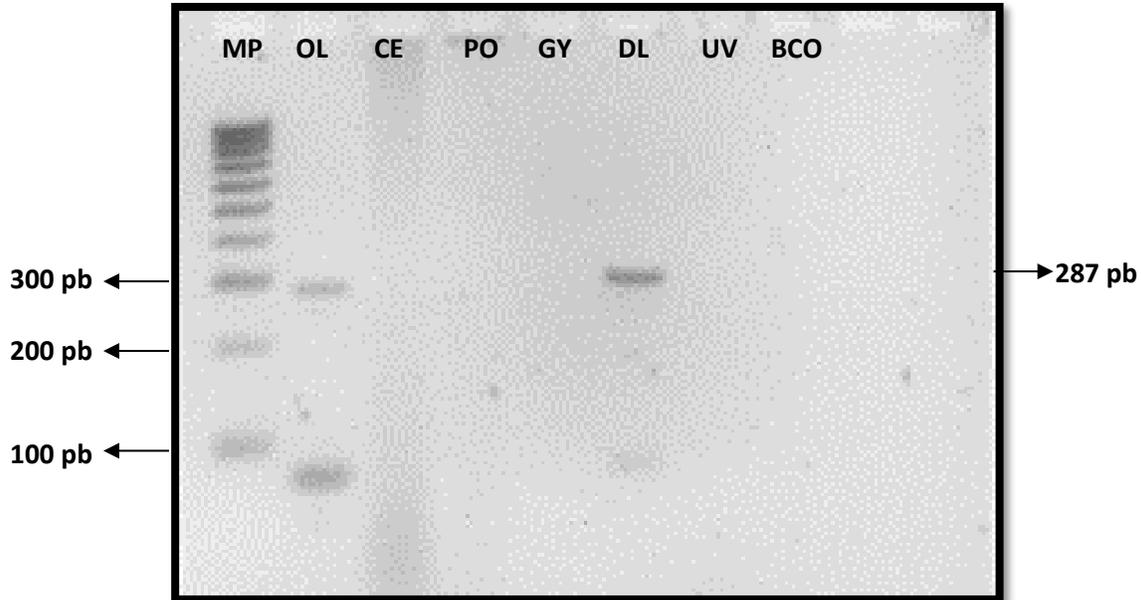
Para detectar la presencia de manzana en los productos industrializados, fue necesario evaluar la especificidad de los primers diseñados con muestras de especies filogenéticamente cercanas y lejanas a la manzana mediante PCR directa, que aseguraron que los primers amplificaran únicamente para la manzana.

Para realizar la prueba se emplearon las 6 muestras de ADN (Cuadro 16) y un control negativo; se realizó la PCR directa empleando los primers diseñados a partir del cromosoma 2 de la especie *Malus x domestica* (manzana). Los resultados se muestran en la Figura 25.

Cuadro 16. Muestras empleadas para la evaluación de la especificidad de primers de identificación de manzana.

Muestras de ADN	Código
Cerdo	CE
Pollo	PO
Guayaba	GY
Uva	UV
Manzana Golden Delicious	OL
Manzana Red Delicious	DL

Fuente: Creación propia



Fuente: Creación propia

Figura 25. Gel de agarosa al 3% a 90 V, para evaluar mediante electroforesis la especificidad de primers diseñados para la identificación de manzana; (MP) marcador molecular de 100 pb, (BCO) blanco, (OL) manzana Golden Delicious, (CE) cerdo, (PO) pollo, (GY) guayaba, (DL) manzana Red Delicious y (UV) uva.

Los amplificadores observados en la Figura 25, corresponden a las muestras de las dos variedades de manzana que se evaluaron (OL) y (DL) para la prueba de especificidad, las cuales pertenecían a las variedades Golden Delicious y Red Delicious, respectivamente, con un tamaño de acuerdo con el esperado de 287 pb.

Ya que en el carril donde se corrió el blanco no obtuvo ningún amplificado, se determina que no hubo indicios de contaminación con ADN de manzana en ninguno de los demás carriles y por lo tanto se aseguró la eficacia de la prueba.

En el carril de la muestra (CE) correspondiente a ADN de cerdo, se observa un tenue barrido debido a que el ADN se empleó en alta concentración, sin embargo, ni esta muestra ni el resto de las muestras evaluadas de especies filogenéticamente cercanas y lejanas a la manzana mostraron algún amplificado.

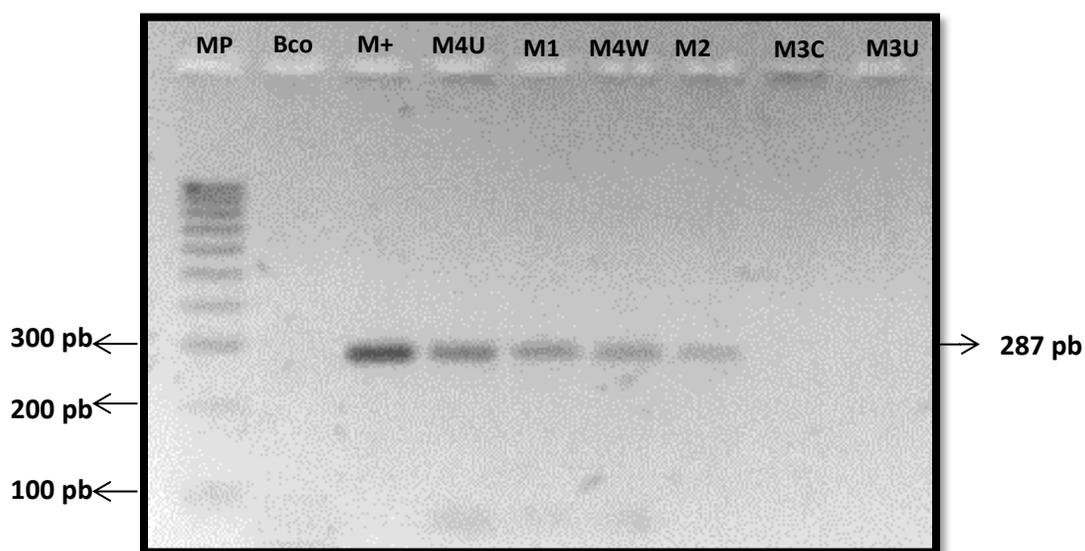
Por lo tanto, los primers diseñados mediante programas bioinformáticos a partir del cromosoma 2 de *Malus x doméstica*, si resultaron ser específicos para la identificación de manzana de distintas variedades.

Amplificación de distintas variedades de manzana

Después de realizar la prueba de especificidad de los primers para detección de manzana y una vez calculada su temperatura de hibridación (63.9 °C), se aplicó la técnica de PCR directa para detectar su amplificación en 4 variedades distintas de manzana (Granny Smith, Golden Delicious, Royal Gala proveniente de Chile, Royal Gala proveniente de Washington y Red Delicious de USA y Red Delicious de Washington).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 29. Las condiciones del programa de PCR empleado se describen en la Figura 23 y se utilizaron los primers diseñados en el Anexo 1 para la identificación de manzana; mientras que las condiciones para la electroforesis fueron con gel de agarosa al 3% y a 60 V.

Para la realización de esta prueba se empleó un control positivo correspondiente al ADN de manzana de la variedad Red Delicious que resultó ser la muestra de ADN más íntegra, de acuerdo con lo observado en la Figura 24. Además, se empleó un blanco, como control negativo, para verificar la pureza de la prueba.



Fuente: Creación propia

Figura 26. Gel de agarosa al 3% a 60 V para la detección de manzana mediante electroforesis; (MP) Marcador molecular de 100 pb, (Bco) Blanco, (M+) Control positivo, manzana Red Delicious, (M4U), manzana Red Delicious USA, (M1) manzana Granny Smith, (M4W) Manzana Red Delicious Washington, (M3C) manzana Royal Gala USA y (M3U) manzana Royal Gala USA.

En la Figura 26 se puede apreciar que amplificaron 3 de las 4 muestras de distintas variedades de manzana sometidas a PCR directa, pertenecientes a las variedades Granny Smith, Golden Delicious y Red Delicious; ésta última amplificó tanto para la variedad proveniente de Washington como para la que, según su etiquetado, provenía de USA. Las muestras obtuvieron un amplificado de 287 pb, el cuál era el amplificado esperado al diseñar los primers y al compararse con el amplificado del control positivo, se muestra que efectivamente el amplificado obtenido corresponde al gen del ADN en estudio. Además, los resultados evaluados mediante la electroforesis en gel de agarosa demuestran ser eficientes, ya que no presentaban contaminación debido a que en el carril donde se corrió el blanco no apareció ninguna banda.

La muestra de la variedad Royal Gala no amplificó a pesar de que se repitió varias veces la prueba con esta especie y en ninguna de ellas se obtuvo algún amplificado, lo cual puede deberse a que es una especie híbrida que se obtuvo de la cruce de la variedad Red Delicious con la Kidds Orange Red (Botanical online, 2017), por lo cual la secuencia para la que amplifica la pareja de primers de identificación de manzana (*Malus x domestica*) diseñados en este proyecto, puede no estar presente dentro del genoma de esta variedad.

Amplificación de manzana en productos industrializados

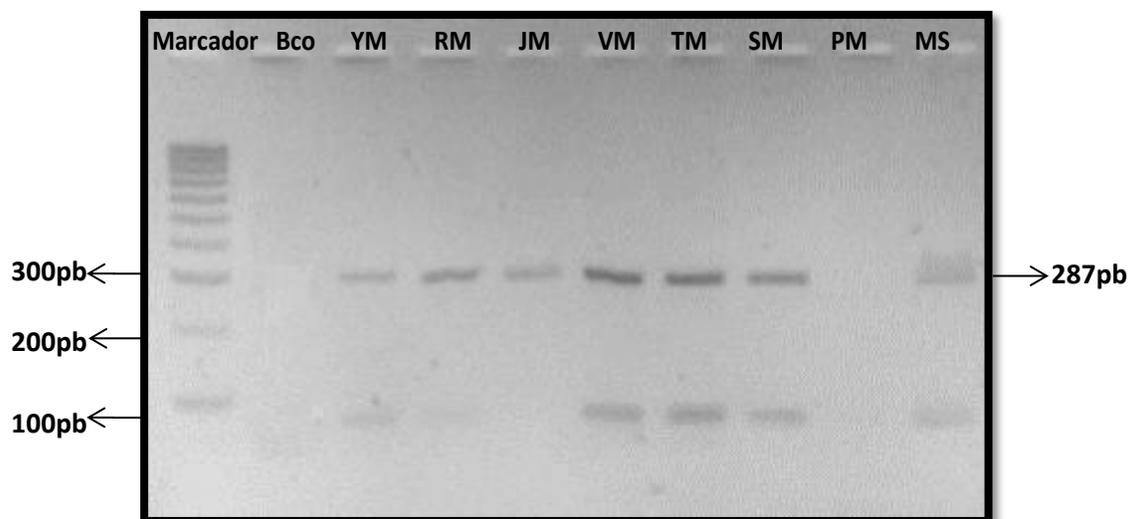
Se aplicó la técnica de PCR directa para las muestras de productos industrializados elaborados con manzana empleando los primers de detección de manzana (*Malus x domestica*) y el programa representado en la Figura 22, su amplificación se evaluó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3% y a 60 V; se esperaba que el amplificado para la identificación de manzana fuera de 287 pb. Los resultados obtenidos de la electroforesis se muestran en la Figura 27.

Se identificó la presencia de manzana en las muestras de yogurt, refresco, jugo, vinagre, té, sidra y manzana seca con un amplificado de 287 pb, correspondiente al esperado; al igual que el control positivo que amplificó para todas las experimentaciones posteriores mediante PCR directa, asegurando así la eficacia de las pruebas y además se confirmó que no se tenía contaminación ya que el blanco no presentó ninguna banda de amplificación.

La muestra de puré de manzana (Gerber[®]) no amplificó. El proceso de este puré emplea pulpa proveniente de Chile, donde la cosecha es supervisada por personal de Gerber[®]; Chile es el país con mayor volumen de exportación de manzana en el mundo, las Royal Gala son la variedad principal en este segmento, con 880 mil toneladas anuales (Kees, 2015). Debido a que los primers diseñados para la identificación de manzana en este proyecto no amplificaron para la variedad Royal Gala, se determinó que la muestra de puré de manzana no amplificó debido a que probablemente está elaborado con manzana de esta variedad.

Cabe mencionar que al evaluar mediante electroforesis la técnica de PCR descrita en la Figura 22 con el Kit Master Mix[®] y el ADN extraído mediante el protocolo de Sambrook, no se obtuvo ningún amplificado con los primers de identificación de manzana en las muestras de distintas variedades del fruto ni en los productos industrializados. Por tal motivo se empleó el Kit de PCR directa Phire Plant Direct[®] siguiendo las condiciones indicadas en la Figura 22 y sometiendo las muestras a un tratamiento previo a la reacción.

Al analizar los resultados obtenidos mediante PCR directa se determina que la enzima que emplea el Kit presenta muy alta sensibilidad, de tal manera que reconoce ADN fragmentado, es decir, que indica la presencia de secuencias más pequeñas a las esperadas y por esta razón en los geles se pueden apreciar otras bandas de menor o mayor peso molecular que el del amplificado esperado e incluso algunos barridos.



Fuente: Creación propia

Figura 27. Gel de agarosa al 3% y a 60 V para la detección de manzana en productos industrializados mediante electroforesis; (Marcador) marcador molecular de 100 pb, (Bco) Blanco, (YM) yogurt, (RM) refresco, (JM) jugo, (VM) vinagre, (TM) té, (SM) sidra, (PM) puré, (MS) manzana seca.

Prueba de especificidad de primers para la detección de manzana transgénica

Debido a que la extracción de ADN de manzana por medio del protocolo de Sambrook no fue eficiente para la amplificación con los primers de detección de manzana, el desarrollo del objetivo particular 4, se llevó a cabo realizando PCR directa para las pruebas de detección de manzana transgénica. Se realizó la PCR de un control positivo (maíz transgénico) y un control negativo (algodón tradicional), utilizados para asegurar que los primers CaMV 35S y Tnos amplificarían únicamente para las muestras de productos industrializados que resultaran ser transgénicos. Las condiciones de PCR empleadas se muestran en la Figura 23.

Los resultados de la prueba de especificidad se muestran en la Figura 28, donde se aprecia que tanto el gen del Virus del Mosaico de la Coliflor como el de Tnos se encuentran en la muestra de maíz reportado como transgénico, ya que presentan una banda que amplifica como se esperaba a 195 y 180 pb, respectivamente. Por otro lado, se colocó una muestra de algodón no transgénico para garantizar que los primers hibridaron específicamente para el gen CaMV 35S y Tnos por lo tanto, en ambas muestras no hubo amplificación.

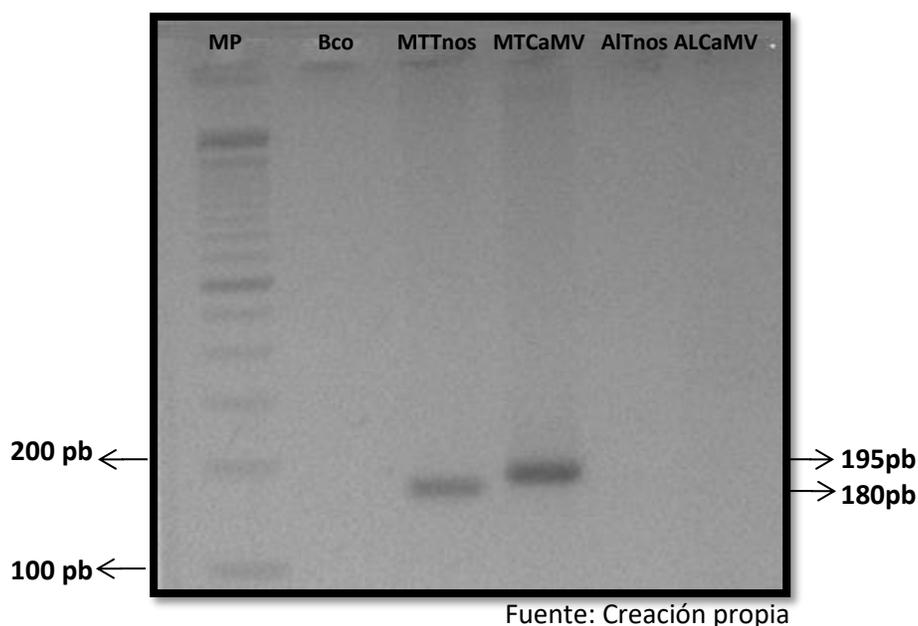


Figura 28. Gel de agarosa al 3% y 60 V para la prueba de especificidad mediante electroforesis del ADN de los controles positivo (maíz transgénico con promotor CaMV 35S, MTCaMv y con terminador Tnos, MTTnos) y negativo (algodón tradicional con promotor CaMV 35S, AICaMV y con terminador Tnos, AITnos).

Una vez que se comprobó que la muestra de maíz transgénico amplificó con los primers que hibridan en la secuencia del CaMV 35S y Tnos, fue utilizada como control positivo para asegurar que la PCR para identificación de transgénicos se llevara a cabo adecuadamente. También se aprecia que las muestras no están contaminadas y que la PCR se llevó a cabo de manera adecuada, ya que el blanco no presenta ninguna banda, por lo que la muestra de maíz transgénico se pudo utilizar para las pruebas posteriores.

La concentración obtenida de ADN de cada muestra permitió que los primers hibridaran correctamente durante la PCR, ya que es aceptable porque no se encuentra saturada. Así mismo, la cantidad de ADN es suficiente ya que únicamente se requiere de una pequeña cantidad para replicar millones de copias del fragmento deseado.

Amplificación de manzana transgénica

Para verificar si en México se comercializa manzana transgénica, se realizó la técnica de PCR directa de acuerdo a las condiciones que se muestran en la Figura 23, con las muestras de ADN de 4 distintas variedades de manzana.

En las Figuras 29 y 30, se observan los resultados obtenidos de la amplificación del promotor CaMV 35S y del terminador Tnos, respectivamente; evaluados en electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60 V. En ambas figuras se puede apreciar que las muestras no están contaminadas, pues el blanco no amplificó. Se observa también que el control positivo amplificó a 195 y 180 pb, para los genes CaMV 35S y Tnos, respectivamente, lo que sugiere que la PCR se llevó a cabo de manera correcta.

En la Figura 29 se observa la electroforesis de las muestras de 4 distintas variedades de manzana con el promotor CaMV 35S en estudio para este proyecto. Se eligió evaluar la muestra de la variedad Royal Gala a pesar de que ésta no amplificó con los primers de detección de manzana, pues aunque no contiene la secuencia de nucleótidos para la que codifican los primers diseñados, podría contener transgénicos. Sin embargo, los resultados muestran que únicamente se obtuvo un amplificado de 195 pb que indicó la presencia del promotor CaMV 35S en el carril correspondiente al control positivo (maíz transgénico). A pesar de que la prueba se repitió dos veces, en ambos casos se obtuvo el mismo resultado.

No podría decirse con seguridad que al no contener el gen de este promotor, las manzanas comercializadas en México no son transgénicas, ya que aunque el CaMV 35S es el indicador de material vegetal transgénico más comúnmente empleado, podrían haberse empleado otros o podrían contener únicamente al terminador Tnos. Por tal motivo, se evaluaron las mismas variedades de manzana mediante PCR directa bajo las condiciones de la Figura 23 mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60 V con los primers de amplificación de Tnos.

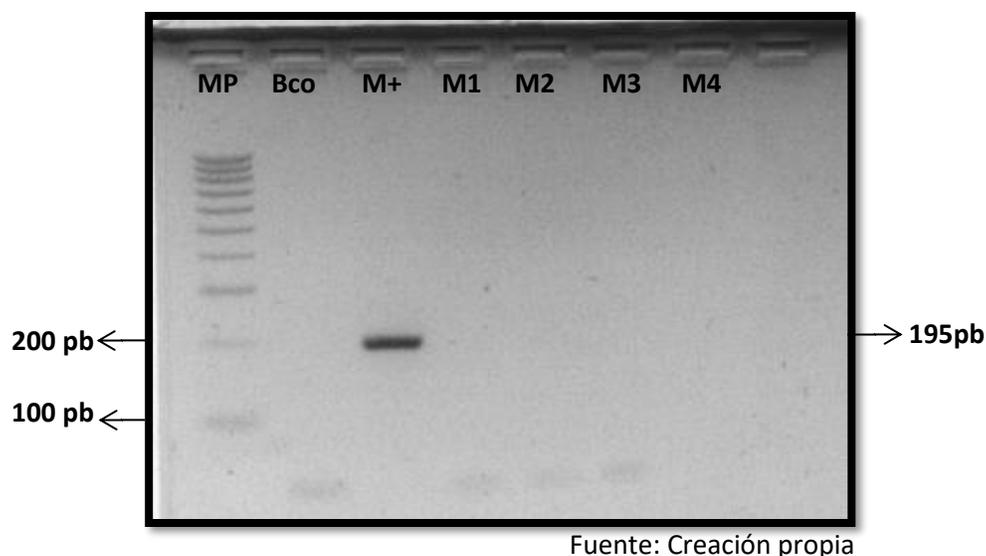
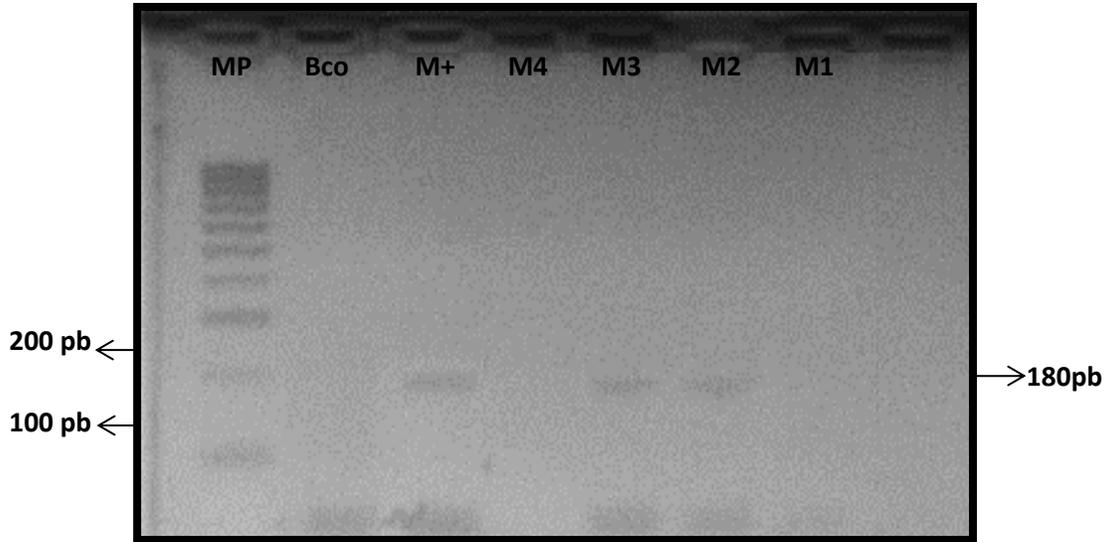


Figura 29. Gel de agarosa al 3% y a 60 V para la detección del promotor CaMV en las muestras de manzana mediante electroforesis; (MP) marcador de peso molecular, (Bco) blanco, (M+) Control positivo de maíz transgénico para CaMV, (M1) Granny Smith, (M2) Golden Delicious, (M3) Royal Gala y (M4) Red Delicious.

En la Figura 30 se aprecia la evaluación de las 4 muestras de manzana sometidas a PCR con el terminador Tnos, donde únicamente las muestras (M3) Royal Gala y (M2) Golden Delicious mostraron un amplificado de 180 pb, reflejando la presencia del terminador Tnos en el fruto.

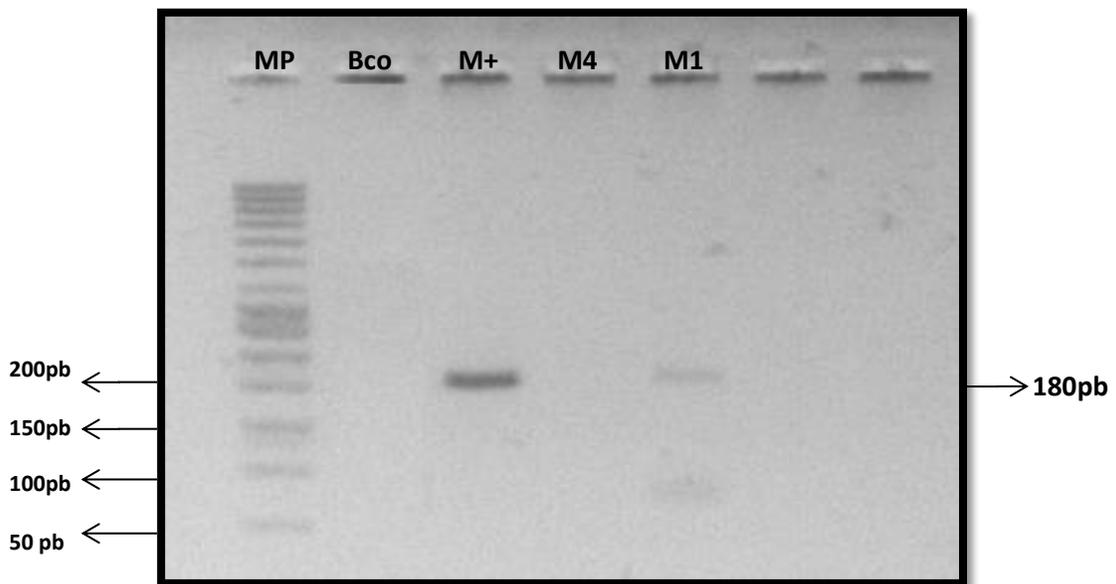
Sin embargo, se repitió el análisis de electroforesis con las muestras que no amplificaron la primera vez y los resultados se muestran en la Figura 31, donde se observa que se obtuvo un tenue amplificado para la muestra (M1) Granny Smith, mientras que la muestra de manzana perteneciente a la variedad Red Delicious no amplificó en ninguna de las dos repeticiones.

Al evaluar los amplificados obtenidos del terminador Tnos en las muestras de manzana, se observa que incluso el control positivo amplificó de manera más tenue en comparación con los amplificados mostrados al evaluar al promotor CaMV 35S; ya que el blanco no amplificó se aseguró que no había contaminación.



Fuente: Creación propia

Figura 30. Gel de agarosa al 3% y 60 V para la detección del terminador Tnos mediante electroforesis en las muestras de manzana; (MP) marcador de peso molecular de 100 pb, (Bco) blanco, (M+) control positivo de maíz transgénico para Tnos, (M1) Granny Smith, (M2) Golden Delicious, (M3) Royal Gala y (M4) Red Delicious.



Fuente: Creación propia

Figura 31. Gel de agarosa al 3% y a 60 V para la detección del terminador Tnos en las muestras de manzana mediante electroforesis; (MP) marcador de peso molecular de 50 pb, (Bco) blanco, (M+) control positivo de maíz transgénico para Tnos, (M1) Granny Smith y (M4) Red Delicious.

Las manzanas de las siguientes variedades mostraron indicios de contener al gen Tnos insertado en su secuencia: Granny Smith, Golden Delicious y Royal Gala, lo que demuestra que su genoma ha sido modificado genéticamente mediante genes que les confieren propiedades que les aportan algún valor agregado en comparación con sus características originales.

Aunque la manzana Red Delicious no presentó amplificadores que evidenciaran la presencia de los genes CaMV 35S y Tnos, no podría asegurarse que no es un fruto transgénico debido a que podía contener genes modificados de otro tipo, los cuales no fueron estudiados en este proyecto.

En México, la manzana para la industria ocupa alrededor del 90% de su producción en la fabricación de jugos y sidra, alimentos que requieren de manera indispensable la oxidación de la manzana para su elaboración con el fin de cumplir con las propiedades organolépticas requeridas por el consumidor, tal como lo es el color marrón de ambos productos. Siendo el retraso de la oxidación una de las principales razones por las cuales se ha empleado la ingeniería genética en la transformación del genoma de la manzana, cabe la posibilidad de que esta sea la razón por la cual esta variedad de manzana no haya sido genéticamente modificada, o al menos que la manzana Red Delicious comercializada e importada en el país, no lo sea.

Amplificación de manzana transgénica en productos industrializados

Finalmente se evaluaron las muestras de los productos industrializados que amplificaron en el Objetivo 3, para asegurar que se someterían a PCR únicamente aquellas muestras que aseguraban contener ADN de manzana. La técnica de PCR directa se empleó una vez más para identificar la presencia de los genes CaMV 35S y Tnos, que son la pareja genética más comúnmente insertada en vegetales transgénicos y en caso de contenerlos se espera un amplificador de 195 y 180 pb, respectivamente. Las condiciones de PCR se describen en la Figura 23 y la electroforesis para su evaluación se llevó a cabo con gel de agarosa al 3% y a 60 V.

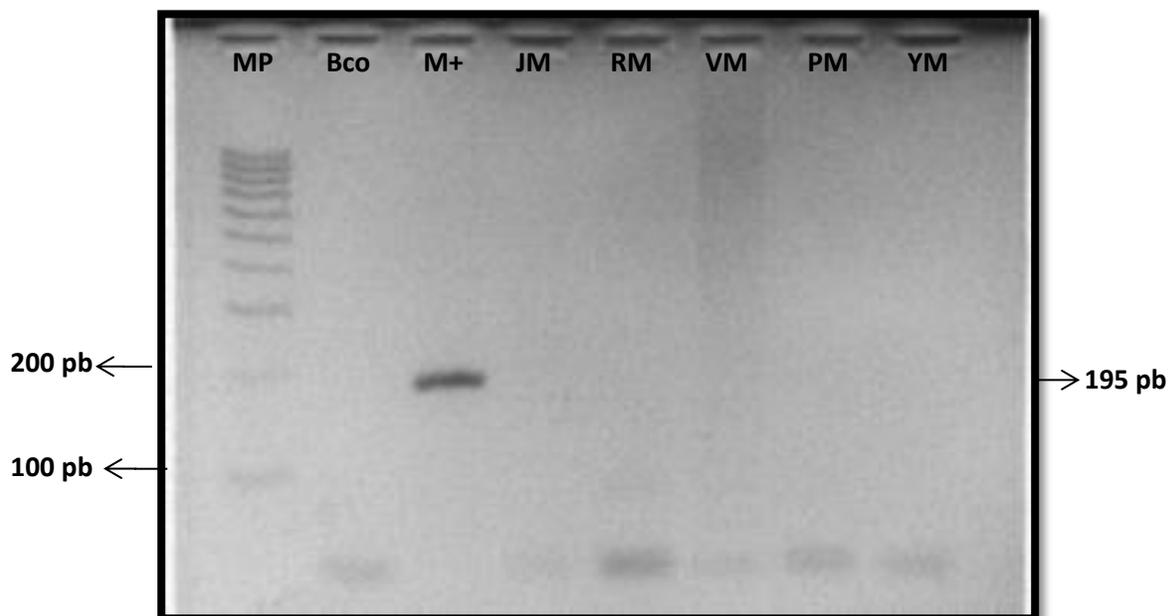
Debido al tamaño de los amplificadores esperados para la detección tanto de manzana como de manzana transgénica, se empleó la concentración de agarosa al 3%, ya que el peso del ADN molecular es pequeño y por lo tanto se requirió una mayor concentración que permitiera una migración correcta de las moléculas durante la electroforesis.

Amplificación del gen CaMV 35S

A continuación, se muestran los resultados obtenidos al evaluar la amplificación del promotor CaMV 35S en las muestras de los distintos productos industrializados elaborados con manzana. En la electroforesis se empleó maíz transgénico como control positivo, que debería amplificar a 195 pb en caso de contener al Virus del mosaico de la coliflor.

Con el fin de obtener una mejor visualización en el gel de electroforesis, las muestras evaluadas se repartieron en dos gels. Cabe mencionar que debido a que no se encontró en el mercado una muestra de mermelada de manzana de la marca Agave Sweet, no se pudo realizar la PCR de esta muestra y por lo tanto solo se realizó la evaluación de 8 de los 9 productos propuestos inicialmente para esta investigación.

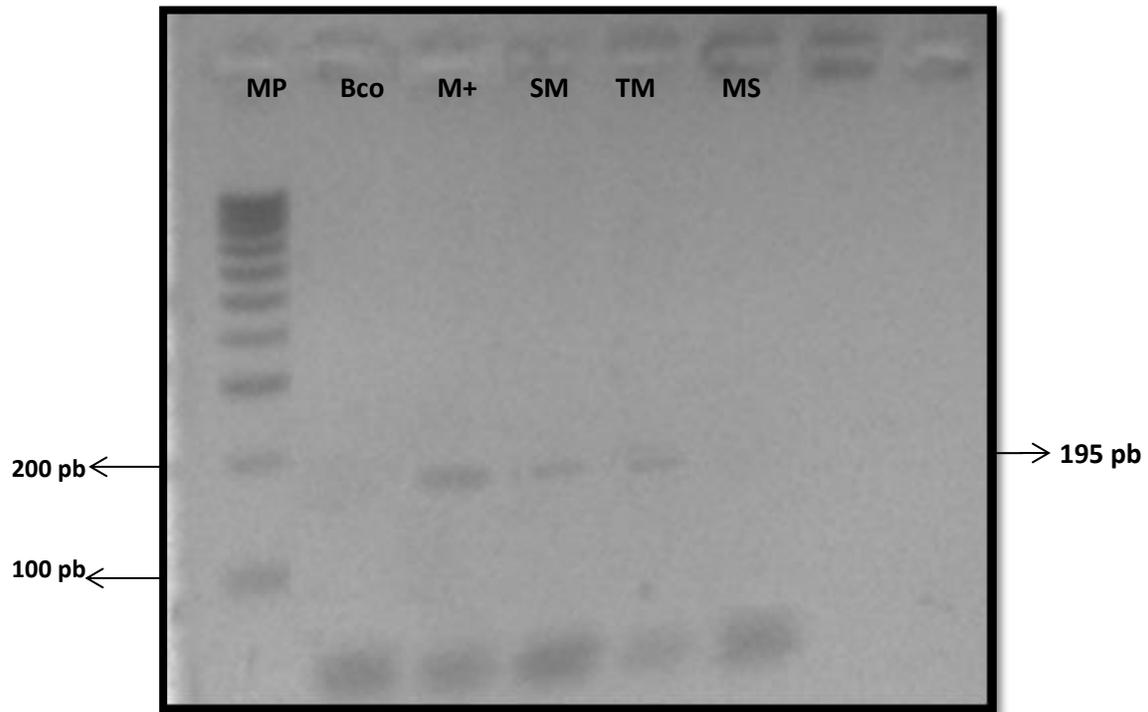
En la Figura 32 se muestra el resultado de la electroforesis de 5 de las 8 muestras evaluadas y se observó que ninguno de los productos mostró alguna banda de amplificado para el gen promotor CaMV 35S, únicamente amplificó el control positivo de maíz transgénico con un tamaño de 195 pb y debido a que el blanco no amplificó, se demuestra que la PCR se realizó eficientemente.



Fuente: Creación propia

Figura 32. Gel de agarosa al 3% a 60V para la detección del promotor CaMV en productos industrializados de manzana mediante electroforesis; (MP) marcador de peso molecular, (Bco) blanco, (M+) Control positivo de maíz transgénico para CaMV, (JM) jugo de manzana, (RM) refresco de manzana, (VM) vinagre de manzana, (PM) puré de manzana y (YM) yogurt de manzana.

En la Figura 33 se muestra el resultado de la electroforesis de 3 de las 8 muestras evaluadas y se observa que no hubo presencia del gen CaMV 35S en la manzana seca, mientras que para dos de las muestras (sidra y té) se evidenció la presencia del promotor CaMV 35S al mostrar un amplificado de 195 pb, al igual que el control positivo de maíz transgénico.



Fuente: Creación propia

Figura 33. Gel de agarosa al 3% y a 60 V para la detección del promotor CaMV en productos industrializados de manzana mediante electroforesis; (MP) marcador de peso molecular, (Bco) blanco, (M+) Control positivo de maíz transgénico para CaMV, (SM) sidra de manzana, (TM) té de manzana y (MS) manzana seca.

Los productos industrializados: sidra de manzana y té de manzana, son productos de alto consumo en México que no declaran en su etiquetado el contenido transgénico. A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la evaluación que se llevó a cabo para conocer si las dos muestras que contienen al promotor CaMV 35S, también contienen al terminador Tnos.

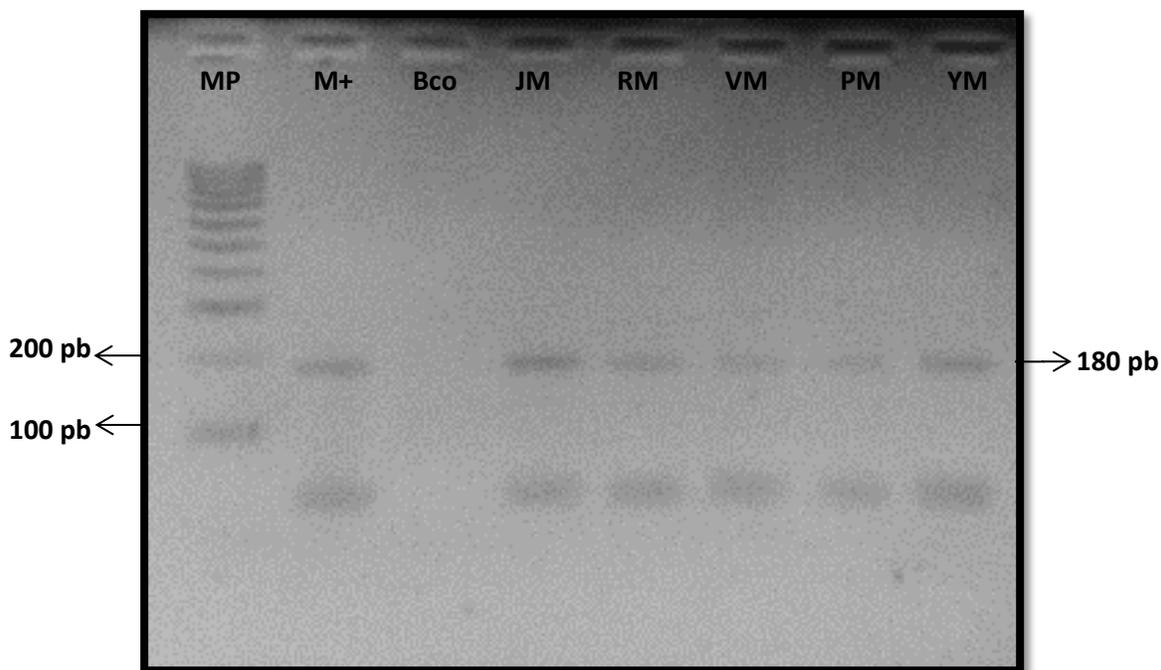
Por otra parte, no se puede decir aún si el resto de las muestras en las que no se detectó el promotor CaMV 35S son transgénicas o no, pues, aunque no contienen a este gen podrían incluir en su genoma la secuencia del terminador Tnos u otro.

Amplificación del gen Tnos

Luego de evaluar las muestras de productos industrializados con el gen CaMV 35S, se realizó el mismo análisis para determinar la presencia del terminador Tnos, esperando un amplificado de 180 pb en caso de confirmar su presencia. Para verificar la eficacia de la prueba, se empleó el maíz transgénico como control positivo y un blanco como control negativo para descartar posible contaminación.

Para tener una mejor visualización de la electroforesis, se realizaron dos gels para evaluar el amplificado de las 8 muestras de productos industrializados elaborados con manzana.

En la Figura 34 se observa que 5 de las 8 muestras en estudio, correspondientes a los productos: jugo de manzana Del Valle, refresco de manzana Peñafiel, vinagre de manzana Clemente Jacques, puré de manzana Gerber y yogurt bebible de manzana Lala, mostraron contener al terminador de la nopalina sintetasa Tnos en su ADN, evidenciando así que son productos elaborados con transgénicos y que no lo declaran en su etiquetado.



Fuente: Creación propia

Figura 34. Gel de agarosa al 3% y a 60 V para la detección del terminador Tnos en productos industrializados de manzana mediante electroforesis; (MP) marcador de peso molecular, (Bco) blanco, (M+) Control positivo de maíz transgénico para Tnos, (JM) jugo de manzana, (RM) refresco de manzana y (VM) vinagre de manzana, (PM) puré de manzana y (YM) yogurt de manzana.

En la Figura 35 se muestra el amplificado de las muestras de los productos: sidra de manzana, té de manzana y manzana seca, evaluados para detectar la presencia del gen Tnos que amplificó a 180 pb para el caso del control positivo de maíz transgénico, mientras que el blanco no amplificó, por lo que no se muestra evidencia de contaminación.

Las muestras de los productos que demostraron contener al gen Tnos fueron té de manzana y manzana seca, con un amplificado de 180 pb, sin embargo, ninguno de estos productos declara en su etiquetado que contengan transgénicos.

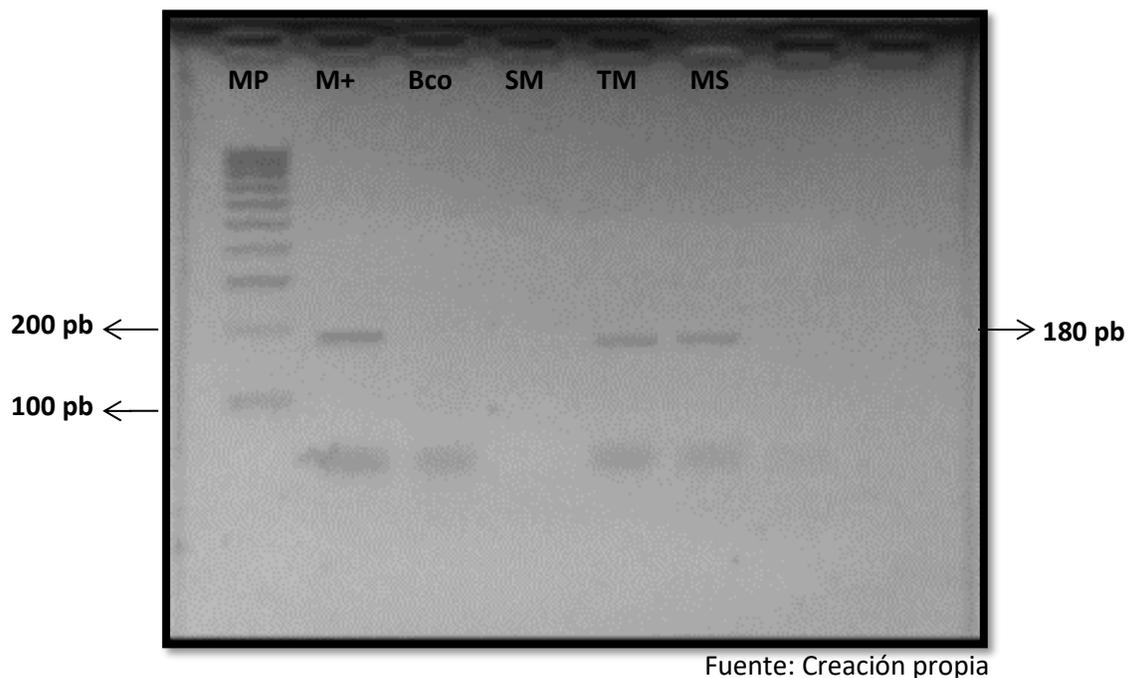


Figura 35. Gel de agarosa al 3% y a 60V para la detección del terminador Tnos en productos industrializados de manzana mediante electroforesis; (MP) marcador de peso molecular, (Bco) blanco, (M+) Control positivo de maíz transgénico para Tnos, (SM) sidra de manzana, (TM) té de manzana y (MS) manzana seca.

El té de manzana fue la única muestra que contiene tanto al promotor CaMV 35S como al terminador Tnos. La sidra de manzana únicamente contiene al gen CaMV 35S mientras que el resto de las muestras únicamente contiene al terminador Tnos, debido a que no siempre se usan los mismos promotores y terminadores.

Los 8 productos evaluados en este proyecto mostraron que fueron elaborados con manzana transgénica, al contener a los genes CAMV 35S y Tnos, juntos o de manera independiente, lo que sugiere que se emplean otro tipo de promotores y terminadores para la modificación genética de vegetales.

En los cuadros 17 y 18, se muestran los resultados obtenidos mediante PCR para la detección de la presencia (+) o ausencia (-) de ADN transgénico mediante la amplificación del promotor CaMV 35S y del terminador Tnos en las muestras evaluadas de distintas variedades de manzana y de productos industrializados elaborados a partir de este fruto, respectivamente.

Cuadro 17. Resultados de la detección de OGM en manzana de distintas variedades.

Muestra	Código	Promotor CaMV 35S	Terminador Tnos
Manzana Granny Smith	M1	-	+
Manzana Golden Delicious	M2	-	+
Manzana Royal Gala	M3	-	+
Manzana Red Delicious	M4	-	-

Fuente: Creación propia

Cuadro 18. Resultados de la detección de OGM en productos industrializados elaborados con manzana.

Muestra	Código	Promotor CaMV 35S	Terminador Tnos
Jugo de manzana	JV	-	+
Refresco de manzana	PM	-	+
Sidra de manzana	SD	+	-
Té de manzana	TM	+	+
Vinagre de manzana	VM	-	+
Puré de manzana	PM	-	+
Yogurt de manzana	YM	-	+
Manzana seca	MS	-	+

Fuente: Creación propia

Conclusiones

Los primers empleados para la identificación de manzana diseñados a partir del cromosoma 2 de *Malus x domestica* mediante software bioinformático, fueron específicos únicamente en muestras de ADN de manzana y no específicos en ADN de otras especies filogenéticamente cercanas y lejanas a ella.

Al analizar al promotor CaMV 35S y al terminador Tnos, se determinó que son específicos para la detección de OGM al amplificar con muestras de maíz declarado como transgénico.

Mediante PCR directa en manzana de distintas variedades se detectó que los primers diseñados no amplifican para la manzana Royal Gala.

Se detectó la presencia de manzana en las muestras de productos industrializados, obteniendo un amplificado de 287 pb de la secuencia del gen MalDomGD1.0 de manzana en todas ellas; excepto en el puré de manzana (Gerber®).

En la manzana y en los productos industriales comercializados en México derivados de ella, se han insertado genes de otras especies, en su mayoría a través del terminador Tnos; mientras que para el promotor CaMV 35S solo se obtuvieron dos amplificados, lo que sugiere que se utilizaron otros promotores para la mejora de sus propiedades.

Tres variedades de manzana comercializada en México (Golden Delicious, Granny Smith y Royal Gala) contienen al terminador Tnos, pero no al promotor CaMV 35S del cual no se obtuvo ningún amplificado en el fruto, solo una de las 4 variedades en estudio no contiene ninguno de estos genes indicadores de transgénicos.

En las muestras de productos industrializados, se detectó la presencia de Tnos, excepto en la sidra, donde solo se detectó el CaMV 35S y en la muestra de Té, estuvieron presentes ambos genes.

Se demostró experimentalmente el contenido de transgénicos en manzana tradicional y en los productos estudiados, a pesar de que en México no está permitida la liberación del cultivo de manzana genéticamente modificada.

Además, ninguno de estos alimentos procesados declaraba esta información en el etiquetado; aunque es indispensable debido a la controversia social ocasionada por la producción de alimentos transgénicos para que el comprador pueda identificarlos y elija libremente si debe ingerirlos o no, sobre todo ante la creciente preocupación de los consumidores en cuanto a su alimentación y salud.

De tal forma que se incumple la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) que tiene la finalidad de regular las actividades de utilización, liberación, comercialización, importación y exportación de OGM, con el fin de prevenir, evitar o reducir los riesgos que pudieran ocasionar a la salud humana o al medio ambiente y a la diversidad biológica.

Ya que no existen estudios que demuestren la seguridad de OGM de los productos analizados en este estudio, se incumple con la NOM-164-SEMARNAT/SAGARPA-2013 que establece las características de los resultados de las liberaciones realizadas de OGM en relación con los posibles riesgos para el medio ambiente y la diversidad biológica.

Por los resultados obtenidos en este proyecto, se determina que tampoco se cumple con la normativa de bioseguridad vigente, NOM-001-SAG/BIO-2014 que obliga al etiquetado de organismos genéticamente modificados que sean semillas o material vegetativo destinados a siembra, cultivo y producción agrícola.

Perspectivas del trabajo

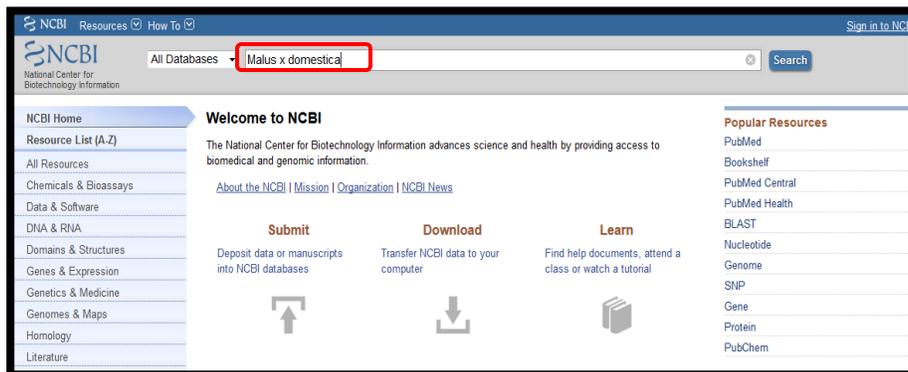
- Emplear otros kits para la detección de OGM mediante PCR en especies vegetales que presenten alto contenido de pigmentos, polisacáridos o proteínas que actúen como inhibidores de la reacción.
- Emplear los primers diseñados para la identificación de manzana en la detección de adulteraciones de productos que declaren estar elaborados a base de manzana.
- Analizar otras variedades de manzana y productos industrializados fabricados con manzana de marcas comerciales distintas a las empleadas en este proyecto mediante el uso de más promotores y terminadores.
- Realizar una campaña de concientización ante entidades gubernamentales como PROFECO, SEMARNAT y SAGARPA para exigir el análisis de manzanas frescas y de productos derivados de ella que son de alto consumo en México con el propósito de exigir regulaciones obligatorias para la declaración de aquellos productos que resulten ser transgénicos.
- Incorporar una norma específica que regule el análisis de productos de nuevo ingreso al mercado para verificar si son transgénicos y que obligue a declararlo en el empaque.

Anexo 1

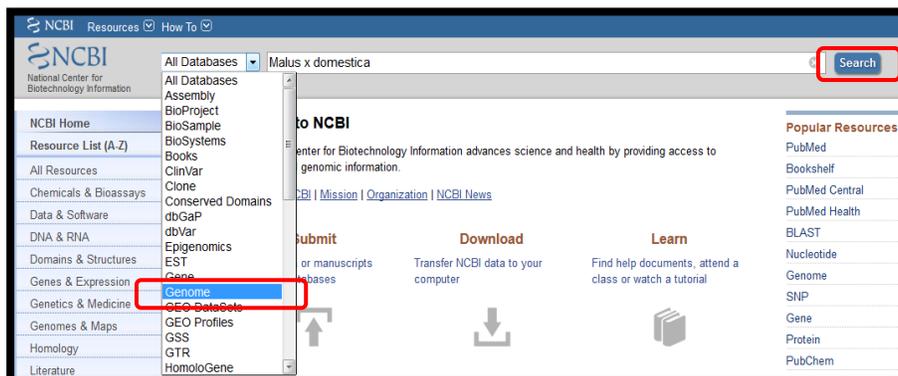
Diseño de primers.

El diseño de primers para la detección de manzana en distintas variedades del fruto y en muestras de productos industrializados, se realizó ingresando en la página de “NCBI” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y haciendo uso de la herramienta “Primer Quest Tool” de la página Integrated DNA Technologies (www.idtdna.com) mediante la metodología que se muestra a continuación.

1. Para obtener el genoma de la manzana y obtener primers que amplificaran para detectar un fragmento específico del genoma se ingresó en la página web del NCBI y se escribió en el buscador el nombre de la especie en estudio (*Malus x domestica*).



2. Se seleccionó la opción “Genome” y se dio clic en “Search”.



- Se diseñaron los primers que amplificaran para el cromosoma 2. Por lo tanto, se seleccionó la opción “*Malus x domestica* cultivar Golden Delicious Chromosome 2”.

NCBI Resources | How To | Sign in to NCBI

Genome | malus x domestica[orgn] | Search

Malus domestica (apple)
 Representative genome: Malus domestica (assembly MalDomGD1.0)
 Download sequences in FASTA format for genome, transcript, protein
 Download genome annotation in GFF, GenBank or tabular format
 BLAST against Malus domestica genome
 All 2 genomes for species:
 Browse the list
 Download sequence and annotation from RefSeq or GenBank

Display Settings: Overview | Send to: | ID: 358

Organism Overview: Genome Assembly and Annotation report [2] | Organelle Annotation Report [1]

Malus domestica (apple)
 Malus domestica Organism overview

Lineage: Eukaryota[2433]; Viridiplantae[284]; Streptophyta[232]; Embryophyta[231]; Tracheophyta[229]; Spermatophyta[227]; Magnoliophyta[222]; eudicotyledons[189]; Gunneridae[188]; Pentapetalae[186]; rosoids[185]; fabids[61]; Rosales[17]; Rosaceae[11]; Maloideae[4]; Malus[2]; Malus[1]; Malus domestica[1]

Malus domestica, apple, is a member of the family Rosaceae. This family includes important fruit trees and ornamental flowering plants pear, peach, cherry, plum, apricot, almond, and rose. Apple, as the main fruit crop of temperate regions, is one of the most important fruit tree grown in the United States. There are more than 7500 known apple cultivars [More](#).

Summary | Publications

Representative (genome information for reference and representative genomes)

Reference genome:
 Malus domestica MalDomGD1.0
 submitter: IASMA research center

Locus Type	Name	RefSeq	IN SDCC	Size (Mb)	GC%	Protein	rRNA	tRNA	Other RNA	Gene	Pseudogene
master WGS	-	-	ACYM0000000.1	2,400.53	38.1	-	-	-	-	-	-
Nuc Chr	1	NC_024239.1	CMD011026.1	29.29	41.7	2,006	-	25	275	1,816	128
Nuc Chr	2	NC_024240.1	CMD011027.1	36.37	40.9	2,443	-	22	448	2,283	176
Nuc Chr	3	NC_024241.1	CMD011028.1	33.71	41.0	2,077	-	24	455	1,967	118
Nuc Chr	4	NC_024242.1	CMD011029.1	23.02	41.0	1,768	-	26	264	1,574	63
Nuc Chr	5	NC_024243.1	CMD011030.1	31.61	41.1	2,258	-	25	458	2,096	134
Nuc Chr	6	NC_024244.1	CMD011031.1	25.47	41.0	1,769	-	21	245	1,538	68
Nuc Chr	7	NC_024245.1	CMD011032.1	26.38	41.0	1,833	-	17	354	1,666	108
Nuc Chr	8	NC_024246.1	CMD011033.1	29.6	40.9	1,856	-	26	345	1,758	119
Nuc Chr	9	NC_024247.1	CMD011034.1	33.72	41.1	2,258	-	25	458	2,096	134
Nuc Chr	10	NC_024248.1	CMD011035.1	33.39	41.1	2,258	-	25	458	2,096	134
Nuc Chr	11	NC_024249.1	CMD011036.1	35.3	41.1	2,258	-	25	458	2,096	134
Nuc Chr	12	NC_024250.1	CMD011037.1	31.68	41.1	2,258	-	25	458	2,096	134

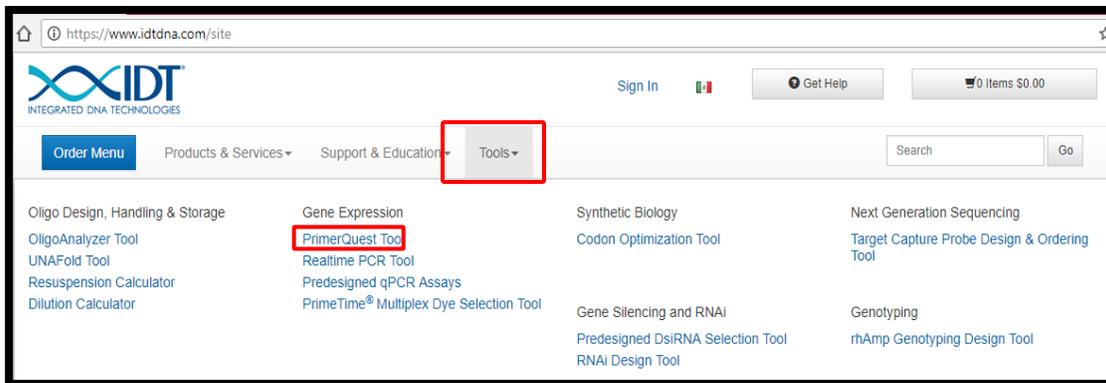
Malus x domestica cultivar Golden Delicious chromosome 2, MalDomGD1.0 Primary Assembly, whole genome shotgun sequence

g[1651213255]g[1]ASM:GCF_000148775 | NC_024240.1|gpp[GPC_000001451.1]g[1]NCBI_GENOMES|36326

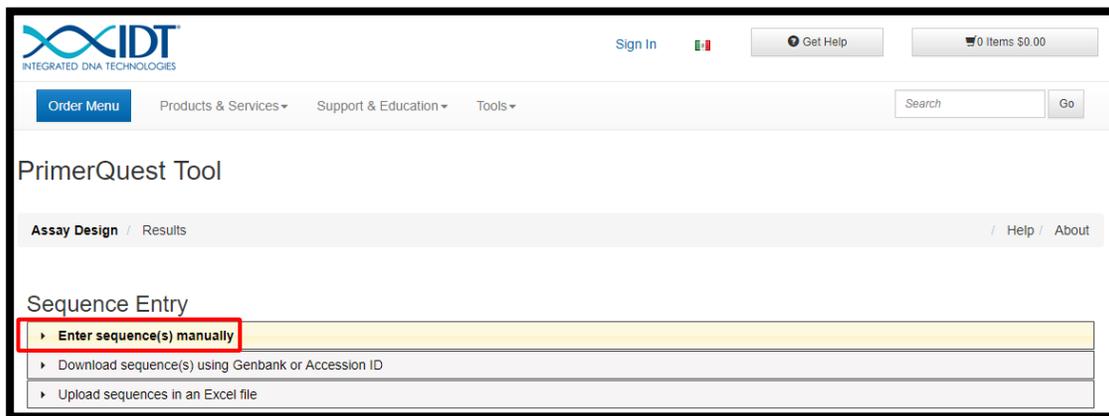
oliver.fcgi?recordid=5990ec5bf617f6ca1762d13e

NCBI Resources | Genome Data Viewer | Map Viewer | Tools | BLAST Genome | Related information | Assembly | BioProject | Gene | Components | Protein | PubMed | Taxonomy | Search details | "Malus domestica"[Organism] | Search | See more... | Recent activity | Turn Off | Clear | Malus domestica | Genome | malus x domestica[orgn] (1) | Genome | Malus x domestica cultivar Golden Delicious chromosome 2, MalDomGD1.0 Prim Nucleo... | Genome | Malus x domestica chromosome 2, whole genome shotgun sequence | Nucleotide | malus x domestica golden delicious (0)

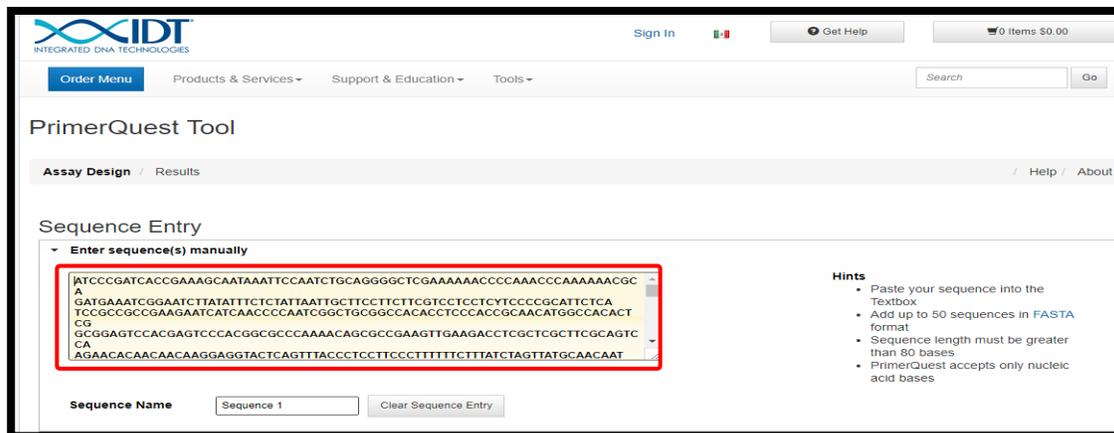
- Con el propósito de reducir al mínimo el margen de error de amplificación de los primers empleados para identificación de manzana y evitar su alineación con otras especies diferentes a ella, se determinó emplear la región de 31253656 a 31255617 del cromosoma 2 de *Malus x domestica* para el diseño de primers de detección de manzana, debido a que es la región central del cromosoma. Por tal motivo seleccionó la opción “Selected region” de la pestaña “Change region shown”, se introdujeron los rangos de la región elegida y se seleccionó la opción “Update view”.



7. En la ventana desplegada después de llevar a cabo el paso 6, se seleccionó la opción “Enter sequence (s) manually”.



8. Se insertó la secuencia que se conservó en el portapapeles en el paso 5 y que se obtuvo de la página del NCBI en la sección “Enter sequence (s) manually” de la pestaña “Sequence Entry”.



9. Se seleccionó la opción “PCR 2 primers” de la pestaña “Choose Your Desing”.

The screenshot shows the IDT PrimerQuest Tool interface. The 'Sequence Entry' section contains a text area with a DNA sequence and a 'Sequence Name' field set to 'Sequence 1'. Below this, there are options to 'Download sequence(s) using Genbank or Accession ID' and 'Upload sequences in an Excel file'. The 'Choose Your Design' section features three buttons: 'PCR 2 Primers' (highlighted with a red box), 'qPCR 2 Primers + Probe', and 'qPCR 2 Primers Intercalating Dyes', along with a 'Show Custom Design Parameters' button.

10. De acuerdo a los resultados arrojados por el software, se seleccionó el “Set 2”, secuencia 1, con el fin de seguir los criterios establecidos por (Somma y Querci, 2007, p. 218) para el diseño de primers, debido a que esta pareja de primers cumplió con la mayoría de los requisitos establecidos en el Cuadro 5.

The screenshot shows the IDT PrimerQuest Tool interface displaying 'Assay Set Locations for Sequence 1'. A horizontal bar chart shows the sequence length from 1 to 1962. Below the chart, there are two assay sets. The 'Set 2 Sequence 1' option is selected and highlighted with a red box. The table below shows the primer details for Set 2.

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	587	600	22	62	45.5
Reverse	853	874	21	62	47.6

11. Se seleccionó la opción “View Assay Details” y se registraron las características de los primers diseñados.

The screenshot shows the IDT PrimerQuest Tool interface. The main content area displays the following information:

Parameter Set: General PCR (Primers only)
 Sequence Name: Sequence 1
 Amplicon Length: 287

		Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	GTCCGGTTACATCTCCGATCIT (Sense)	587	609	22	62	45.5
Reverse	ACCCACAATACCCGATTCITC (Anti Sense)	653	674	21	62	47.6

Below the table is a sequence viewer showing the full DNA sequence with the primer binding sites highlighted in green and red.

De tal forma se conoció la secuencia frontal y reversa de los primers a emplear para la detección de un fragmento de ADN de manzana en el fruto y en productos derivados de ella, así como el tamaño de amplificado de 287 pares de bases.

Anexo 2

Cálculo de temperatura de hibridación (T_m) de primers

Primers para identificar un fragmento de ADN de manzana en el fruto y en productos industrializados derivados de ella

- Para el cromosoma 2 de *Malus x domestica*

Para el cálculo de la temperatura de hibridación (T_m) empleada en el programa de PCR directa para la identificación de un fragmento de ADN de manzana en el fruto y en productos derivados de ella, se utilizó la herramienta “T_m Calculator” de la página web Thermo Fisher Cientific (<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>) de acuerdo a lo establecido en el protocolo del Kit Phire Plant Direct[®]. Se seleccionó la opción ADN polimerasa “Phusion or Phire DNA polymerase”, que es la enzima con que cuenta el Kit Phire Plant Direct[®] empleado en este proyecto.

El método de entrada seleccionado fue “Single pair” y se introdujeron las secuencias de los primers frontal y reverso obtenidos siguiendo la metodología descrita en el Anexo 1. A continuación, se introdujo la concentración a la cual se diluirían los primers para su empleo en este proyecto, la cual corresponde a “0.5 μM”.

The screenshot displays the ThermoFisher Scientific T_m Calculator interface. It includes a search bar, navigation links (Contacto, Sign In, Orden Rápida), and an important note about PCR primer mismatches. The main form is divided into four sections:

- 1. Select your DNA polymerase:** Three radio button options are shown: Platinum SuperFI DNA polymerase, Phusion or Phire DNA polymerase (selected), and Taq-based DNA polymerase.
- 2. Select input method:** Two radio button options are shown: Single pair (selected) and Batch.
- 3. Type or paste your sequence:** Two primer sequences are entered. Primer#1: 5'-GTCGGTTACATCTTCCGATCTT (21 nt, A=3.0, T=9.0, C=6.0, G=4.0, CG=45.45%). Primer#2: 5'-ACCCACAATACCCGATTCTTC (21 nt, A=6.0, T=5.0, C=9.0, G=1.0, CG=47.62%). A 'Clear' button is visible.
- 4. PCR Conditions:** The 'Primer conc' field is set to 0.5 μM.

Una vez seleccionadas las variables descritas en el párrafo anterior, el software bioinformático arrojó la temperatura de hibridación de 63.9°C para la pareja de primers de identificación de manzana.

ID #1	Sequence #1	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol·cm)	Tm °C	ID #2	Sequence #2	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol·cm)	Tm °C	Annealing Temperature °C
Primer#1	GTCGGTTACATCT TCCGATCTT	6667.4	199700.0	60.9	Primer#2	ACCCACAATACCC GATTCTTC	6270.1	194000.0	61.5	63.9

Primers para la identificación de manzana transgénica en distintas variedades del fruto y en productos industrializados derivados de ella

Para el cálculo de la temperatura de hibridación de los primers de identificación de manzana transgénica, se empleó la fórmula Wallace-Ikatura que se describe a continuación:

$$Tm = [(G + C)(4) + (A + T)(2)] - 5$$

Dónde:

G= Número de Guaninas presentes en la secuencia

C= Número de Citosinas presentes en la secuencia

A= Número de Adeninas presentes en la secuencia

T= Número de Timinas presentes en la secuencia

- Para el Promotor CaMV 35S (Virus del Mosaico de la coliflor)

PRIMER FRONTAL (Secuencia: **GCTCCTACAAATGCCATCA**)

$$Tm = [(2 + 7)(4) + (6 + 4)(2)] - 5$$

$$Tm = 56 °C$$

PRIMER REVERSO (Secuencia: **GGATAGTGGGATTGTGCGTC**)

$$Tm = [(9 + 2)(4) + (3 + 6)(2)] - 5$$

$$Tm = 62\text{ }^{\circ}\text{C}$$

TEMPERATURA DE HIBRIDACIÓN PROMEDIO DEL PROMOTOR

$$\overline{Tm} = \frac{56 + 62}{2}$$

$$\overline{Tm} = 59\text{ }^{\circ}\text{C}$$

- **Para el Terminador Tnos (Terminador de la nopalina sintetasa)**

PRIMER FRONTAL (Secuencia: **GAATCCTGTTGCCGGTCTTG**)

$$Tm = [(6 + 5)(4) + (2 + 7)(2)] - 5$$

$$Tm = 62\text{ }^{\circ}\text{C}$$

PRIMER REVERSO (Secuencia: **TTATCCTAGTTTGCGCGCTA**)

$$Tm = [(4 + 5)(4) + (3 + 8)(2)] - 5$$

$$Tm = 58\text{ }^{\circ}\text{C}$$

TEMPERATURA DE HIBRIDACIÓN PROMEDIO DEL TERMINADOR

$$\overline{Tm} = \frac{62 + 58}{2}$$

$$\overline{Tm} = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$$

Anexo 3

Hidratación de primers

Los primers empleados para llevar a cabo la PCR requerían tener una concentración específica. Por tal motivo, se hidrataron con agua libre de nucleasas, ya que generalmente se encuentran en una concentración (nmol) distinta a la requerida.

A continuación, se muestran los cálculos realizados para conocer el agua libre de nucleasas que requirió cada uno de los primers para su hidratación.

Hidratación de primers para identificación de manzana en productos industrializados

Para realizar la PCR que permitiera la identificación de manzana, se requirió que los primers tuvieran una concentración de 250 μmol . Inicialmente el primer frontal se hallaba a una concentración de 31.3 nmol, mientras que el reverso a 33.8 nmol; se realizaron los siguientes cálculos para determinar la cantidad de agua a agregar para la hidratación.

Para el primer frontal los cálculos fueron los siguientes:

$$31.3 \text{ nmol} \left(\frac{1 \mu\text{mol}}{1000 \text{ nmol}} \right) = 0.0313 \mu\text{mol}$$

$$U = \frac{0.0313 \mu\text{mol} \times L}{250 \mu\text{mol}} = \frac{0.0001252 L}{10^{-6}} = 125.2 \mu\text{L}$$

Por lo tanto, se requirieron **125.2 μL** de agua libre de nucleasas para la hidratación del primer frontal de identificación de manzana.

Para el primer reverso los cálculos fueron los siguientes:

$$33.8 \text{ nmol} \left(\frac{1 \mu\text{mol}}{1000 \text{ nmol}} \right) = 0.0338 \mu\text{mol}$$

$$U = \frac{0.0338 \mu\text{mol} \times L}{250 \mu\text{mol}} = \frac{0.0001352 L}{10^{-6}} = 135.2 \mu\text{L}$$

Por lo tanto, se requirieron **135.2 μL** de agua libre de nucleasas para la hidratación del primer reverso de identificación de manzana.

Hidratación de primers para identificación de transgénicos

Cabe mencionar que los primers empleados en este proyecto para la identificación de manzana transgénica (CaMV 35S y Tnos), tanto el frontal como el reverso, se hallaban a una concentración inicial de 25 nmol. Por tal motivo, se realizó el mismo cálculo para ambos primers con el fin de conocer la cantidad de agua que tuvo que agregarse para la hidratación.

$$25 \text{ nmol} \left(\frac{1 \mu\text{mol}}{1000 \text{ nmol}} \right) = 0.025 \mu\text{mol}$$

$$U = \frac{0.025 \mu\text{mol} \times L}{250 \mu\text{mol}} = \frac{0.0001 L}{10^{-6}} = 100 \mu\text{L}$$

Por lo tanto, se requirieron **100 μL** de agua libre de nucleasas para la hidratación de los primers de identificación de transgénicos.

Bibliografía

- Agencia de noticias del estado mexicano. (2015). Recomienda CEDRSSA fomentar producción agroalimentaria nacional para reducir compras a EU y evitar el alza de precios. *Notimex*. Recuperado de: <http://www.notimex.gob.mx/comunicadosDetalle/565219/recomienda-cedrssa-fomentar-producci%C3%B3n-agroalimentaria-nacional-para-reducir-compras-a-eu-y-evitar-alza-de-precios>
- ArgenBio. (2015). *Preguntas frecuentes sobre la Biotecnología*. Argentina: Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Recuperado de: <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=311>
- Bolívar, F. (2003). *Recomendaciones para el Desarrollo y Consolidación de la Biotecnología en México*. México: Academia Mexicana de Ciencias A.C. Recuperado de: <http://www.coniunctus.amc.edu.mx/libros/Recomendaciones.pdf>
- Botanical online. (2017). Tipos de manzana: Clases y variedades de manzana. España. Recuperado de: <http://www.botanical-online.com/clasesdemanzanas.htm>
- Calva, G. y Pérez J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de Alimento para el futuro. *Revista Digital Universitaria, volumen (6)*. 9-16. Recuperado de: <http://www.revista.unam.mx>. doi: 1067-6079
- Chen, C., Smye, S., Robinson, M. y Evans J. (2006). Membrane electroporation theories: a review. *Medical & Biological Engineering & Computing*, volumen 44, 5-14. Recuperado de: https://www.researchgate.net/journal/0140-0118_Medical_Biological_Engineering_Computing
- Cornide, M. (2002) *Marcadores moleculares: nuevos horizontes en la genética en la selección de las plantas*. Cuba: Félix Varela.
- Cortázar, A. y Silva, E. (2004). *Métodos fisicoquímicos en biotecnología*. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>

- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, volumen 22, numero 5, 299-305. Recuperado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-reaccion-cadena-polimerasa-pcr-tiempo-S0213005X0473092X>
- Danilova, S. (2007). The technologies for genetic transformation of Cereals. *Russian Journal of Plant Physiology*, volumen 54, numero (5), 569-581. doi: S102144370. Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1134/S1021443707050019>
- Díaz, M., Zappacosta, D., Franzone, P. y Ríos, R. (2004). Transformación genética, Parte III. *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Argentina: Argenbio. Recuperado de: <http://www.argenbio.org/h/biblioteca/libro.php>
- Dirección Nacional de Desarrollo Regional. (2015). Complejo Fruta de Pepita. *MECON - Secretaría de Política*. Recuperado de: http://www.mecon.gob.ar/peconomica/docs/Complejo_pegitas.pdf
- Fox, M., Esveld, D., Valero, A., Luttge, R., Matswijk, H., Bartels, P., Van Den Beerg, A. y Boom, R. (2006). Electroporation of cells in microfluidic devices: a review. *Anal Bioanal Chem*, volumen 385, numero (3), 474-485. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16534574>
- Freiría, G. (2014). *Anuario estadístico del campo, 2014*. Lugar de publicación: diea, México. Recuperado de: http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/anuario_2014_-_diea.pdf
- Fuentes, A. (2010). *Fresh Produce Journal*. Lugar de publicación: Estados Unidos. Recuperado de: <http://www.freshproducejournal.com>
- Gelvin, S. B. (2010). Plant Proteins Involved in *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation. *Annu Rev Phytopathol*, volumen 48, pp. 45-68. doi: 10.1146/annurev-phyto-080508-081852. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20337518>
- González, P. S. (s. f.). *Órgano informativo del departamento de medicina familiar*. México: AgroBIO México. Recuperado de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/familiar/atfm112/temasdeinteres.html>

- Greenpeace. (2014). *Guía roja y verde de alimentos transgénicos 5a edición*. España: Greenpeace. Recuperado de: https://archivo-es.greenpeace.org/espana/Global/espana/2015/Report/transgenicos/GuiaRojaVerdeTransgenicos_5edicion_Actualizacion062015.pdf
- Hansen, G. y Wright, M. (1999). Recent advances in the transformation of plants. *Trends in plant science*, volumen 4, numero (6), pp. 226-231. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10366879>
- Heimdall, H., Falk, B., Poll, L. y Larsen, L. (1995). Biochemical changes and sensory quality of shredded and MA-packet fruits. *Journal of Food Science*, volumen 60, numero (6), 1265-1268. Recuperado de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.1995.tb04570.x>
- Hermosillo, M. G., (2015). *Detección de patulina en manzana "Golden Delicious" y en productos derivados elaborados industrial y artesanalmente comercializados en México* (Tesis de licenciatura). UNAM.
- Holden, M. J., Levine, M., Scholdberg, T., Haynes, R. J. y Jenkins, G.R. (2010). The use of 35S and Tnos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials. *Analytical and bioanalytical chemistry*, volumen 396, numero (6), 2175-2187. doi: 10.1007/s00216-009-3186-x. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19856176>
- Infoagro. (2018). *EL cultivo de la manzana*. Lugar de publicación: Curso On Line especialista en Fruticultura. Recuperado de: http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tradicionales/manzana.htm
- James, C. (2011). *Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010*. Recuperado de: <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/download/isaaa-brief-42-2010.pdf>
- Javier, M. (2015). *Aprobadas nuevas variedades de manzanas transgénicas en Estados Unidos*. México: Gastronomía y CIA. Recuperado de: <http://www.gastronomiaycia.com/2015/02/14/aprobadas-nuevas-variedades-de-manzanas-transgenicas-en-estados-unidos/>
- Job, D. (2002). Plant biotechnology in agriculture. *Biochimie*, volumen 84, numero (11), 1105-1110. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908402000135>

- José. (17, feb, 2015). *El premio Nobel de medicina y las manzanas transgénicas*. [Blog Scientia]. Recuperado de: <http://scientiablog.com/2015/02/27/el-premio-nobel-de-medicina-y-las-manzanas-transgenicas/>
- Kess, B. J. (2015). *Fresh plaza: Noticias del sector de frutas y verduras*. Estados Unidos: Fruit & Vegetable Facts. Recuperado de: <http://www.freshplaza.es/article/89176/2014,-un-a%C3%B1o-dif%C3%ADcil-para-la-exportaci%C3%B3n-de-fruta-chilena>
- Knee, M. (2002). *Bases biológicas de la calidad de la fruta*. España: Acribia.
- Kok, E. J., Aarts, H. J., Van Hoef, M. A. y Kuiper, H. A. (2002). DNA methods: critical review of innovative approaches. *Journal of AOAC Int.*, volume 85, 339-349.
- Kuiper, H. A. (1999). Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organism. *Food Control*, volumen 10, 339-349.
- Leal, G. (2005). *Conferencia ¿qué sabes de los transgénicos? Los organismos genéticamente modificados*. México: Greenpeace. Recuperado de: <http://archivo-es.greenpeace.org/espana/Global/espana/report/transgenicos/que-sabes-de-los-transgenicos-2.pdf>
- Lewin, B. (2014). *Genes IV*. Madrid, España: Reverté.
- Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J. y Anklam, E. (1999). IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International*, volumen 82, 923–928.
- Lipp, M., Shillito, R., Giroux, R., et. al. (2005). Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. *Journal of AOAC*. Volumen 88, numero (1), 136–155.
- López, M., Mallorquín, P. y Vega, M. (2003). Tecnologías Moleculares de Trazabilidad Alimentaria. Informe de Vigilancia tecnológica. *Sector Agroalimentario, Genoma España*. España: ArgenBio. Recuperado de: http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/TRAZABILIDAD_ALIMENTARIA.pdf

- Marc, E. G., Hendrickx, D. K., Ludikhuyze, L., Van, L., Volker, H. (2001). *Ultra-High-Pressure Treatment of Foods*. USA: Springer Science & Business Media.
- Martínez, E. (2007). *El derecho de información en el consumo de los organismos genéticamente modificados*. Tesis de licenciatura. UNAM, México.
- Mohan, B. R., Sajeena, A., Seetharaman, K, Reddy, M. S. (2003). Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management an over view. *Elsevier*, volumen 22, numero (9), 1071-1086.
- Morigaki, K. y Walde, P. (2007). Fatty acid vesicles. *Current Opinion Colloid & Interface Science*, volumen 12, numero (2), 75-80. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029407000398?via%3Dihub>
- Neuhaus, G. y Spangenberg, G. (1990). Plant transformation by microinjection techniques. *Physiologia Plantarum*, volumen 79, 213-217. Recuperado de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-3054.1990.tb05890.x>
- Patent Lens (2010). *Promoters Used to Regulate Gene Expression*. USA: Biosnet. Recuperado de: <http://www.bios.net/daisy/promoters/768.html>
- Perera, J., Tormo, A. y García J. L. (2002). Ingeniería genética, preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA. *Síntesis*, volumen 1, numero (40-48), 223-229.
- Pietsch, K., Waiblinger, H.-U., Brodmann, P. y Wurz, A. (1997). Screening-Verfahren zur Identifizierung gentechnisch veränderter pflanzlicher Lebensmittel. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, volumen 93, 35–38.
- Posso, D. y Ghneim T. (2008). *Manual de laboratorio: Uso de Marcadores Microsatélites para la Estimación de Diversidad Genética en Plantas*. Venezuela: IVIC.
- Querci, M., Jermini M., Van den Eede, G. (2007). *Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos*. Luxemburgo: Organización Mundial de la Salud. Recuperado de: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/User%20Manual%20ES%20full.pdf>

- Ramírez, H., Cepeda, S., (1988). *El manzano*. México: Trillas.
- Rao, A. Q., Bakhsh, A., Kiani S., Shahzad, K., Husnain, T., Shahid, A. A. y Riazuddin, S. (2009). The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances*, volumen 27, numero (6), 753-763.
- Rimache, M. (2007). *Cultivo de manzano*. Panamá: Macro EIRL.
- Roa, P., Jordi, O. y Rodríguez, A. (2004). Bioquímica: técnicas y métodos. España, Hélice.
- Rodríguez, I. y Barrera, H. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, volumen7, 323-332.
- Rommens, C. (2004). All-native DNA transformation: a new approach to plant genetic engineering. *Trends Plant Science*, volumen 9, numero (9), 457-464. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15337496>
- SAGARPA, Agricultura, (2012). *México, gran comerciante y competidor exterior de frutas*. Lugar de publicación: México. Recuperado de: <http://www.sagarpa.org.mx>
- SAGARPA-UNIFRUT, (2013). *Estudio de la infraestructura logística para la manzana y durazno del estado de Chihuahua*. Lugar de publicación: México. Recuperado de: <http://www.sagarpa.org.mx>
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning*. USA: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schiavone, E., Morón, P. y Lema, M. (2006). Normas locales sobre identificación de “alimentos transgénicos” y el “derecho a la información del consumidor”. México: SAGPyA. Recuperado de: <http://argenbio.org/biblioteca/EtiquetadoSAGPyA.pdf>
- SENASICA. (2016). *Técnicas de análisis*. México: Gobierno. Recuperado de: <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/tecnicas-de-analisis-28488>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2017). *Producción agrícola. Ciclos y perennes 2014*. México: Gobierno. Recuperado de: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>

- Sharma, K., Sharma, H., Seetharama, N. y Ortiz, R. (2002). Development and deployment of transgenic plants: biosafety considerations. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* Volumen 38, 106-115.
- SHCP-Financiera Nacional de Desarrollo agropecuario, rural, forestal y pesquero. (2104). *Segundo Informe de Labores*. México: Gobierno. Recuperado de: http://www.hacienda.gob.mx/RDC/Informe_labores/IL_SHCP_2014.pdf
- Somma, M. y Querci, M. (2007). *Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos*. Luxemburgo: European Comission.
- Stram, Y., Vilks, A. y Klinger, I. (2000). Detection of residues of genetically modified soybeans in breaded fried turkes cutlets. *Journal of Food Science*, volumen 65, 604-606.
- Taylor, I. (2007). *Ingeniería genética de cultivos políticas internas y legislación incierta*. Estados Unidos: HFAPP.
- Terry, C. F., Harris, N. y Parkes, H. C. (2002). Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. *Journal of AOAC Int.*, volumen 85, 768-774.
- Trigo, E., Traxler, G., Pray, C. y Echeverría, R. (2002). Biotecnología agrícola y desarrollo rural en América Latina y el Caribe. *Implicaciones para el financiamiento del BID*. USA: Banco Interamericano para el Desarrollo. Recuperado de: <http://services.iadb.org/wmsfiles/products/Publications/1441649.pdf>
- Upadhyala, N., Zhou, X. y Zhu, Q. (2000). *Transgenic Rice*. USA: American Association of Cereal Chemists. Recuperado de: <http://www.publish.csiro.au/FP/PP01205>
- USDA/FAS Fresh Deciduous Fruit. (2015). *World Markets and Trade*. Lugar de publicación: Estados Unidos, Recuperado de <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/fas/decidwm//2010s/2015/decidwm-06-12-2015.pdf>
- Varios autores. (2000). *Almanaque mundial 2000: Crónica de un siglo*. México: Televisa. Recuperado de: <https://porrua.mx/libro/GEN:168836/>

- Vasil, I. (2007). A short history of plant biotechnology. *Phytochemistry Reviews*, volumen 7, numero (3), 387-394. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/225329427_A_short_history_of_plant_biotechnology
- Veluthambi, K., Gupta, A. y Sharma, A. (2003). The current status of plant transformation technologies. *Current Science*, volumen 84, numero (3), 368-380. Recuperado de: <http://repository.ias.ac.in/57240/1/23-pub.pdf>
- Watson, D. J. (2006). *Biología molecular del gen*. Madrid, España: Panamericana.
- Whitaker, J. R. (1994). *Principles of enzymology for the food sciences*. USA: Marcel Dekker.
- Zupan, J. R., Muth, T. R., Draper, O., Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*, volumen 23, numero (1), 11-28. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10929098>