



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Identificación de fresa (*Fragaria x ananassa*) genéticamente modificada
en productos frescos y comerciales en México mediante PCR ”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

DIANA AIDEHT LAGUNA MONROY

ASESOR: Dr. José Francisco Montiel Sosa
COASESOR: M. en M. Josefina Moreno Lara



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARIA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

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

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

Identificación de fresa (*Fragaria x ananassa*) genéticamente modificada en productos frescos y comerciales en México mediante PCR.

Que presenta la pasante: Diana Aideth Laguna Monroy
Con número de cuenta: 413048257 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 17 de Octubre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

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



Agradecimientos

Le agradezco primero a dios por permitirme llegar hasta este punto de mi vida por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera. ” El señor irá delante de ti; estará contigo, no te dejará ni te desampará, no temas ni te acobardes”. Deuteronomio 31:8

A mis padres **Aldo Laguna y Boni Monroy** ellos son mi principal motor de mis sueños, por confiar y creer en mis expectativas, por los consejos, valores y principios que me han inculcado porque este logro también es suyo y una vida no será suficiente para agradecerles todo lo que han hecho por mí, gracias infinitas.

A mis hermanas **Martha y Monse** por ser mis compañeras eternas de vida, por ser mis ejemplos a seguir, por ayudarme en todo lo que necesitaba, las amo con todo mi corazón.

A mi hermanito **Aldo** por ser el mejor amigo y compañero que mi mamá me pudo regalar, te amo infinitamente.

A mis amigos **Elda, Elihu y Ale** gracias por apoyarme y no abandonar el que también era sueño de ustedes, gracias por compartir esta etapa conmigo por la paciencia y sobre todo la hermosa amistad que hicimos.

A **mis abuelitos, mis tíos y primos** por siempre confiar en mí aunque el camino parecía negro, gracias por estar siempre.

A mis queridos amigos de Taco Holding **Adri, Betza, Andy y Andrés** gracias por dejarme volar y cumplir mi más grande sueño.

A **Joaquín y Pablo** que aunque llegaron a mi vida casi al final de esta etapa siempre me alentaron a seguir adelante gracias por llenar mi vida de colores y alegría.

A mi asesor de tesis el **Dr. Francisco Montiel**, gracias por la asesoría y el apoyo durante el transcurso de este proyecto.



A mi coasesora la **Maestra Josefina Morena Lara** gracias infinitas por la paciencia y el apoyo estoy muy agradecida con usted, gracias por no dejar de creer en mí.

A mis **sinodales**, gracias por la dedicación, por su tiempo y consejos para que este trabajo saliera lo mejor posible.

GRACIAS TOTALES a la **UNAM** y en especial a la **FES CUAUTITLÁN** por todo lo aprendido durante 4 años y medio porque estudiar aquí siempre fue mi sueño.

A todos los maestros que se cruzaron en esta travesía en especial **Avalos, Miriam, María Eugenia, Trejo, Cortázar y Zaira** gracias por enseñarme lo esencial y gracias por hacerme una mejor ingeniera.



Un agradecimiento especial al proyecto “Técnicas genómicas multidisciplinares aplicadas en las ciencias de la salud y producción de alimentos” con la clave PIAPI11837 y PAPIIT IN226419 por apoyo brindado para la realización de esta tesis.



DEDICATORIAS

Este trabajo quiero dedicarlo a quienes siempre han confiado en mí, me han apoyado y me brindan su amor incondicional, a mis padres y mis hermanos Monse, Martha y Aldo.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

***Diana Aideht Laguna Monroy ***



ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABLAS	11
RESUMEN.....	12
INTRODUCCIÓN	13
CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES.....	15
1.1 Botánica de la fresa.....	15
1.2 Morfología de la fresa.....	17
1.3 Composición química de la fresa.....	17
1.4 Variedades de fresa.....	19
1.4.1 Variedades de fresa en México	20
1.5 Importancia de la fresa	23
1.6 Producción mundial de la fresa	24
1.6.1 Producción de fresa en México.....	24
1.7 Consumo de la fresa	25
1.8 Exportación de la fresa mexicana.....	26
1.9 Plagas y Enfermedades.....	27
1.9.1 Plagas	27
1.9.2 Malezas.....	28
1.9.3 Enfermedades	30
1.10 Organismos genéticamente modificados	31
1.10.1 Fresa genéticamente modificada	31
1.10.2 Creación de plantas genéticamente modificadas.....	32
1.10.3 Características deseadas en las plantas genéticamente modificadas.....	34
1.10.3 Beneficios y riesgos de plantas genéticamente modificadas.....	35



1.10.4	Promotores y terminadores.....	36
1.10.5	<i>Arabidopsis</i> como promotor.....	37
1.10.6	Regulación de alimentos genéticamente modificados en México	38
1.10.7	Regulación de alimentos genéticamente modificados internacionales	40
1.11	Métodos de detección de ADN.....	41
1.11.1	Reacción en cadena de la polimerasa	42
1.11.2	Etapas de la reacción	43
1.11.3	Componentes de la PCR.....	44
1.11.4	Análisis de un producto de PCR	46
1.11.5	Contaminación en la PCR	48
1.11.6	Aplicaciones de la PCR.....	48
1.11.7	Ventajas y desventajas	49
1.11.8	Perspectivas.....	¡Error! Marcador no definido.
CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....		50
2.1	Cuadro metodológico	50
2.2	Justificación.....	51
2.3	Descripción de cuadro metodológico	52
2.3.1	Objetivo general.....	52
2.3.2	Objetivo particular 1	52
2.3.3	Objetivo particular 2	53
2.3.4	Objetivo particular 3	53
2.3.5	Objetivo particular 4	54
2.3.6	Objetivo particular 5	54
2.3.7	Objetivo particular 6.	54
2.4	Materiales y métodos.....	55



2.4.1 Diseño de primers	57
2.4.2 Extracción de ADN	57
2.4.3 Cuantificación de la concentración y pureza de ADN	61
2.4.4 Reacción en cadena de la polimerasa.....	62
2.4.5 Electroforesis en gel de agarosa.....	67
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIONES	70
3.1 OBJETIVO PARTICULAR 1	70
3.2 Objetivo particular 2.....	70
3.3 OBJETIVO particular 3.....	75
3.4 Objetivo particular 4.....	76
3.5 Objetivo particular 5.....	78
3.6 Objetivo particular 6.....	81
Conclusión.....	96
Glosario	98
Referencias	100
ANEXOS.....	104
Anexo 1.....	104
Anexo 2.....	106
Anexo 3.....	106
Anexo 4.....	108
Anexo 5.....	108



ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA TÍPICA DE LA FRESA	17
FIGURA 2 FOTOPERIODO DE LA FRESA	19
FIGURA 3. PRODUCCIÓN DE FRESA EN MÉXICO	25
FIGURA 4. PRINCIPALES PAÍSES EXPORTADORES DE FRESA	26
FIGURA 5. PAÍSES QUE IMPORTAN FRESA MEXICANA.....	27
FIGURA 6. ESTRUCTURA BÁSICA DE UN GEN CODIFICADOR DE PROTEÍNA.....	37
FIGURA 7. PLANTA DE <i>ARABIDOPSIS THALINA</i>	38
FIGURA 8. PASOS PARA UN CICLO DE PCR	44
FIGURA 9. MATERIAL NECESARIO PARA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.	47
FIGURA 10. ESQUEMA DE AISLAMIENTO DE ADN UTILIZANDO EL SISTEMA DE PURIFICACIÓN DE ADN MAGNÉTICO WIZARD® PARA ALIMENTOS.	59
FIGURA 11. PROGRAMA DE PCR PARA IDENTIFICAR <i>FRAGARIA X ANANASSA</i>	64
FIGURA 12. PROGRAMA DE PCR PARA EL PROMOTOR <i>ARABIDOPSIS THALINA</i>	66
FIGURA 13. PROGRAMA DE PCR PARA EL PROMOTOR CAMV Y EL TERMINADOR T-NOS.	67
FIGURA 14. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA AMPLIFICACIÓN DE DOS MUESTRAS DE FRESA FRESCA.	71
FIGURA 15. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA AMPLIFICACIÓN DE 5 MUESTRAS DE FRESA FRESCA UTILIZANDO PRIMERS DE <i>FRAGARIA X ANANASSA</i>	72
FIGURA 16. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA AMPLIFICACIÓN DE 5 MUESTRAS DE FRESA UTILIZANDO PRIMERS DE <i>FRAGARIA X ANANASSA</i>	73
FIGURA 17. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA AMPLIFICACIÓN DE 5 MUESTRAS DE PRODUCTOS PROCESADOS DE FRESA.).	74
FIGURA 18. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA AMPLIFICACIÓN DE 5 MUESTRAS DE PRODUCTOS PROCESADOS DE FRESA.....	74
FIGURA 19. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PRUEBA DE ESPECIFICIDAD DE PRIMERS DE FRESA.	76
FIGURA 20. <i>ARABIDOPSIS THALINA</i> SEMBRADO EN AGAR NUTRITIVO A 0.5% DESPUÉS DE 7 DÍAS.	77
FIGURA 21. GEL DE AGAROSA AL 2.5% A 60 V PARA LA AMPLIFICACIÓN DE <i>ARABIDOPSIS</i> UTILIZANDO LOS PRIMERS DE <i>ARABIDOPSIS THALINA</i>	78



FIGURA 22. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) PARA ESPECIFICIDAD DE <i>ARABIDOPSIS THALINA</i>	79
FIGURA 23. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA PRUEBA DE ESPECIFICIDAD DEL PROMOTOR CAMV.....	80
FIGURA 24. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA PRUEBA DE ESPECIFICIDAD DEL TERMINADOR T-NOS.....	81
FIGURA 25. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL PROMOTOR CAMV EN MUESTRAS DE FRESA FRESCA.	82
FIGURA 26. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL PROMOTOR CAMV EN CINCO MUESTRAS FRESA FRESCA.....	83
FIGURA 27. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL TRANSGEN CAMV EN CINCO PRODUCTOS DE FRESA.....	84
FIGURA 28. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL TRANSGEN CAMV EN LOS CINCO PRODUCTOS DE FRESA.....	85
FIGURA 29. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL TERMINADOR T-NOS EN MUESTRAS FRESA FRESCA.	86
FIGURA 30. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL TERMINADOR T-NOS EN MUESTRAS DE FRESA FRESCA..	86
FIGURA 31. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL TERMINADOR T-NOS EN CINCO PRODUCTOS DE FRESA.....	88
FIGURA 32. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL TERMINADOR T-NOS EN CINCO PRODUCTOS DE FRESA.....	88
FIGURA 33. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL PROMOTOR <i>ARABIDOPSIS THALINA</i> EN MUESTRAS DE FRESA FRESCA.....	90
FIGURA 34. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL PROMOTOR <i>ARABIDOPSIS THALINA</i> EN MUESTRAS DE FRESA FRESCA.....	90
FIGURA 35. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL PROMOTOR <i>ARABIDOPSIS THALINA</i> EN PRODUCTOS DE FRESA.....	92
FIGURA 36. GEL DE AGAROSA AL (2.5%) A 60 V PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL PROMOTOR <i>ARABIDOPSIS THALINA</i> EN PRODUCTOS DE FRESA.....	92



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. ESPECIES DE <i>FRAGARIA</i> EN EL MUNDO.....	16
TABLA 2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA FRESA.....	18
TABLA 3. VARIEDADES DE FRESA EN MÉXICO.....	20
TABLA 4. PRODUCTORES DE FRESA EN EL MUNDO.....	24
TABLA 5. PRINCIPALES PLAGAS EN LA FRESA.....	28
TABLA 6. PRINCIPALES MALEZAS QUE AFECTAN LA FRESA.....	29
TABLA 7. PRINCIPALES ENFERMEDADES DE LA FRESA.....	30
TABLA 8. CRITERIOS PRINCIPALES A CONSIDERAR PARA LA SELECCIÓN ADECUADA DE PRIMERS....	45
TABLA 9. MATERIAL BIOLÓGICO FRESA FRESCA.....	55
TABLA 10. MATERIAL BIOLÓGICO PRODUCTOS PROCESADOS.....	56
TABLA 11. SECUENCIA DE PRIMERS DISEÑADOS DE <i>FRAGARIA X ANANASSA</i> Y <i>ARABIDOPSIS THALINA</i>	57
TABLA 12. REACTIVOS Y MATERIALES PARA EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE EL KIT.....	58
TABLA 13. REACTIVOS Y MATERIALES PARA EXTRACCIÓN DE ADN.....	60
TABLA 14. REACTIVOS Y MATERIALES PARA CUANTIFICACIÓN DE ADN.....	62
TABLA 15. REACTIVOS Y MATERIALES PARA PCR.....	62
TABLA 16. REACTIVOS PARA LA PCR.....	63
TABLA 17. SECUENCIA DEL PRIMER CAMV Y DEL TERMINADOR T-NOS.....	65
TABLA 18. REACTIVOS PARA PCR DIRECTO.....	65
TABLA 19. REACTIVOS Y MATERIALES PARA ELECTROFORESIS.....	68
TABLA 20. CONCENTRACIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS DE FRESA FRESCA.....	71
TABLA 21. CUANTIFICACIÓN DE ADN PARA PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD.....	75
TABLA 22. CUANTIFICACIÓN DE ADN PARA CONTROLES POSITIVOS DE CAMV Y T-NOS.....	79
TABLA 23. DETECCIÓN DE OGM'S EN FRESA FRESCA.....	93
TABLA 24. DETECCIÓN DE OGM'S EN PRODUCTOS PROCESADOS DE FRESA.....	94
TABLA 25. TEMPERATURAS DE HIBRIDACIÓN DE LOS PRIMERS DE <i>FRAGARIA X ANANASSA</i>	106
TABLA 26. TEMPERATURAS DE HIBRIDACIÓN DE LOS PRIMERS DE <i>ARABIDOPSIS THALINA</i>	108



RESUMEN

México es el tercer exportador de berries siendo la fresa (*Fragaria x ananasa*) la berrie con mayor porción. Sin embargo enfrenta una disminución en la producción por el uso de tecnología inadecuada en la siembra, adicional en la actualidad este tipo de siembra cuenta con varios factores como: la presencia de plagas y enfermedades que limitan su producción que hacen necesario utilizar los avances que ha tenido el mejoramiento genético para formar variedades de fresa de día neutro y día corto con bajos requerimientos de frío. Lo que ha llevado a generar plantas libre de *Fusarium oxysporum* y la tolerancia al complejo viral de la fresa.

El objetivo principal de este trabajo fue aplicar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar organismos genéticamente modificados mediante los primers de los promotores CaMV, *Arabidopsis thaliana* y el terminador T-NOS en fresa transgénica

Se utilizaron 10 muestras de fresa fresca de distinto origen en México y 10 muestras de productos procesados de fresa de otros países la extracción de la muestras de la fresa fresca se llevó a cabo mediante un kit WIZARD® MAGNETIC ADN PURIFICATION SYSTEM FOR FOOD con modificaciones experimentales debido a la composición de la fresa, se diseñaron primers específicos para *Fragaria x ananassa* y para *Arabidopsis* mediante programas bioinformáticos y se seleccionaron los primers a utilizar de CaMV y T-Nos. Se realizó PCR para la identificación de fresa en las diferentes muestras y para detectar organismos genéticamente modificados y los resultados fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y posteriormente visualizados en el trasiluminador.

Los resultados que se muestran más adelante confirman la presencia de organismos genéticamente modificados en los productos procesados de fresa cuya etiqueta no menciona dicha información.



INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria x ananassa*), es un fruto de tipo baya está incluido dentro de la familia Rosaceae, subfamilia Potentilloideae (Baudilio, 1993). Las berries o “frutillas” en los últimos años se han registrado un incremento significativo del volumen cultivado en las distintas zonas productoras del mundo, siendo la fresa la principal berrie exportada por México el cual es el tercer productor mundial de esta, por cada 100 toneladas que se producen en el país, 65 se obtienen en los fresales de Michoacán, entidad líder en el valor de producción 80 con 3 mil 434 millones de pesos en 2017 (SAGARPA, 2018). Por lo que se refiere a las importaciones, pese a que México tiene una importancia relativa en la producción de fresa a nivel mundial y a que exporta un monto considerable de este producto, también tiene una cantidad considerable de importaciones, siendo Estados Unidos el único proveedor de fresa a México (FAOSTAT, 2017).

Este fenómeno se debe a la temporada de baja producción a la que está sometido el cultivo de fresa a campo abierto debido a las temperaturas y horas luz presentadas en el país. El cultivo de fresa en México se da en su mayoría a campo abierto con un total nacional de 6214 hectáreas cultivadas.

La fresa al ser una fruta altamente perecedera se buscan nuevas formas de cuidado o conservación por lo que se están haciendo estudios para su mejoramiento genético (Casal, 2015). Una fresa recién cosechada a temperatura ambiente se deteriora 80% en un lapso aproximado de ocho horas, en esta circunstancia, investigadores buscan desarrollar variedades de fresa para la mejor adaptación de las plantas a las condiciones agronómicas, geográficas y climáticas (Bolívar, 2007).

Sin embargo la planta madre de fresa se importa de Estados Unidos de Norteamérica y al llegar a México se establece en viveros para su reproducción y posterior trasplante en las áreas comerciales donde se desarrollará hasta lograr la producción final, siendo Estados Unidos el país con mayor producción de alimentos genéticamente modificados con un 60% de la producción mundial actual (Avinash, 2018).

Dentro de los productos transgénicos en México encontramos maíz, tomate, algodón, trigo soya y fresa. Esta última ha sufrido modificaciones genéticas de las que destacan el mejoramiento para proporcionar resistencia a insectos, herbicidas, fitopatógenos (hongos, bacterias y virus)



(Sanchez, 2008). Así como a condiciones de estrés, mayor rendimiento y el mejoramiento en la calidad del fruto (Herdandez, 2012).

Actualmente se están tratando de implementar reglas para el uso de los transgénicos y de los organismos genéticamente modificados (OGM's), en Estados Unidos de Norte América, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), ha comenzado a exigir transparencia al consumidor, obligando a las compañías fabricantes a notificar sobre la naturaleza de sus productos. En México la regulación de estos productos la lleva a cabo la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM), este se encarga de establecer las políticas relativas a la seguridad de la biotecnología respecto al uso seguro de los organismos genéticamente modificados (OGMs) (FND, 2017). Al ser una fruta de alto impacto tanto como en exportación como en consumo local en México es importante conocer qué tipo de fresas son producidas en nuestro país, por esta situación en este trabajo se identificará fresa genéticamente modificada en fresas frescas, así como en productos procesados que la contengan y que sean comercializados.



CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES

1.1 Botánica de la fresa

La fresa es considerada una especie hortícola herbácea aunque las raíces funcionales, hojas y otros órganos se forman sobre la parte leñosa de la corona, similar a lo que ocurre en una especie caducifolia. La planta de fresa puede ser considerada como una planta perenne y leñosa de vida corta a la que se le aplican los mismos parámetros fisiológicos de los árboles y arbustos de hoja caduca (Flores, 2010).

Las fresas y los fresones pertenecen a la familia *Rosaceae* y al género *Fragaria* con más de veinte especies y 1,000 variedades. Actualmente en el mundo, *Fragaria x ananassa* es en la práctica la única especie del género *Fragaria* que es cultivada (Baudilio, 1993). Las fresas son varias especies de plantas rastreras del género *Fragaria*, nombre que se relaciona con la (fragancia) que posee (en latín, fraga), cultivadas por su fruto comestible. La fresa es una fruta de forma cónica o casi redonda, de tamaño variable según la especie (de 15 a 22 mm de diámetro), coronada por sépalos verdes, de color rojo y con un sabor que varía de ácido a muy dulce. Lo que más caracteriza a esta fruta es su intenso aroma. (Baudilio, 1993).

La fresa es un fruto de tipo baya con gran importancia económica en todo el mundo. Este género está incluido dentro de la familia Rosaceae, subfamilia Potentilloideae (anteriormente clasificados dentro de la familia Rosidae), teniendo como parientes cercanos a *Duchenea* y *Potentilla* (Manning, 1994). La variedad *Fragaria x ananassa* forma parte regular de la dieta de millones de personas y se cultiva en diferentes regiones del mundo, desde el Ártico hasta los Trópicos. Más de 75 países en el mundo (Hancock, 1999).

El género *Fragaria* incluye 21 especies (Tabla 1) distribuidas en todo el mundo y actualmente, se han caracterizado las especies europeas, americanas y asiáticas (Hancock, 1999). En el caso de *Fragaria x ananassa*, los cultivos actuales de esta especie son el resultado del cruzamiento entre dos especies americanas nativas, *F. chiloensis* y *F. virginiana* Duch (Hancock, 1999).



Tabla 1. Especies de *Fragaria* en el mundo

ESPECIES	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
1. <i>F. bucharica</i>	Oeste del Himalaya
2. <i>F. daltoniana</i> J. Gay	Himalaya
3. <i>F. gracilis</i> A. Los.	Norte de China
4. <i>F. innumae</i> Makino	Japón
5. <i>F. mandshurica</i> Staudt	Norte de China
6. <i>F. nipponica</i> Lindl.	Sureste de Asia
7. <i>F. vesca</i> L.	Japón
8. (Urales), Norte de America	Himalaya
9. <i>F. viridis</i> Duch.	Norte de China
10. <i>F. yezoensis</i>	Europa, Oeste de Asia
	Norte de América
11. <i>F. corymbosa</i>	Europa y Asia
12. <i>F. gracilis</i>	Japón
13. <i>F. moupinensis</i> (French.) Card	Norte de China
14. <i>F. orientalis</i> Losinsk syn.= <i>F. corymbosa</i> Lozinsk	Rusia
15. <i>F. tibetica</i> spec. Nov. Ataudt	China
16. <i>F. x bringhurstii</i> Staudt	California
17. <i>F. moschata</i> Duch.	Siberia
18. <i>F. chiloensis</i>	Norte América
19. <i>F. virginiana</i> Miller	Chile
20. <i>F. x ananassa</i>	Cultivado en todo el mundo
21. <i>F. iturupensis</i> Staudt	Islas Kurile

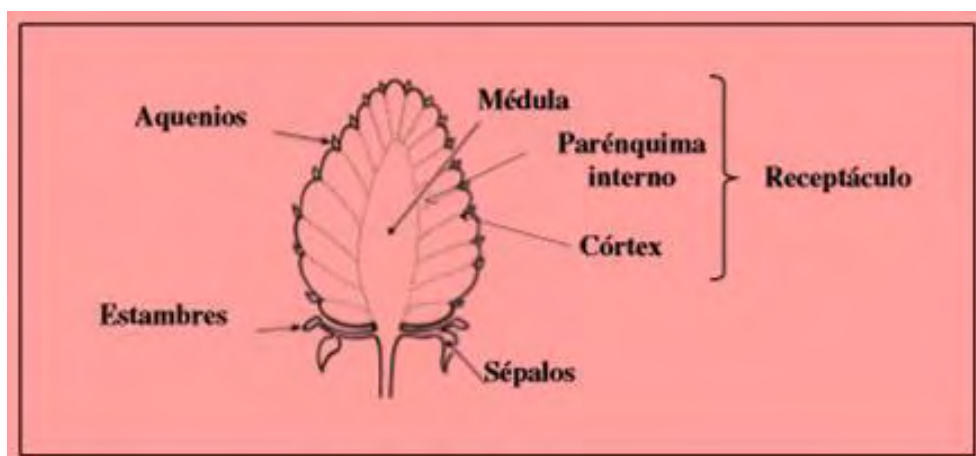
FUENTE: Hancock, 1999.



1.2 Morfología de la fresa

La fresa es una planta herbácea perenne compuesta por diferentes meristemas y cuyo desarrollo viene controlado por la interacción entre la temperatura y el fotoperiodo. La planta de fresa posee un tallo central a partir del cual emergen las hojas trifoliadas y las raíces, que son de tipo fasciculado. Bajo la definición de “frutos blandos” se agrupan varios tipos de bayas. Se trata de frutos pequeños cuyas semillas se encuentran incluidas en un receptáculo (López, 1998).

La fresa se desarrolla a partir de una flor con un gineceo coricárpico (dónde cada carpelo representa un carpido) y en la que el androceo se ha multiplicado de modo secundario por intercalación. A partir de los carpelos se forman frutos monocarpelares indehiscentes (aquenios) que se disponen sobre la superficie del eje floral, el cual adopta un aspecto cónico y una textura carnosa (receptáculo) para dar lugar a un fruto múltiple como se muestra en la Figura 1. Por tanto, la fresa es un fruto que posee una estructura de falso fruto constituido por un receptáculo carnoso en cuyo exterior se encuentran los aquenios (verdaderos frutos) (López, 1998).



FUENTE: Hancock, 1999.

Figura 1. Estructura típica de la fresa

1.3 Composición química de la fresa

La fresa es muy apreciada por su delicado sabor, aroma y por su valor nutricional. El fruto maduro se compone aproximadamente en un 90% de agua y en un 10% de sólidos solubles que incluye numerosos componentes importantes de la dieta como son las vitaminas, minerales, lípidos y aminoácidos como se muestra en la tabla 2 (Hemphill, 1991).



Tabla 2. Composición Química de la fresa

Nutriente	Contenido	Nutriente	Contenido
AGUA	90 %	VITAMINAS	
Proteínas	0.70%	Vitamina C	56.7mg
		Otros	<0.5mg
CHOS	7.0%	LÍPIDOS	0.5%
Fibra	0.5%	Saturados	0.02mg
		Monoinsaturados	0.052mg
		Poliinsaturados	0.186mg
		Colesterol	0
		Fitoesteroles	12mg
MINERALES (MG)		Aminoácidos	522mg
Ca	14mg		
Fe	0.4mg		
P	19mg		
Mg	10mg		
K	166mg		
Na	1mg		
Zn, Cu, Mn	<0.5mg		

FUENTE: Hancock, 1999.

Los principales azúcares solubles de la fresa son la glucosa y fructosa, que constituyen más del 80 % de los azúcares totales y el 40 % del peso total seco (Wrolstad, 2013). La glucosa, la fructosa y la sacarosa son los azúcares solubles que están presentes en el fruto de fresa en todas las etapas de maduración. La glucosa y la fructosa se encuentran casi a concentraciones iguales incrementando de forma continua durante el desarrollo de la fruta y pasando de un 5% en frutas verdes pequeñas a un 6.9% en las bayas de color rojo (Bartz, 2002). Los niveles de sacarosa son generalmente mucho más bajos y muestran una pequeña acumulación cerca del desarrollo de la fruta (Hemphill, 1991). Por otra parte, el ácido orgánico principal del fruto de fresa es el ácido cítrico, que constituye un 88 % de los ácidos totales. La fresa contiene también importantes niveles de ácido eláxico, que posee propiedades anticancerígenas (Bartz, 2002).



1.4 Variedades de fresa

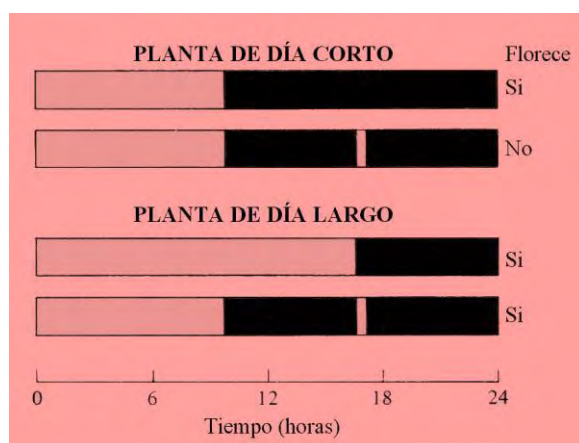
Las variedades de fresa se clasifican de acuerdo a sus requerimientos de horas de luz del día al ser cultivadas (Fotoperiodo), en variedades de día corto y variedades de día neutro; como se muestra en la Figura 2 a producción de las variedades de la fresa depende de las horas de exposición al sol (Barrera, 2003)

- Variedades de día corto

Su inducción floral ocurre cuando los días comienzan a acortarse y las temperaturas medias son moderadas (finales de verano a otoño). Pasan el invierno en reposo y producen concentradamente en primavera, generalmente en los meses de noviembre y diciembre (Barrera, 2003).

- Variedades de día neutro

Su inducción floral ocurre independiente del fotoperiodo (número de horas de luz), las yemas son inducidas en forma permanente, sólo las altas o las bajas temperaturas afectan el fenómeno inductivo. En este tipo de variedades, la producción no es concentrada en primavera, si no que se prolonga desde la primavera hasta el otoño (Barrera, 2003).



FUENTE: Baudilio, 1993.



Figura 2 Fotoperiodo de la Fresa






1.4.1 Variedades de fresa en México

En México se cultivan diferentes variedades, cada una con características específicas; como son los rendimientos, épocas de producción, resistencias a plagas y enfermedades, sabor, color, tamaño, por mencionar algunas. Las variedades se puede expresar de manera diferente dependiendo de la región donde estas se establezcan en la Tabla 3. Se muestran la variedades que se producen en México (Trujillo, 2017).




Tabla 3. Variedades de Fresa en México

Variedad	Fotoperiodo	Generalidades	Imagen
Festival	Día corto	<p>Actualmente es la variedad que más se produce en los estados de Guanajuato, Michoacán y el Estado de México.</p> <p>El fruto mantiene un tamaño mediano (25g aprox. por pieza) a lo largo de la producción.</p>	
Camino Real	Día corto	<p>Plantas pequeñas con un hábito de crecimiento vertical, lo que permite una alta densidad de siembra y facilita las tareas de cosecha.</p> <p>Su fruto es muy resistente al daño por lluvia y no presenta problemas de polinización, es decir, su tasa de deformación es muy baja.</p>	



Camarosa	Día corto	<p>Es la variedad más cultivada desde hace algunos años (representa alrededor del 60% de la producción mundial).</p> <p>Esta variedad produce fruta durante 6 a 7 meses cada año. Su fruto es grande (alrededor de 28-30g), firme, de color rojo oscuro y de forma cónica.</p>	
Sweet Charlie	Día corto	<p>Es una fruta mediana roja excelente sabor producida en otoño-invierno, presenta la ventaja sobre las demás variedades de ser resistente a <i>antracnosis</i>, por lo cual se adapta a las condiciones climáticas.</p>	
Diamante	Día neutro	<p>Planta muy compacta con un hábito de crecimiento vertical, lo que facilita las tareas de cosecha y permite una alta densidad de siembra.</p> <p>Color interno de la fruta es más ligero que otras variedades de día neutral, lo que hace que esta variedad sea más adecuada para el mercado de productos frescos que para la industria de procesamiento.</p>	



Ventana	Día corto	<p>Variedad utilizada principalmente como planta fresca en viveros de altura para producción en invierno y primavera.</p> <p>Las plantas de Ventana son vigorosas, similares a las de Camarosa, pero más erectas, lo cual facilita la recolección.</p>	
Aroma	Día neutro	<p>Su principal característica es su excepcional calidad y buen tamaño de fruta (24-26 gramos por fruto).</p>	
Albión	Día neutro	<p>Muy buena aptitud para mercado fresco, es la variedad que acumula mayor cantidad de azúcar, muy demandada también para congelados. Fruto muy firme, con excelente vida de post cosecha.</p>	

FUENTE: Trujillo, 2017.



1.5 Importancia de la fresa

Las fresas y los fresones son frutas muy poco energéticas, cuyo principal componente después del agua lo constituyen los hidratos de carbono (con una cantidad moderada, alrededor del 7% de su peso), fundamentalmente: fructosa, glucosa y xilitol. (Hemphill, 1991).

También son una buena fuente de fibra. Son muy ricas en vitamina C. Una ración media de fresas, 150 g, contiene 86 mg de vitamina C; mientras que una naranja mediana, de 225 g, contiene 82 mg. Si bien, en cualquiera de los dos casos, las ingestas diarias recomendadas para esta vitamina (60 mg), están más que superadas. Entre los minerales, los más elevados son el hierro y el yodo, seguidos del calcio, fósforo, magnesio y potasio. Además, su bajo aporte en sodio y su alto contenido en potasio hace que estén indicadas en personas con hipertensión arterial (Flores, 2010).

Las fresas contienen diversos ácidos orgánicos, entre los que destacan: el ácido cítrico (de acción desinfectante y alcalinizadora de la orina, potencia la acción de la vitamina C), ácido málico, oxálico, y también contienen pequeñas cantidades de ácido salicílico. Por ello, deben evitarlas aquellas personas que presenten intolerancia a la aspirina (ácido acetyl salicílico) (Hemphill, 1991).

El color de la fresa es debido a unos pigmentos vegetales (flavonoides) conocidos como antocianinas. Éstas actúan como potentes antioxidantes. En este sentido, si tenemos en cuenta que el proceso oxidativo trae como consecuencia el depósito de colesterol en las arterias, y es responsable del envejecimiento y de ciertas mutaciones cancerígenas, se puede decir que las fresas ejercen un importante efecto protector sobre la salud. De hecho, las fresas constituyen una de las frutas con mayor capacidad antioxidante, la cual no sólo se debe a su contenido en antocianinas, sino también a la presencia en su composición de cantidades importante de polifenoles (ácido elágico) y de vitamina C (Baudilio, 1993).



1.6 Producción mundial de la fresa

Conforme a la información de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO a nivel mundial se obtuvo una producción anual en el 2017 de 6'178,152 toneladas de fresa. Los principales productores fueron: China, Estados Unidos de Norteamérica, México, Egipto y España. China el primer lugar con una producción de 1'650,380 toneladas. En este mismo año los 6 principales países productores de fresa a nivel mundial, produjeron un total de 2'462,654 toneladas, lo que representa el 58.94% del total de la producción (FAOSTAT, 2017).

Tabla 4. Productores de Fresa en el mundo

PAIS	PORCENTAJE (%)
China	41.6%
Estados Unidos	15.6%
México	8.2%
Egipto	6.7%
Turquía	6.4%
España	5.6%
Rusia	4.9%
Polonia	3.2%
Corea del sur	2.8%
Japón	2.5%

FUENTE: FAOSTAT, 2017.

1.6.1 Producción de fresa en México

Para México la fresa es una de las cadenas productivas más importantes, esta condición es debido al valor de la producción estimado en poco más de mil 200 millones de pesos, aunado a la generación de un importante número de empleos anuales, situación que posiciona a México como el tercer productor mundial en el 2016 se produjeron 398,287 toneladas y el valor estimado de producción fue de 5,779 millones de pesos. Sin lugar a dudas esta es la berrie con mayor producción y exportación en nuestro país, tan solo en el mercado estadounidense, México participa con el 99.6% del total de las importaciones de ese país (Trujillo, 2017).



Así mismo, del total de la producción que se obtiene en México, el 52.2% está destinado al mercado interno, con lo cual se pueden cubrir en un 100% los requerimientos del país, con un consumo *per cápita* anual de 3.2 kilogramos; mientras que el resto se destina a la exportación, la cual gracias a los altos estándares con los que se cultiva la fresa ha crecido en un 35%, siendo Estados Unidos, Canadá, Brasil, Arabia Saudita y Reino Unido los mayores consumidores con un total de 649.1 millones de dólares al año. Michoacán, Baja California, Guanajuato, Estado de México y Jalisco son los cinco principales estados productores de fresa en México, que en su conjunto, aportan el 99% de la producción total (FND, 2017).



FUENTE: FND, 2017.

Figura 3. Producción de Fresa en México

1.7 Consumo de la fresa

La fresa tiene diferentes mercados de acuerdo al consumo. Así podemos diferenciar cuatro formas de consumo que van a condicionar la demanda de la fresa en términos de calidad, tamaño y presentación. Estos son: la fresa fresca, la fresa congelada y la fresa procesada que posteriormente va a dar origen a nuevos productos (Berumén, 2009).

FRESA FRESCA

Consumo doméstico y consumo comercial. La fresa fresca se busca que sea uniforme, de buen tamaño (3 a 4 cm de diámetro) y buen color (Berumén, 2009).



FRESAS CONGELADAS

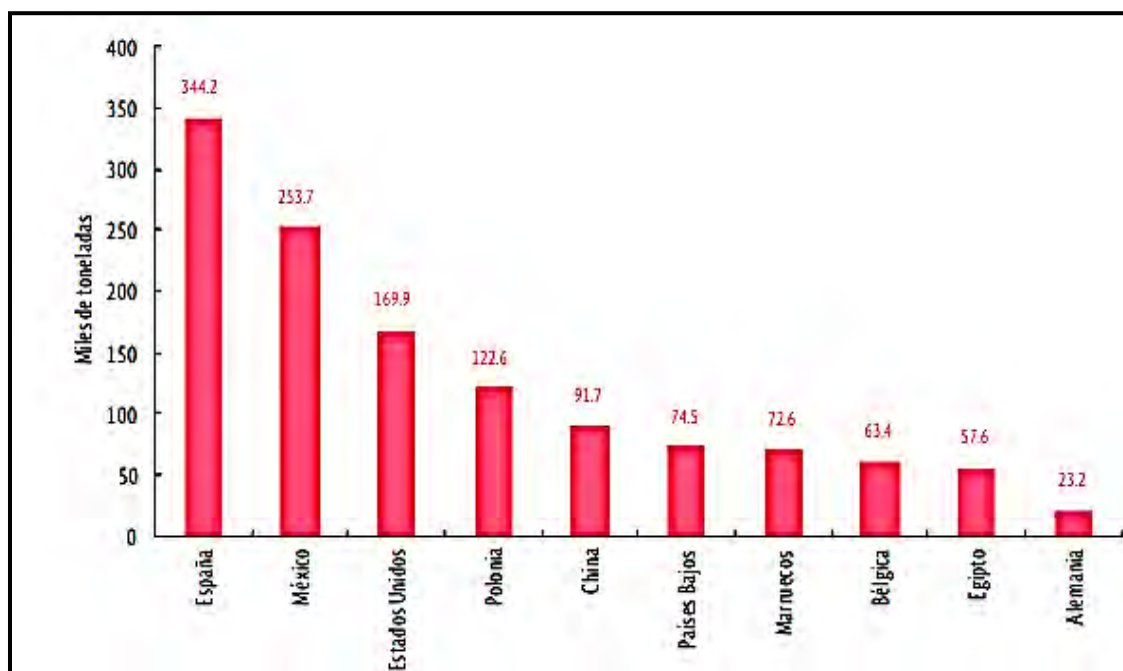
Las fresas congeladas son utilizadas por los comerciantes por dos razones: En primer lugar para poder tener acceso a cierta calidad del producto durante todo el año, asegurando el abastecimiento. En segundo lugar, como materia prima para la industria (Berumén, 2009).

FRESAS PROCESADAS

Debido a las nuevas tendencias del consumidor, la forma de consumo más importante es el de las mermeladas, donde la mayor proporción son las fresas (80% de las mermeladas vendidas en México) y cuya demanda aumenta al ritmo del crecimiento de la población (Berumén, 2009).

1.8 Exportación de la fresa mexicana

México es potencia relevante el comercio exterior de la fresa, ya que se posiciona en el segundo lugar por volumen entre los países exportadores de esta fruta. La cantidad de fresa Mexicana comercializada en el exterior representa el 13.8% del total mundial; en la figura 4 se muestran los países principales que exportan fresa durante el 2017 (SAGARPA, 2018).

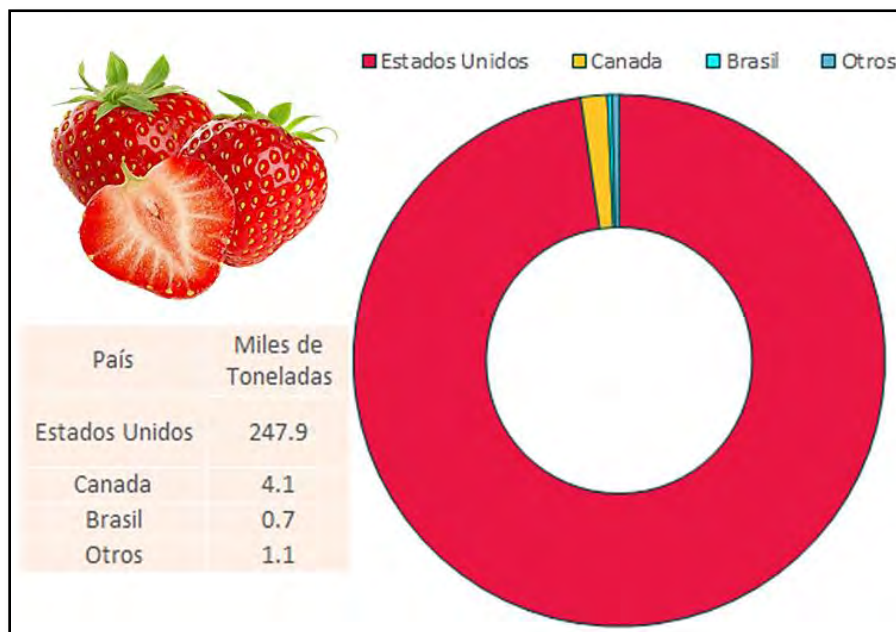


Fuente: SAGARPA, 2018.

Figura 4. Principales países exportadores de Fresa



Durante el 2017 la producción de fresa en México fue de 658,436 toneladas la cuales satisfacen el 100% de requerimientos de producción nacional y las exportaciones representan el 52.60% de la disponibilidad total de fresa en México; en la Figura 5 se muestran los principales países que importan la fresa mexicana (SAGARPA, 2018).



Fuente: SAGARPA, 2018.

Figura 5. Países que importan Fresa Mexicana

1.9 Plagas y Enfermedades

Debido a que las fresas son extremadamente sensibles al ataque de plagas y enfermedades, que además están conformadas por un gran número de microorganismos e insectos, su cuidado y manejo son muy complejos. Las infestaciones que afectan a la fresa pueden clasificarse en plagas, enfermedades, nematodos y maleza (Bianchi, 2018).

1.9.1 Plagas

Los cultivos de fresas son atacados por una variedad de plagas, que van desde ácaros, gusanos, arañas, larvas y pulgones; En la tabla 5 se muestran las principales plagas que atacan las plantas de las fresas (Bianchi, 2018).



Tabla 5. Principales plagas en la Fresa

Nombre	Características	Foto
Araña de dos manchas <i>(Tetranychus urticae)</i>	Se trata de la plaga más abundante en los cultivos de fresa. Los daños principales los ocasionan las ninfas y adultos del ácaro; ya que escarifican y chupan la savia de las hojas por medio de su aparato bucal. Esto hace que las hojas se tornen amarillentas	
Gallina ciega <i>(Phyllophaga spp)</i>	Se trata de un insecto considerado como peligroso. Sus daños son causados por las larvas que pueden llegar a alcanzar los 3 cm y se acomoda en forma de C. El principal daño causado por esta plaga es el deterioro de las raíces en las plantas de fresa, el cual se incrementa durante el período de lluvias por los cambios de temperatura y niveles de humedad.	
Gusano cogollero <i>(Spodoptera frugiperda)</i>	En la época de lluvias las larvas se alimentan de las malezas cercanas al cultivo. El daño es más profundo al cabo de pocos días, se notan rasgaduras en las hojas, lo cual causa retardo en el desarrollo de las plantas.	
Gusano del fruto <i>(Helicoverpa zea)</i>	El principal daño ocasionado por este gusano, lo producen las orugas que se alimentan del fruto contaminándolos, llegando a perforarlos, haciendo surcos y túneles en ellos.	
Trips de las flores <i>(Frankiniella occidentales)</i>	El principal daño a la fresa, es que le produce agarrotamiento al fruto, no se han determinado sus enemigos naturales.	

FUENTE: Bianchi, 2018.


1.9.2 Malezas

Las fresas son muy susceptibles a la competencia con las malezas inmediatamente después de plantar cuando las plantas están pequeñas y el riego frecuente provee las condiciones ideales para



la germinación de las malezas. La mayoría de las malezas en las fresas son anuales en la Tabla 6 se muestran las principales malezas que afectan las plantas de la fresa durante su crecimiento (Bianchi, 2018).

Tabla 6. Principales malezas que afectan la Fresa

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	IMAGEN
Trébol de vaina erizada	<i>Medicago polymorpha</i>	
Trébol amarillo	<i>Melilotus sp</i>	
Afilaria de tallo rojo	Erodium sp.	
Gloria de la mañana	<i>Convolvulus arvensis</i>	
Lechuguilla	<i>Sonchus spp.</i>	
Trébol de vaina erizada	<i>Medicago polymorpha</i>	

FUENTE: Bianchi, 2018.



1.9.3 Enfermedades

Estas enfermedades son causadas por microorganismos patógenos que son frecuentemente hongos y virus. En la tabla 7 se muestran las principales enfermedades que atacan las fresas (Bianchi, 2018).

Tabla 7. Principales enfermedades de la Fresa

ENFERMEDAD	CARACTERISTICAS	IMAGEN
Oidio (<i>Sphaeroteca ssp.</i>)	Este hongo aparece sobre todo con altas temperaturas y a la vez alta humedad producida por el ambiente o por las continuas lluvias , ataca a la planta cubriendo de las hojas por el envés con una especie de vello blanquecío	
Podredumbre Gris (<i>Botrytis cinerea Pers.</i>)	Ataca a los frutos de las fresa se recubre como un polvillo alrededor del fruto, se desarrolla en ambientes con excesiva humedad y se esparce rápidamente por esporas	
Mancha Purpura o Viruela del fresal (<i>Mycosphaerella fragariae</i>)	Hongo causante de esta enfermedad, también conocida como viruela, se ve favorecido en condiciones de alta humedad relativa y temperaturas suaves (15-20°C) aparecen manchas circulares de color rojo finalmente estas manchas se tornan de color blanco o pardo con el borde púrpura	
Bacterias (<i>Xanthomonas fragariae</i>)	Se manifiesta con la presencia de manchas translúcidas de aspecto aceitoso en el envés de las hojas, que conforme avanza la enfermedad, dichas manchas se van uniendo tomando una coloración necrótica.	

FUENTE: Neri, 2016.



1.10 Organismos genéticamente modificados

La Biotecnología es una actividad multidisciplinaria sustentada en el conocimiento básico generado en diferentes disciplinas (biología molecular, ingeniería bioquímica, genómica, bioinformática, ingeniería de proteínas, entre las más importantes) y que tiene un impacto importante en sectores como los de la salud, alimentos, agrícola, pecuario, control de la contaminación y el marino (Bolívar, 2007).

Los organismos genéticamente modificados (OGM) son productos que se obtienen mediante ingeniería genética, y productos de ADN recombinante (ADNr), cuyo material genético ha sido manipulado mediante la incorporación de un gen que exprese un rasgo deseable. El uso de OGM para mejorar el rendimiento del cultivo y reducir los gastos de producción se inició a mediados de la década de los 90. Desde entonces, unas amplias variedades de rasgos se han expresado a través de la biotecnología moderna, incluyendo rasgos que ayudan en el crecimiento de las plantas y los que se supone son en beneficio para los consumidores. Son muchas las variedades de plantas transgénicas aprobadas que se consumen como alimento y que han permitido una reducción importante de las cantidades de pesticidas químicos que se utilizan para eliminar plagas (muchos de estos carcinogénicos y recalcitrantes) y virus. Hoy más de 134 millones de hectáreas se cultivan con plantas transgénicas en 27 países, los organismos transgénicos y sus productos se consumen en más de 50 países hasta ahora por más de 300 millones de habitantes (Bolívar, 2007).

1.10.1 Fresa genéticamente modificada

El cultivo de la fresa en Irapuato comenzó en el año de 1885. Esta herbácea apreciada por su sabor, rica en vitaminas y minerales enfrenta un decrecimiento en la producción por el uso de tecnología anticuada en la siembra, la presencia de plagas y enfermedades, además que los productores deben pagar regalías por usar en sus plantaciones variedades creadas en la Universidad de California. Por esta circunstancia, investigadores nacionales buscan obtener variedades mexicanas que presenten mejor adaptación a las condiciones que prevalecen en el centro del país (Ledesma, 2016).



Desde hace una década, los doctores Alba Estela Jofre y Garfias, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Unidad Irapuato, y Pedro Antonio Dávalos González, adscrito al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), colaboran en el programa de mejoramiento genético de la fresa. El trabajo realizado por el Cinvestav corresponde a hacer la limpieza de los materiales obtenidos en el INIFAP; es decir, de las plantas sobresalientes de las cruzas que realizan (Ledesma, 2016).

En dicho Centro se hace el cultivo de meristemos, que es la parte de la planta de la fresa que se encuentra en división celular activa y de la que producen todos los tejidos nuevos, tanto las hojas y las flores, que al ser polinizadas producen los frutos e hijuelos que generan nuevas plantas. A partir de los meristemos se inducen cultivos de brotes, de los que, por multiplicaciones sucesivas se genera el número de plantas que se requiera. De manera posterior, los brotes obtenidos son transferidos a otro medio de cultivo para que se produzcan raíces, y una vez llegado ese punto son transferidas al suelo en un invernadero para su aclimatación (Ledesma, 2016).

Muchas plantas son susceptibles a enfermedades causadas por patógenos del floema limitado. Una serie de promotores vasculares específicos se ha estudiado en diferentes especies. Una proteína sacarosa transportador plasmático-m es esencial para el transporte de largas distancias de sacarosa y se expresa específicamente en las células acompañantes del floema. Un promotor de *Arabidopsis* sacarosa gen transportador 2 (AtSUC2) dirigió la expresión de GUS específicamente en el floema de las hojas, pecíolos y raíces de las fresas (*Fragaria × ananassa*) y puede ser utilizado para la ingeniería del cultivar de fresa transgénico resistente a fitoplasmas (Ledesma, 2016).

1.10.2 Creación de plantas genéticamente modificadas

En general, para introducir el material genético en el genoma de la planta implica transferir el gen responsable de la expresión del carácter de interés y la secuencia que promueva la expresión de dicho gen. Habitualmente, primero se aísla el gen de interés (que regula la resistencia a los insectos, el color del grano, etc.), se identifican las secuencias o regiones de genes que acompañarán al gen en cuestión y que le ayudará en su expresión en el individuo huésped en el momento y lugar adecuados; estos elementos regulatorios se llaman promotores (Anderson,



2011).

Esta secuencia que suma a los promotores con el gen y, por lo tanto, que hará la transformación, se deberá multiplicar en millones de copias que posteriormente se cultivan y se dividirán rápidamente en grandes cantidades. El principal vehículo que se utiliza para clonar las construcciones son las bacterias (Lepage, 2012). La creación de las plantas transgénicas puede realizarse por varias técnicas las más comunes son:

- Transformación genética con *Agrobacterium tumefaciens*: Se trata de una bacteria del suelo muy común que infecta a las plantas de forma natural, mediante la inserción natural de un segmento de ADN (plásmido Ti) de la propia bacteria al genoma de la célula huésped. El segmento insertado se integra en el genoma de la planta infectada promoviendo la división celular sin control y originando el tumor. Los científicos han utilizado este método para transformar plantas y crear transgénicos resistentes a insectos dañinos para los cultivos, pero respetando la vida de la mariposa Monarca y otros polinizadores (Anderson, 2011).
- Microinyección: Acción física de introducir el gen de interés en la célula huésped inyectando la construcción genética dentro del núcleo de la célula receptora o de un protoplasto por medio de una aguja microscópica de vidrio (Anderson, 2011).
- Electroporación: Aplicar pulsos de electricidad que ocasionan cierta permeabilidad temporal en la membrana de las células huéspedes y en su núcleo, lo que permite la entrada de la suspensión que contiene miles de copias de la construcción que se pretende introducir (Anderson, 2011).
- Biobalística: Es un método muy común consistente en preparar microproyectiles que se impregnan en la solución que contiene la construcción y se bombardean las células dentro de una cámara al vacío (cañón o acelerador de partículas). Estos microproyectiles penetran las células suspendidas en un medio de cultivo; el ADN entra en solución y se promueve la inserción del material genético a los cromosomas de la célula en forma aleatoria (Anderson, 2011).



1.10.3 Características deseadas en las plantas genéticamente modificadas

La construcción de este tipo de plantas permite desarrollar nuevas variedades de cultivo con nuevas características de interés. Con las nuevas técnicas se han obtenido plantas resistentes a organismos perjudiciales y por lo tanto más productivos y se están desarrollando nuevas variedades que resulten más nutritivas (Casal, 2015).

Plantas resistentes a microorganismos patógenos

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

Plantas resistentes a bacterias

Al igual que antes, la transformación de células vegetales por la entrada de genes procedentes de otras plantas e incluso de insectos o de animales, permite la expresión de proteínas (como la cercopina B o la sarcotoxina, etc.) que confiere resistencia a algún tipo de bacteria (Ferri, 2003).

Plantas resistentes a hongos

Se sigue la misma estrategia y mediante genes de distintas procedencias se introducen genes capaces de expresar proteínas (denominadas proteínas de respuesta) con actividad enzimática que degradan la pared del hongo y provocan su muerte.

También se han ensayado genes capaces de producir proteínas con acción tóxica para los hongos, como es el caso de tioninas u osmotinas (Ferri, 2003).

Plantas resistentes a insectos

El ataque por insectos representa uno de los aspectos más importantes del cultivo vegetal. Son numerosas las plagas de todo tipo de plantas producidas por las fases larvarias de muchos insectos o por los individuos adultos. Su interés es enorme desde el punto de vista económico y social en países subdesarrollados (Ferri, 2003).



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

De igual forma se pueden obtener plantas resistentes a insectos incorporando genes que dan lugar a proteínas que inhiben enzimas digestivas de los insectos. Así se han conseguido plantas de tabaco y arroz resistentes a insectos (Rodríguez Ferri, 2003).

Plantas resistentes a herbicidas

Las malas hierbas son un factor negativo en la producción vegetal de muchísima importancia económica, se ha estimado que el 10% de las cosechas a nivel mundial se pierden por la contaminación de los cultivos vegetales con malas hierbas (Rodríguez Ferri, 2003).

1.10.3 Beneficios y riesgos de plantas genéticamente modificadas

El uso de los organismos transgénicos debe hacerse a partir de un riguroso análisis de los riesgos que puedan representar para el medio ambiente, la biodiversidad y la salud humana. El análisis de riesgo es una técnica aplicada en muchas áreas diferentes con el propósito de prevenir y minimizar efectos adversos y abarca tres etapas: evaluación, manejo y comunicación del riesgo. La evaluación de los riesgos derivados del uso de OGMs debe considerar distintos ámbitos, particularmente el medio ambiente y la salud humana. Aunque comúnmente no se evalúan explícitamente los riesgos relacionados con actividades socioeconómicas y culturales, éstos también pueden jugar un papel importante en la toma de decisiones (Ferri, 2003).

Algunos de los factores que van a influir en los niveles de riesgo se relacionan con la modificación genética y cómo se llevó ésta a cabo, con el organismo modificado y con el ambiente en donde se pretende liberar. Por lo anterior el análisis de riesgo debe hacerse “caso por caso” y “paso por paso”, considerando en todo momento el trinomio “modificación genética, organismo receptor y medio ambiente de liberación” (Sanchez, 2008).



1.10.4 Promotores y terminadores

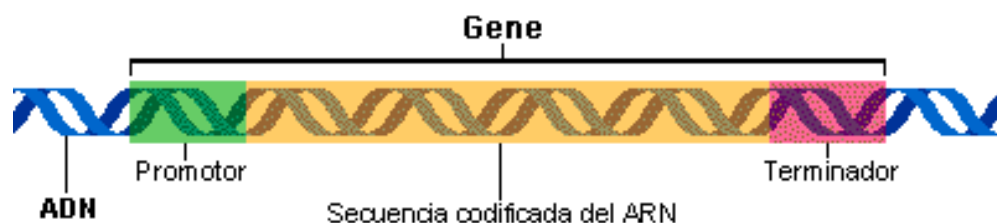
El promotor de un gen es una región del ADN con unas características especiales que determina el punto en el que la ARN polimerasa comienza a transcribir un gen. Las características del promotor también influyen en la eficiencia de la transcripción. Esta región incluye las secuencias de unión a factores de transcripción y a otros elementos que participan en la transcripción y, un terminador es una sección de la secuencia de ácido nucleico que marca el final de un gen en el ADN genómico durante la transcripción como se muestra en la Figura 7 (Bolívar, 2007).

Para la transformación de plantas genéticamente modificadas se han insertado secuencias promotoras y terminadoras que permitan a la planta expresar el gen de interés. Uno de los promotores más utilizados es el virus mosaico de la coliflor (CaMV) (Bolívar, 2007).

El promotor 35S CaMV es un promotor funcional, bien caracterizado y constitutivamente expresado. Por lo que se ha incorporado en numerosas construcciones y utilizado para producir muchos de los cultivos transgénicos que se encuentran en la producción comercial, tales como maíz, soja, canola y papaya. Del mismo modo el sitio de poliadenilación de ARN (que indica el final de la transcripción) de la secuencia de *Agrobacterium tumefaciens*, el gen de la nopalina sintasa (T-Nos) ha servido como un sitio de poliadenilación en algunas de las mismas construcciones (Holden, 2010).

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

El promotor CaMV 35S es el más utilizado para transformaciones de plantas. Es eficaz en conducir la expresión del transgén en ambos dicotiledóneas y monocotiledóneas. En general, se considera que es un promotor constitutivo, sin embargo, algunos informes sugieren que no se expresa en todos los tipos de células y tejidos (Holst et al., 2012).



Fuente: Bolivar, 2007.

Figura 6. Estructura básica de un gen codificador de proteína

1.10.5 *Arabidopsis* como promotor

Los virus, considerados entidades no celulares compuestos de ácidos nucleicos y proteínas, representan a los agentes fitopatogénicos más devastadores que se conocen porque no existe ninguna medida de control efectiva contra su ataque. Por esta razón, se piensa que el control de las enfermedades virales será el campo donde la ingeniería genética de plantas puede tener su mayor impacto. El uso de genes virales y su introducción en plantas ha permitido el desarrollo de resistencia, lo cual se conoce como resistencia derivada del patógeno, y este fenómeno ha sido explicado considerando que la planta reconoce un exceso en la expresión de los genes virales introducidos y evita su expresión, impidiendo además la infección por el virus de la cepa utilizada y cepas relacionadas (Bolivar, 2007).

La sequía, salinidad y el frío son los factores abióticos más importantes que disminuyen la producción agrícola. Una de las estrategias para incrementar la tolerancia a tal estrés es la producción de compuestos osmoprotectores (osmolitos), tales como azúcares, alcoholes, aminoácidos y compuestos cuaternarios de amonio (*glicinbetaína*), los cuales incrementan el potencial osmótico de la célula y estabilizan membranas y estructuras macromoleculares. Algunas especies vegetales producen estos osmolitos debido a que están naturalmente adaptadas a crecer en condiciones de sequía, alta salinidad o bajas temperaturas; sin embargo, muchas de las plantas cultivadas de importancia económica no acumulan suficiente cantidad de compuestos osmoprotectores que les permitan ser tolerantes al estrés, por lo que se han hecho esfuerzos encaminados a la producción de plantas transgénicas con un incremento en la producción de osmolitos. La *glicinbetaína* ha sido producida en plantas de tabaco y *Arabidopsis*, transformadas con un gene bacteriano y muestran una mejor tolerancia al estrés producido por NaCl y frío. Además, en tabaco se ha logrado la sobreproducción del azúcar trehalosa y se ha obtenido un



incremento en la tolerancia a la sequía. Otros osmolitos, tales como el manitol han sido sobreproducidos en *Arabidopsis*, y se observa un mejoramiento en la germinación de las semillas en condiciones de alta salinidad (Bolívar, 2007).

Plantas de *Arabidopsis* transformadas que sobreproducen el transportador Na^+/H^+ muestran un crecimiento sostenido en suelos con concentraciones de NaCl de hasta 200mM. Recientemente (desde el año 2001) se han producido plantas de tomate sobreproductoras del transportador Na^+/H^+ de *Arabidopsis*, las cuales son capaces de crecer, florecer y producir frutos en la presencia de altas concentraciones de sal (200 mM), y además de preservar la calidad del fruto, ya que éstos muestran un contenido bajo de sodio. En condiciones de estrés abiótico, los mecanismos de tolerancia que permiten el crecimiento de una planta bajo esas condiciones desfavorables, involucran el establecimiento de cambios bioquímicos y celulares, que requieren la participación coordinada de muchos genes. Esta expresión orquestada de genes está controlada por factores de transcripción. La manipulación de los factores de transcripción, que regulan la expresión de genes de tolerancia al estrés abiótico es, por ende, una estrategia muy prometedora para la generación de plantas con mayor tolerancia al frío y a la sequía (Bolívar, 2007).



Fuente: Casal, 2015.

Figura 7. Planta de *Arabidopsis thaliana*

1.10.6 Regulación de alimentos genéticamente modificados en México

Como elemento central de la bioseguridad está la adopción de medidas para la protección a la salud y al ambiente, derivadas del manejo y liberación de Organismos Genéticamente



Modificados (OGM). Precisamente, la normatividad jurídica se aplica principalmente en los rubros de salud humana, animal, vegetal y ambiente (SEMARNAT, 2018).

Las autoridades competentes en materia de bioseguridad son la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y la Secretaría de Salud (SSA) (Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, LBOGM, Art. 10). Los titulares de dichas Secretarías, junto con los de las Secretarías de Educación Pública (SEP), Economía (SE), Hacienda y Crédito Público (SHCP), así como el Director General del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) integran la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (SEMARNAT, 2018).

NORMATIVIDAD VIGENTE EN MATERIA DE BIOSEGURIDAD (CIBIOGEM, 2018)

• Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados

Esta Ley tiene por objeto regular las actividades de utilización confinada, liberación experimental, liberación en programa piloto, liberación comercial, comercialización, importación y exportación de organismos genéticamente modificados, con el fin de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que estas actividades pudieran ocasionar a la salud humana o al medio ambiente y a la diversidad biológica o a la sanidad animal, vegetal y acuícola (SEMARNAT, 2018).

• Reglamento de la Ley Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados

El Reglamento, al igual que lo dicta la Ley, establece que el otorgamiento de permisos para realizar liberaciones se debe basar en los principios de caso por caso y paso por paso; así que el Reglamento no “permite” ni prohíbe, a priori, la siembra de maíz modificado genéticamente o cualquier otro cultivo transgénico (SEMARNAT, 2018).

• Acuerdo por el que se determinan Centros de Origen y Centros de Diversidad Genética del Maíz:

Establece las disposiciones jurídicas relativas a la bioseguridad necesarias para resolver las



solicitudes de liberación de maíces GM: prevención, monitoreo, inspección, vigilancia y medidas de control. No permitir la experimentación ni la liberación al ambiente de maíces GM que contengan características que impidan o limiten su uso o consumo humano o animal, o bien su uso en procesamiento de alimentos para consumo humano (SENASICA, 2018).

Normas oficiales mexicanas en materia de bioseguridad

- Norma Oficial Mexicana NOM-164-SEMARNAT/SAGARPA-2013, Que establece las características y contenido del reporte de resultados de la o las liberaciones realizadas de organismos genéticamente modificados, en relación con los posibles riesgos para el medio ambiente y la diversidad biológica y, adicionalmente, a la sanidad animal, vegetal y acuícola (SEMARNAT, 2018).
- Norma Oficial Mexicana NOM-001-SAG/BIO-2014, Especificaciones generales de etiquetado de organismos genéticamente modificados que sean semillas o material vegetativo destinados a siembra, cultivo y producción agrícola (SEMARNAT, 2018).

1.10.7 Regulación de alimentos genéticamente modificados internacionales

Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la Biotecnología (Protocolo de Bioseguridad):

El Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología es un acuerdo adicional al Convenio sobre la Diversidad Biológica. Su finalidad es garantizar la transferencia, manipulación y utilización seguras de los organismos vivos modificados (OVM) resultantes de la biotecnología moderna que puedan tener efectos adversos para la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana, El Protocolo establece procedimientos para regular la importación y exportación de OVM de un país a otro. (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2011).

El Protocolo de Nagoya—Kuala Lumpur Suplementario sobre Responsabilidad y Compensación refuerza el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología. El Protocolo Suplementario especifica las medidas de respuesta que se deben adoptar en el caso de daños a la diversidad biológica resultantes de los OVM. La autoridad competente de una Parte en el



Protocolo Suplementario debe requerir a la persona que tenga el control del OVM (operador) que adopte las medidas de respuesta, o puede aplicar dichas medidas por sí misma y recuperar del operador los costos incurridos (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2011).

El Protocolo de Nagoya—Kuala Lumpur Suplementario sobre Responsabilidad y Compensación es un tratado destinado a complementar el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología proporcionando normas y procedimientos internacionales en la esfera de la responsabilidad y compensación por daños a la diversidad biológica resultantes de los organismos vivos modificados (OVM). El Protocolo de Nagoya—Kuala Lumpur Suplementario se centra, principalmente, en los procedimientos y requisitos administrativos respecto a las medidas de respuesta que se deben tomar en el caso de daños causados por OVM que afecten adversamente a la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica, tomando también en cuenta los riesgos para la salud humana (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2011).

1.11 Métodos de detección de ADN

Los métodos analíticos basados en la detección de ADN suelen emplearse cuando el alimento ha sido procesado o bien tratado fisicoquímicamente (calor, presión, etc.), ya que la proteína puede haberse desnaturalizado o degradado en el proceso, y los métodos analíticos de proteína se ven afectados por estos cambios (López, 2003).

El ADN, en cambio, puede haberse fragmentado durante el proceso en trozos pequeños pero ello no implica necesariamente que no puedan ser detectados. Aunque el ADN también se degrada durante la esterilización por calor en el proceso de enlatado de alimentos, aún es posible obtener pequeños fragmentos con suficientes diferencias de secuencia como para hacer posible la diferenciación entre especies cercanas (López, 2003).

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



Las ventajas de los marcadores de ADN frente a los marcadores proteicos; es que el ADN es más termoestable que la mayoría de las proteínas, por lo que es menos susceptible a ser degradado durante el procesamiento de los alimentos, aún degradado parcialmente permite identificar diferencias; las técnicas con marcadores de ADN son más sensibles; por último están presentes en la mayoría de las células de un organismo, y en principio con la misma información independientemente del tejido (López, 2003).

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

1.11.1 Reacción en cadena de la polimerasa

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

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método para amplificar un fragmento de ADN in vitro. Se basa en la capacidad de la enzima ADN polimerasa para sintetizar una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra de molde ofrecida. La PCR implica ciclos repetitivos de desnaturalización de la plantilla seguida de síntesis de ADN. Este proceso tan poco como una sola copia de un gen se puede amplificar a varios millones de copias en un corto período de tiempo. (Pérez et al., 2008).



1.11.2 Etapas de la reacción

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

Desnaturalización

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

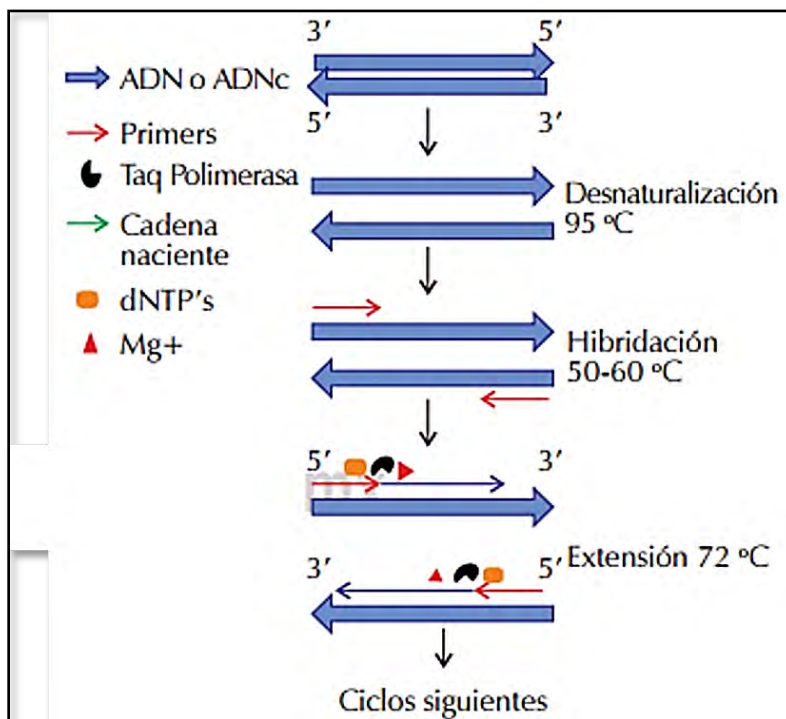
Hibridación

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

Extensión

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

La temperatura óptima para la reacción es de 72°C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado las amplificaciones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador (Tamay de dios et al., 2013). En la figura 8 se esquematiza los pasos para realizar la técnica de la reacción de la cadena de la polimerasa.



Fuente: Tamay de dios et al., 2013.

Figura 8. Pasos para un ciclo de PCR

1.11.3 Componentes de la PCR

ADN Polimerasa

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

Taq polimerasa

La Taq polimerasa de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* resiste los 94-96°C requeridos para la desnaturalización del ADN y solo es necesario añadirla en el comienzo del procedimiento de la PCR, por lo que ha reemplazado el uso del fragmento Klenow de *E. Coli*. La temperatura óptima para la Taq polimerasa es de 72 °C, aun cuando puede ser observada una actividad



significativa a temperaturas tan bajas como 55 °C. (Tamay de dios et al., 2013).

Desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's)

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

Primers

Los oligonucleótidos iniciadores o primers son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN. La selección de oligonucleótidos iniciadores es muy importante en la reacción en cadena de la polimerasa (Cortazar, 2004). Se debe tener información de la secuencia que rodea el fragmento de interés para tener las consideraciones de los primers a utilizar y puedan amplificar correctamente en la PCR. En la tabla 8 se tienen las principales consideraciones para el diseño de primers

Tabla 8. Criterios principales a considerar para la selección adecuada de primers

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

Fuente: Cortazar, 2004.



Las concentraciones óptimas de los primers son generalmente entre 0.1 y 0.5 μM . Altas concentraciones de primer pueden acumular producto no específico (Cortázar y Silva, 2004). El tipo de primer o cebador que se utilice en la PCR dependerá del tipo de identificación que se requiera, para ello se utilizan primers específicos. Si un primer es demasiado corto puede ser complementario a múltiples genes y puede unirse específicamente a una región inapropiada del ADN. Un primer debe de ser de por lo menos de 17 bases de longitud para evitar que se una a una región no deseada. Para una mayor estabilidad para la PCR generalmente son de 20 nucleótidos de longitud. El incremento en la longitud puede afectar la movilidad y el tiempo para unirse al ADN blanco (Tamay de dios et al., 2013).

Por lo general la cantidad de G-C no debe de ser más del 55% de la secuencia, si no se respetan estas reglas, existe la posibilidad de la formación de dímeros de primers es decir, de productos inespecíficos (Tamay de dios et al., 2013).

1.11.4 Análisis de un producto de PCR

La manera más común de evaluar si se logró una amplificación exitosa es a través de la visualización del fragmento amplificado mediante electroforesis en geles de agarosa o acrilamida (se recomienda cargar el 50% del volumen del control negativo con el objetivo de visualizar cualquier amplificación que nos pueda dar indicio de una probable contaminación de los reactivos de PCR. En caso de que no haya producto amplificado o que éste tenga un bajo rendimiento, se recomienda cambiar las condiciones de la PCR (temperatura y concentraciones de los reactivos), así como supervisar el correcto funcionamiento del termociclador (Rentería et al., 2014).

El hecho de que las moléculas de ADN obtenidas al finalizar la reacción en cadena correspondan efectivamente al fragmento de interés queda asegurado por la intervención de los primers que definen los extremos “derecho” e “izquierdo” de ese fragmento. Así, una vez que la reacción ha finalizado, el tamaño del fragmento multiplicado puede determinarse sometiendo los productos de la reacción a una electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, es decir, a un proceso de separación por difusión bajo la acción de un campo eléctrico (Rentería et al., 2014).

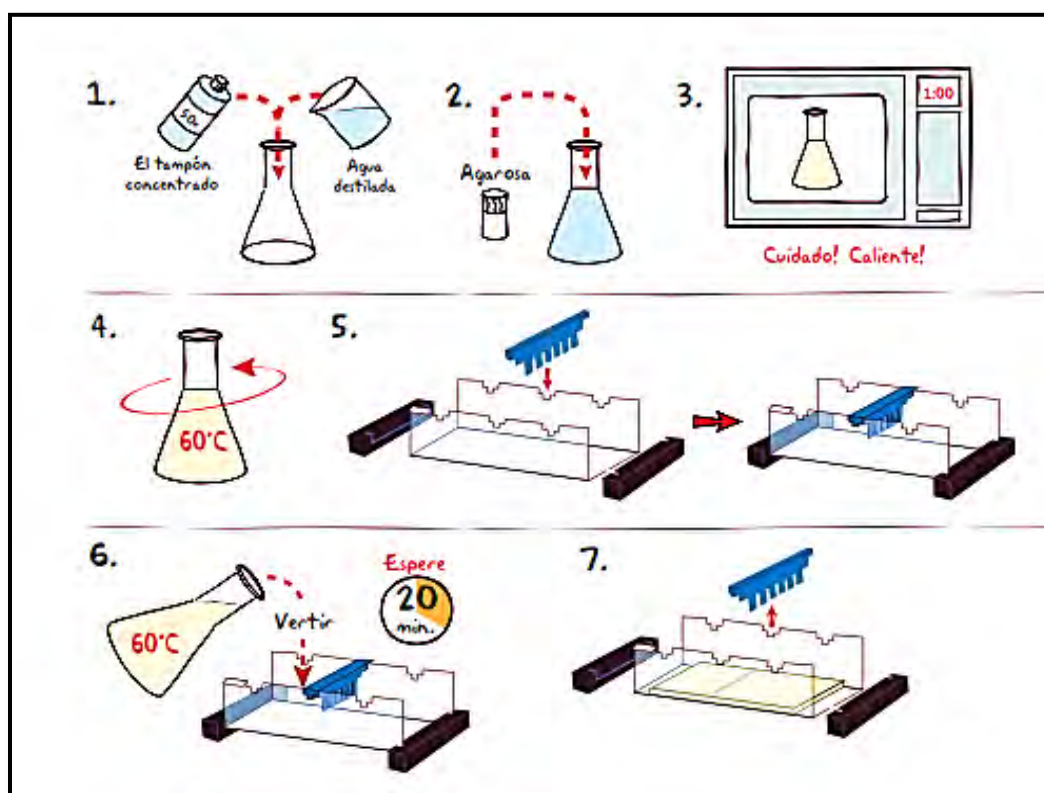
Las muestras colocadas sobre el gel y sometidas a la acción de un campo eléctrico



(electroforesis) migran de una manera característica que se puede visualizar por tinción (Coloreado) del ADN con bromuro de etidio, el cual actúa como intercalante y al ser analizado bajo la luz UV emite una fluorescencia naranja (Cortazar, 2004).

El material necesario para la electroforesis en gel de agarosa consiste en una caja de gel de electroforesis y una bandeja de colada de gel, peines de gel (utilizados para fabricar pozos de carga o ranuras) (Figura 9), un horno de microondas o una placa caliente y una fuente de alimentación de electroforesis (Podzorski et al., 2006).

Los dos tampones de electroforesis más utilizados (tampones en ejecución) para electroforesis en gel de agarosa son Tris-acetato con EDTA (TAE) y Tris-borato con EDTA (TBE). El pH de ambos tampones es mayor que 7, lo que significa que el esqueleto de fosfato del ADN tiene una carga neta negativa y migra hacia el ánodo durante la electroforesis Podzorski et al., 2006).



Fuente: Padilla, 2016.

Figura 9. Material necesario para electroforesis en gel de agarosa.



Sugerencias para mejorar la amplificación

1. Fidelidad y especificidad

- Seleccionar una enzima con actividad 3'-5' exonucleasa.
- Utilizar iniciadores con más de 15 nucleótidos.
- Incrementar la temperatura de alineamiento.
- Reducir el tiempo de desnaturalización y alineamiento en el ciclo.
- Reducir la concentración de iniciadores.
- Reducir el número de ciclos.
- Reducir la concentración de Mg²⁺.
- Revisar que el termociclador funcione adecuadamente (Cortazar, 2004).

2. Eficiencia de amplificación

- Incrementar la concentración de dNTPs y enzimas.
- Usar en concentración baja algún aditivo.
- Reducir el tamaño del fragmento que se desea amplificar.
- Confirmar que los iniciadores no forman dímeros (Rentería et al., 2014).

1.11.5 Contaminación en la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica altamente sensible y específica, por lo que es muy importante evitar contaminaciones que puedan dar origen a la amplificación de ADN no deseado (Tamay de dios et al., 2013).

La contaminación con ADN extraño puede solucionarse con protocolos y procedimiento que separan las reacciones pre-PCR (mezcla de todos los componentes de la reacción), del ADN molde. Esto normalmente implica la separación espacial de las áreas de la realización de la PCR de los análisis o purificación de los productos, así como la limpieza exhaustiva de la superficie de trabajo entre la realización de una PCR y el siguiente (Tamay de dios et al., 2013).

1.11.6 Aplicaciones de la PCR

La PCR es la técnica más importante en la biología molecular porque con ella se ha logrado la simplificación e innovación de muchas técnicas moleculares que permiten abordar nuevas líneas de investigación en diferentes ramas de la ciencia como biotecnología, ecología, evolución,



biología de la conservación, arqueología, patología, medicina forense, entre otras (Cortazar, 2004).

Antes del desarrollo de la PCR las técnicas de biología molecular eran muy onerosas y sólo eran posibles cuando se obtenían numerosas copias del ADN por clonación. La PCR convirtió en una rutina la aplicación de estas técnicas, como es el caso de la secuenciación genética, permitiendo la lectura completa del genoma humano, así como de muchos organismos que se toman como modelos en la investigación de distintos problemas biológicos (Cortazar, 2004).

1.11.7 Ventajas y desventajas

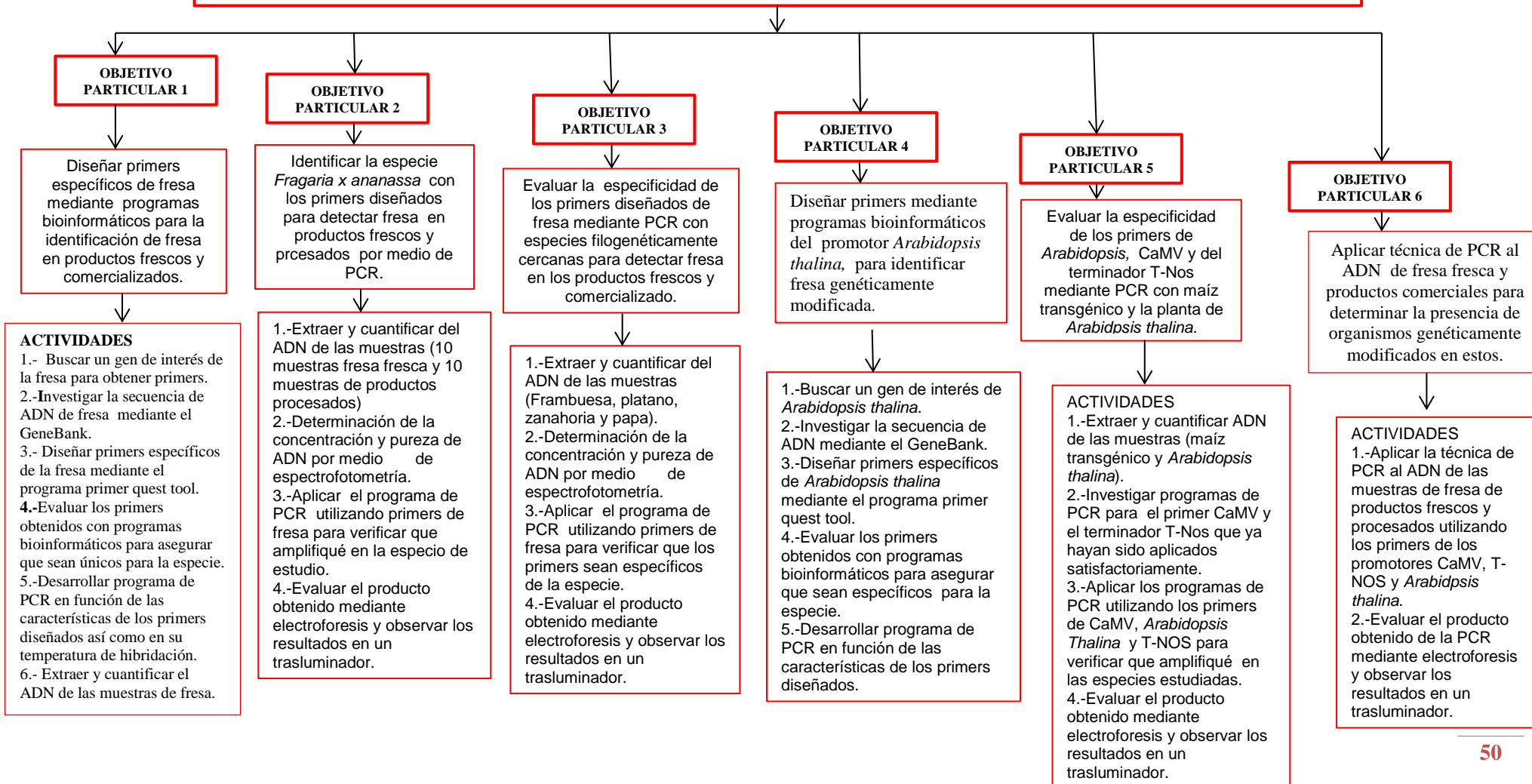
La principal ventaja de la PCR es que permite generar millones de copias de la región de interés a partir de una o muy pocas copias del ADN molde. Es una técnica muy robusta debido, en gran medida, a la gran capacidad de los oligonucleótidos (en este caso de los iniciadores) de unirse firme y específicamente a sus secuencias complementarias de ADN discriminando fácilmente entre centenares de millares de sitios. La principal desventaja es la necesidad de estandarizar la técnica para el organismo o la técnica de interés, lo cual puede ser tardado y costoso (Rentería et al., 2014).



CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 Cuadro metodológico

Objetivo General: Identificar Fresa genéticamente modificada mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los primers de los promotores CaMV, T-nos y *Arabidopsis thalina*.





2.2 Justificación

Actualmente se están tratando de implementar reglas para el uso de los transgénicos y de los organismos genéticamente modificados (OGMs), en Estados Unidos de Norte América la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), ha comenzado a exigir transparencia al consumidor, obligando a las compañías fabricantes a notificar sobre la naturaleza de sus productos. En México la regulación de estos productos la lleva a cabo la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM), este se encarga de establecer las políticas relativas a la seguridad de la biotecnología respecto al uso seguro de los organismos genéticamente modificados (OGMs). Dentro de los productos transgénicos cultivados en México encontramos maíz, tomate, algodón, trigo, soja y fresa. Esta última ha sufrido modificaciones genéticas de las que destacan el mejoramiento para proporcionar resistencia a insectos, herbicidas, y Fitopatógenos (Herdandez, 2012).

En el 2017 se registró una superficie cultivada de fresa de 18,249 hectáreas obteniéndose una producción de 658,436 toneladas métricas, con un valor de producción superior a los 2,102 millones de pesos, por lo que alcanzó un rendimiento promedio de 36.08 toneladas por hectárea. En México se cultivan diferentes variedades, cada una de ellas con características específicas y rendimientos diferentes (SAGARPA, 2018). La planta madre de fresa se importa de Estados Unidos de Norteamérica y al llegar a México se establece en viveros para su reproducción y posterior trasplante en las áreas comerciales donde se desarrollará hasta lograr la producción final. Entre las variedades más cultivadas en México se encuentran la “Festival”, la “Sweet Charlie” y la “Galexia” procedentes de la universidad de Florida, las variedades “Camino Real”, “Albión”, “Camarosa”, “Aromas”, “Ventana” y “Diamante” desarrolladas por la universidad de California (Herdandez, 2012).

En México esta fruta es apreciada por su sabor y riqueza en vitaminas y minerales, sin embargo enfrenta una disminución en la producción por el uso de tecnología arcaica en siembra, tradicional en la actualidad este tipo de siembra cuenta con varios factores como: la presencia de plagas y enfermedades, investigadores nacionales buscan obtener variedades mexicanas que presenten mejor adaptación a las condiciones que prevalecen en el centro del país y los plaguicidas utilizados ahí son muy fuertes es necesario que la fresa sea resistente a ellos por lo cual se está creando fresa



modificada genéticamente para que pueda resistir a este fuerte plaguicida (Herdandez, 2012).

Por lo tanto en este trabajo se realizara PCR para identificar fresa genéticamente modificada en diferentes productos comerciales existentes en México como mermeladas y yogurts así como en fresas frescas a la venta Con diferentes promotores y terminadores ya que un 96.5% de los consumidores mexicanos ignora qué son los transgénicos o no sabe si los está comiendo y en qué alimentos.

De acuerdo con la Organización de Naciones Unidas, el derecho a la información es el primer derecho básico de los consumidores. Este derecho no está garantizado por la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados vigente en México que sólo obliga a informar sobre los transgénicos que sean “nutrimentalmente distintos de forma significativa”. Esta característica es vaga y discutible por lo que la industria puede usar esta imprecisión para evadir su obligación de informar al consumidor así con este trabajo se podrá detectar si los productos que contienen fresa y son comercializados en México contienen organismos genéticamente modificados que no son reportados por las empresas que las elaboran.

2.3 Descripción de cuadro metodológico

A continuación, se describen los objetivos y las actividades que se llevaron a cabo para la realización de este proyecto.

2.3.1 Objetivo general

Identificar Fresa genéticamente modificada mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los primers de los promotores CaMV, T-nos y *Arabidopsis thaliana*.

2.3.2 Objetivo particular 1

Diseñar primers específicos de fresa mediante programas bioinformáticos para la identificación de fresa en productos frescos y comercializados.

ACTIVIDADES

1. Buscar un gen de interés de la fresa para obtener primers.
2. Investigar la secuencia de ADN de fresa mediante el GeneBank.
3. Diseñar primers específicos de la fresa mediante el programa primer quest tool.



4. Evaluar los primers obtenidos con programas bioinformáticos para asegurar que sean únicos para la especie.
5. Desarrollar programa de PCR en función de las características de los primers diseñados.
6. Extraer y cuantificar el ADN de las muestras de fresa.

2.3.3 Objetivo particular 2

Identificar la especie *Fragaria x ananassa* con los primers diseñados para detectar fresa en productos frescos y procesados por medio de PCR

ACTIVIDADES

1. Extraer y cuantificar del ADN de las muestras (10 muestras fresa fresca y 10 muestras de productos procesados)
2. Determinación de la concentración y pureza de ADN por medio de espectrofotometría.
3. Aplicar el programa de PCR utilizando primers de fresa para verificar que amplifique en la especie de estudio.
4. Evaluar el producto obtenido mediante electroforesis y observar los resultados en un trasiluminador.

2.3.4 Objetivo particular 3

Evaluar la especificidad de los primers diseñados de fresa mediante PCR con especies filogenéticamente cercanas para detectar fresa en los productos frescos y comercializados.

ACTIVIDADES

1. Extraer y cuantificar del ADN de las muestras (Frambuesa, plátano, zanahoria y papa).
2. Determinación de la concentración y pureza de ADN por medio de espectrofotometría.
3. Aplicar el programa de PCR utilizando primers de fresa para verificar que los primers sean específicos de la especie.
4. Evaluar el producto obtenido mediante electroforesis y observar los resultados en un trasiluminador.



2.3.5 Objetivo particular 4

Diseñar primers mediante programas bioinformáticos para el promotor *Arabidopsis thalina* para identificar fresa genéticamente modificada.

ACTIVIDADES

1. Buscar un gen de interés de *Arabidopsis thalina*.
2. Investigar la secuencia de ADN mediante el GeneBank.
3. Diseñar primers específicos de *Arabidopsis thalina* mediante el programa primer quest tool.
4. Evaluar los primers obtenidos con programas bioinformáticos para asegurar que sean específicos para la especie.
5. Desarrollar programa de PCR en función de las características de los primers diseñados.

2.3.6 Objetivo particular 5

Evaluar la especificidad de los primers de *Arabidopsis*, CaMV y del terminador T-Nos mediante PCR con maíz transgénico y la planta de *Arabidopsis thalina*.

ACTIVIDADES

1. Extraer y cuantificar ADN de las muestras (maíz transgénico y *Arabidopsis thalina*).
2. Investigar programas de PCR para el primer CaMV y el terminador T-Nos que ya hayan sido aplicados satisfactoriamente.
3. Aplicar los programas de PCR utilizando los primers de CaMV, *Arabidopsis Thalina* y T-NOS para verificar que amplifique en las especies estudiadas.
4. Evaluar el producto obtenido mediante electroforesis y observar los resultados en un trasluminador.

2.3.7 Objetivo particular 6

Aplicar técnica de PCR al ADN de fresa fresca y productos comerciales con los primers de *Arabidopsis thalina*, CAMV y T-Nos para determinar la presencia de organismos genéticamente modificados en estos.



ACTIVIDADES

1. Aplicar la técnica de PCR al ADN de las muestras de fresa de productos frescos y procesados utilizando los primers de los promotores CaMV, T-NOS y *Arabidopsis thaliana*.
2. Evaluar el producto obtenido de la PCR mediante electroforesis y observar los resultados en un trasiluminador.

2.4 Materiales y métodos

Para poder realizar lo ya establecido en el cuadro metodológico (2.1) se necesitaron diversas muestras biológicas. Se ocuparon 9 muestras de fresa fresca de diferentes partes del Estado de México y 1 muestra del estado de Guanajuato y 10 productos procesados que contienen fresa entre los que se encuentran: mermeladas y yogurts; En las tablas 9 y 10 se muestra la nomenclatura utilizada para la identificación de estas muestras así como algunas referencias de estas; También se utilizaron otras muestras que ayudaron para verificar la especificidad de los primers de fresa como son: jitomate, papa, frambuesa, zanahoria y plátano; como control positivo para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana*, maíz transgénico, canola transgénica y fresa.

Tabla 9. Material Biológico Fresa Fresca.

NOMENCLARUTA	VARIEDAD	PROCEDENCIA
F1	Fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)	Wal-Mart, Tlalnepantla, Edo. de México
F2	Fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)	Mercado del Carmen, Cuautitlán Izcalli, Edo. De México
F3	Fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)	Soriana, Tlalnepantla, Edo. de México
F4	Fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)	Central de Abastos, Ecatepec, Edo.de México
F5	Fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)	Chedraui select, Toreo, Edo de. México



F6	Fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)	Mercado de Jamaica, Ciudad de México
F7	Fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)	Mercado de San Juan, Ciudad de México
F8	Fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)	Central de Abastos, Iztapalapa, Ciudad de México
F9	Fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)	Mercado Villa Victoria, Edo. de México.
F10	Fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)	Mercado San Miguel Allende, Guanajuato

Tabla 10. Material Biológico Productos Procesados.

Nomenclatura	Producto	Marca	Lote	Caducidad	País de procedencia	Precio
He	Mermelada de fresa	Helios	160113	01/2020	España	\$120.0
Es	Mermelada de fresa	Mackays	6334	11/2020	Escocia	\$84.0
Be	Mermelada de fresa	Bebé	4367	17/05/2018	España	\$130.0
Cle	Mermelada de fresa	Clemente Jacques	L3	30/05/2018	México	\$30.50
Mc	Mermelada de fresa	Mc Corick	U7049	03/2018	México	\$25.0
Sm	Mermelada de fresa	Smuckers	L5343007 110743	12/2017	Estados Unidos	\$37.50
Gr	Mermelada de fresa	Great Value	089100	23/12/2017	México	\$39.50
YG	Yogurt griego sabor fresa	Yoplait griego	L34987	15/05/2017	México	\$9.20
OK	Yogurt griego sabor fresa	Danone Oikos	L35087	23/05/2017	México	\$1050
CH	Yogurt griego sabor fresa	Chobani	000818	04/05/2017	Estados Unidos	\$27.50



2.4.1 Diseño de primers

Los primers que amplifican para fresa (*Fragaria x ananassa*) y para *Arabidopsis thaliana* fueron diseñados mediante el programa Primerquest Tool y se verificaron en la base de datos bioinformática GeneBank del National Center of Biotechnology Information (NCBI), La metodología detallada del diseño de primers se encuentra en el anexo 1. Los primers fueron seleccionados de acuerdo a su longitud (18-25pb); Las secuencias se observan en la Tabla 11.

Tabla 11. Secuencia de primers diseñados de *Fragaria x ananassa* y *Arabidopsis thaliana*.

Primer	Secuencia (5' a 3')	Longitud	Tamaño del Amplificado
Fresa Frontal			
<i>Fragaria x ananassa</i>	GGCCAAACATGGACGATAAATG	22pb	254pb
Fresa Reverso			
<i>Fragaria x ananassa</i>	GCCGTTAGAGACAGGACTAAAG	22pb	
Arabidopsis Frontal	GCGCAGTACAAATAAACAGTGG	22 pb	679pb
Arabidopsis Reverso	TCCGAAGAGGAGACAGTGAA	20 pb	

2.4.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de las muestras de fresa fresca, se llevó a cabo mediante el kit comercial “Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food.” con modificaciones en la metodología y para la extracción de ADN de canola y maíz mediante el protocolo de (Sambrook & Rusell, 2001). los protocolos se describen de manera detallada a continuación.



Tabla 12. Reactivos y materiales para extracción de ADN mediante el Kit

Reactivos	Materiales y Equipos
<ul style="list-style-type: none">▪ Lysis Buffer B, for Food▪ Precipitation Solution, for Food.▪ Magenisil® Paramagnetic Particles.▪ Solucion de Lisis (Tris base 50mM, NaCl 250Mm, SDS 0.3%, EDTA 0.1M)▪ Buffer de Lavado (Etanol 70%)	<ul style="list-style-type: none">▪ Agitador Vortex, Genie K-55-G▪ Juego de micropipetas, Rainin▪ Termoblock, thermomixer compact eppendorf.▪ Microcentrifuga, Minispin plus eppendorf 14 000 rpm▪ Mini centrifuga manual FUGEVET▪ Tubos eppendorf esterilizados▪ Gradilla magnética de separación.▪ Mortero con pistilo▪ Espátula▪ Microesferas de perla de vidrio▪ Puntas para Micropipetas esterilizadas▪ Balanza analítica electrónica, Cole parmer PR410 Equipar

METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE FRESA MEDIANTE EL KIT “WIZARD® MAGNETIC DNA PURIFICATION SYSTEM FOR FOOD”

1. Se trituró cierta cantidad de muestra en el mortero con nitrógeno líquido
2. Se pesaron 250 µg de muestra pulverizada en la balanza analítica electrónica y se colocó en un tubo eppendorf estéril de 2000µL
3. Se le agregaron 300µL de solución de lisis
4. Se añadió 30µg de microesferas de perla de vidrio
5. Se agitó con el vortex para homogenizar la muestra por 20- 25 segundos
6. Se incubó en el Termoblock a 65°C por 2 horas con inversión cada 15 minutos.
7. Se centrifugó por 1 minuto en la mini centrifuga manual.
8. Se transfirió la fase líquida a un nuevo tubo eppendorf
9. Se le añadió 540 µL de solución de lysis buffer B y se agitó en el vortex de 10 a 15 segundos para mezclar correctamente
10. Se agitó la solución de partículas Magenisil® Paramagnetic vigorosamente por 30 segundos.
11. Se adicionó 85µL de la solución de partículas Magenisil® Paramagnetic y se agitó en el vortex durante 15 segundo



12. Se agregó a la muestra 100µL de solución de precipitación y se dejó en temperatura ambiente durante 5 min
13. Se colocó el tubo en la gradilla de separación magnética *MagneSphere®* por 1 minuto. Dejando el tubo en la gradilla, se decantó la fase líquida.
14. Se retiró el tubo de la gradilla de separación magnética *MagneSphere®* y se agregó 150 µL de buffer de lavado se invirtió el tubo de 2 a 3 veces para mezclarlo. Se colocó nuevamente en la gradilla de separación magnética durante 1 minuto y se decantó la fase líquida.
15. Se dejó secar en el “*Termoblok Termomixer compact*” durante 10 minutos a 65 °C.
16. Se adicionó 100 µL de agua libre de nucleasas para suspender el ADN y se incubó por 5 minutos a 65 °C. Una vez terminado de incubar, el tubo se trasladó a la gradilla de separación magnética y se removió la fase líquida a un nuevo tubo.

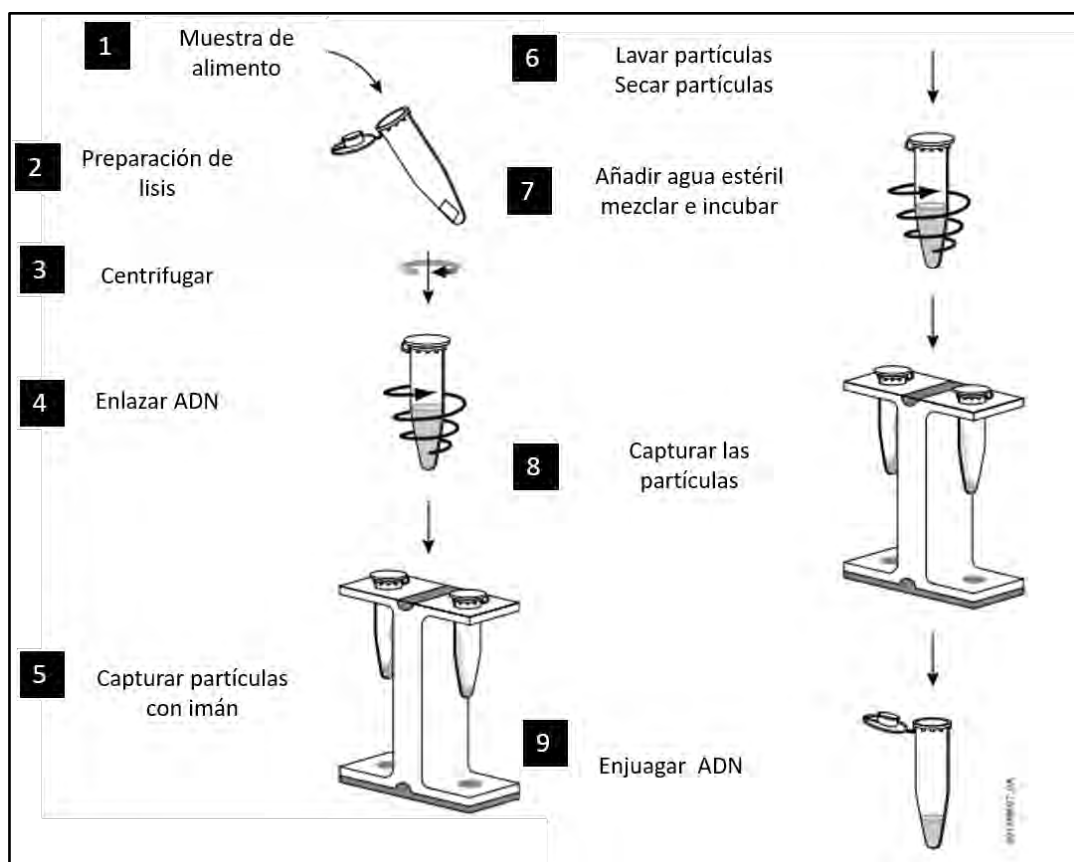


Figura 10. Esquema de aislamiento de ADN utilizando el sistema de purificación de ADN magnético wizard® para alimentos.



Metodología de extracción de ADN (Sambrook & Rusell, 2001).

Tabla 13. Reactivos y materiales para extracción de ADN.

Reactivos	Materiales y Equipos
<ul style="list-style-type: none">▪ Solución de Lisis (Tris base 50mM, NaCl 250Mm, SDS 0.3%, EDTA 0.1M).▪ Enzima proteinasa k.▪ Mezcla alcohol-cloroformo-alcohol isoamílico.▪ Etanol al 70%	<ul style="list-style-type: none">▪ Agitador Vortex, Genie K-55-G.▪ Juego de micropipetas, Rainin.▪ Termoblock, thermomixer compact eppendorf.▪ Microcentrifuga, Minispin plus eppendorf 14 000 rpm.▪ Tubos eppendorf esterilizados.▪ Mortero con pistilo.▪ Espátula.▪ Puntas para Micropipetas esterilizadas▪ Balanza analítica electrónica, Cole parmer PR410 Equipar.

Disgregación del tejido

1. Se trituró la muestra con ayuda de un mortero.
2. Se pesó 0.125g de cada muestra triturada en un tubo eppendorf.
3. Adicionando 1250µl de solución de lisis.
4. Se adicionó 7µl de enzima Proteinasa K a cada tubo.
5. Incubar los tubos a 50°C en el termoblock por 2 horas.
6. Elevar la temperatura del termoblock a 60°C por 1 hora para desactivar la enzima.

Desnaturalización de proteínas y polisacáridos

1. Una vez divididas todas las muestras en dos tubos, se adicionó a cada tubo 250µl de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico para desnaturalizar y desprender las proteínas.
2. Se centrifugaron las muestras en la microcentrífuga a 10 000rpm durante diez minutos a temperatura ambiente para obtener dos fases: una fase formada principalmente de lípidos y proteínas y una fase acuosa en la que el componente de interés fue el ADN



-
3. Se recuperaron las fases acuosas situadas en la parte superior de cada tubo y se trasladaron a tubos eppendorf esterilizados.

Precipitación de ADN

- 1) Se adicionaron 1500µl de etanol frío a cada tubo que contenía la fase acuosa recuperada, se agitaron suavemente.
- 2) Se centrifugaron a 10 000rpm durante diez minutos para precipitar el ADN por la diferencia de densidad con el etanol.
- 3) Se decantó el etanol y se dejó secar el ADN en la incubadora a 37°C por 1 hora.
- 4) Se adicionaron 50µl de agua desnaturalizada para re suspender el ADN.
- 5) Cuantificación del ADN por medio de absorbancia.

2.4.3 Cuantificación de la concentración y pureza de ADN

Una vez obtenido el material genético, es importante determinar la concentración mediante espectrofotometría. La ley de Beer-Lambert indica que la concentración de una molécula en una solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 20nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Cuando la longitud de la celda en que se disuelve el ADN, es de 1 cm, la absorbancia es igual a la densidad óptica (DO). En el caso de ADN genómico o doble cadena, una densidad óptica equivale a 50µg/ml. Se debe considerar el factor de dilución para obtener la concentración en nanogramos/microlitro (ng/µL). Concentraciones menores dificultan la estandarización de la PCR u otras técnicas. Para estimar la pureza del ADN se considera la proporción de la absorbancia a 260nm y 280nm (Xu, 2016)

Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la reacción es menor, indican la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol. (Xu, 2016).



Tabla 14. Reactivos y Materiales para cuantificación de ADN.

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

Metodología

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

2.4.4 Reacción en cadena de la polimerasa

Tabla 15. Reactivos y materiales para PCR

Reactivos	Materiales y equipos
Kit <i>Promega</i> para PCR que contiene: <ul style="list-style-type: none"> • Agua libre de Nucleasas • PCR Master Mix (50 unidades de Taq DNA polimerasa, 400 µM de cada dNTP y 3mµ de MgCl₂) 	<ul style="list-style-type: none"> • Termociclador Apollo ATC401 CLP • Micropipetas • Tubos Eppendorf • Puntas para micropipetas estériles • Tubos Eppendorf estériles
Kit parra PCR directa <i>Thermo Scientific phire plant direct</i> : <ul style="list-style-type: none"> • 2x phire plant PCR Buffer (dNTP´s y 1.5mM MgCl₂) • Phire hot start II DNA Polymerase • Buffer de dilución. 	
Parejas de Primers (fresa, CaMV, T-NOS y <i>Arabidopsis</i>) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Muestras de ADN cuantificadas 	



Metodología Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para que la PCR se llevara a cabo fue necesario hidratar los primers a una concentración de 25 μM . Se utilizó el kit de PCR *Promega* para realizar PCR a las muestras ADN de fresa fresca utilizando los primers de fresa y se verificaron que las muestras amplificaran en la zona de interés; Estos primers fueron diseñados mediante programas bioinformáticos, en la Tabla 11 se muestra la secuencia de los primers para la fresa (*Fragaria x ananassa*) con un tamaño de amplificado de 254 pb. La reacción se realizó en un tubo eppendorf estéril utilizando los componentes que se encuentran en la Tabla 16

Tabla 16. Reactivos para la PCR

Reactivo	Cantidad por muestra
PCR Master Mix	12.5 μL
Primer Frontal	0.5 μL
Primer Reverso	0.5 μL
ADN	1.0 μL
Agua libre de nucleasas	La necesaria para completar un vol. final de 24 μL
Total	25 μL

La proporción que se muestra en la tabla es por muestra, se multiplicó el valor por el número de muestras que se requerían, una vez preparada la reacción

1. Se colocó en la mini centrifuga manual por 10 segundos para una mejor homogenización
2. Se dividió el volumen final agregando 24 μL de reacción a cada tubo eppendorf previamente identificado
3. Posteriormente se agregó 1 μL de AND de las muestras de fresa fresca.
4. En caso del blanco se le añadió 1 μL de agua libre de nucleasas en lugar de ADN.



Etapas y ciclos de la reacción

Para establecer el programa de PCR utilizado para la identificación de fresa (*Fragaria x ananassa*), se siguieron las recomendaciones del programa establecido por (Huerta, 2016) con una T_m de 56.5°C específicamente calculada para los primers de fresa que se explica más detallado en el Anexo 2. En la figura 12 se muestra el programa de PCR utilizado para identificar fresa mediante los primers diseñados para *Fragaria x ananassa*.

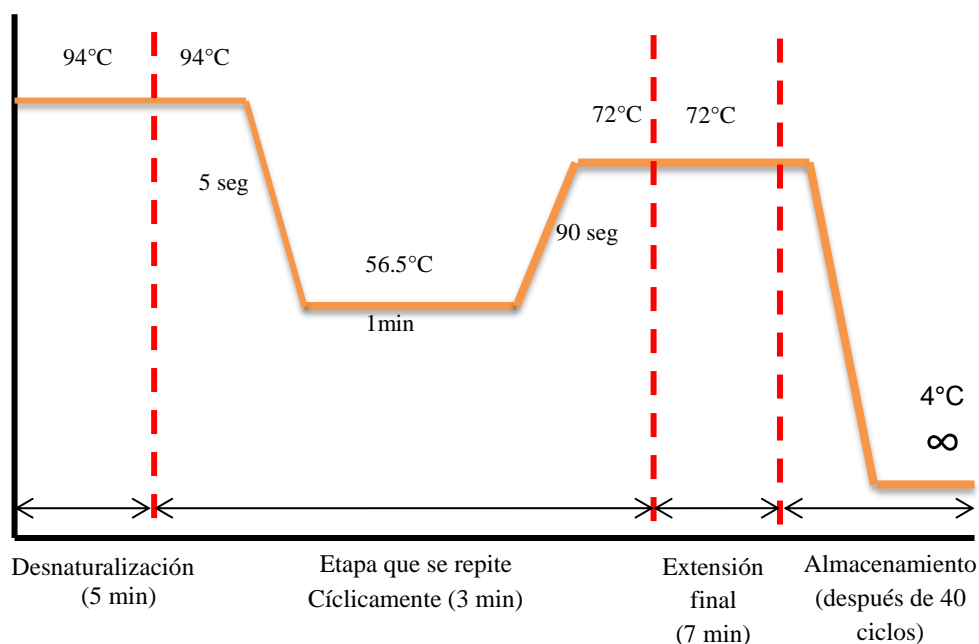


Figura 11. Programa de PCR para identificar *Fragaria x ananassa*.

Metodología de PCR directa

La PCR directa se realizó con el Kit de PCR *Thermo scientific phire plant direct* para verificar que el producto procesado contiene fresa y para detectar fresa transgénica con los promotores CaMV, *Arabidopsis thaliana* y el terminador T-Nos.

Los primers que se utilizaron para amplificar en la zona del promotor CaMV y T-NOS fueron recomendados y probados por (Karamollaog et al., 2009). En la Tabla 17 se pueden observar la secuencia de estos.



Tabla 17. Secuencia del primer CAMV y del terminador T-Nos.

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

Los componentes para cada reacción se prepararon a un volumen de 21 μ L; Al igual que el procedimiento anterior la muestra de ADN y la enzima fueron el último paso en la Tabla 18 se muestran los componentes por cada reacción de PCR directa.

Tabla 18. Reactivos para PCR directo

Reactivo	Cantidad por muestra
2x Phire plant PCR Buffer	10 μ L
Primer Frontal	0.5 μ L
Primer Reverso	0.5 μ L
Phire hot start II DNA polymerase	0.4 μ L
ADN	0.5 μ L
Agua libre de nucleasas	9.1 μ L

Al realizar PCR directa no es necesario realizar extracción de ADN de las muestras; Sin embargo para la muestras de productos procesados fue necesario hacer un paso previo de lavado con agua libre de nucleasas para remover el excedente de pectina que estas puedan tener ya que estas inhiben la PCR.



A las fresas previamente lavadas extraídas de las mermeladas de las muestras procesada y a las semillas de *Arabidopsis thaliana* que se utilizó como control positivo no se le realizaron extracción de ADN por lo que se sometieron a un pre tratamiento antes de la PCR, se diluyeron cierta cantidad de la muestra en 20 μ L de buffer de dilución el cual se incluye en el kit, se agito en el Vortex y se dejó reposar durante 10 minutos al finalizar la muestra se utilizó para realizar la reacción.

etapas y ciclos de la reacción

Los programas que se utilizaron para CaMV, T-NOS y *Arabidopsis thaliana* se basaron el protocolo del Kit de PCR *Thermo scientific Phire Plant Direct* cambiando su temperatura de hibridación ya que *Arabidopsis thaliana* tiene una T_m de 57°C (Ver Anexo 4) y para CaMV y T-NOS tiene una T_m promedio de 62°C. En la Figura 12 se muestran las condiciones para la identificación de fresa genéticamente modificada por el promotor *Arabidopsis thaliana* mediante la PCR.

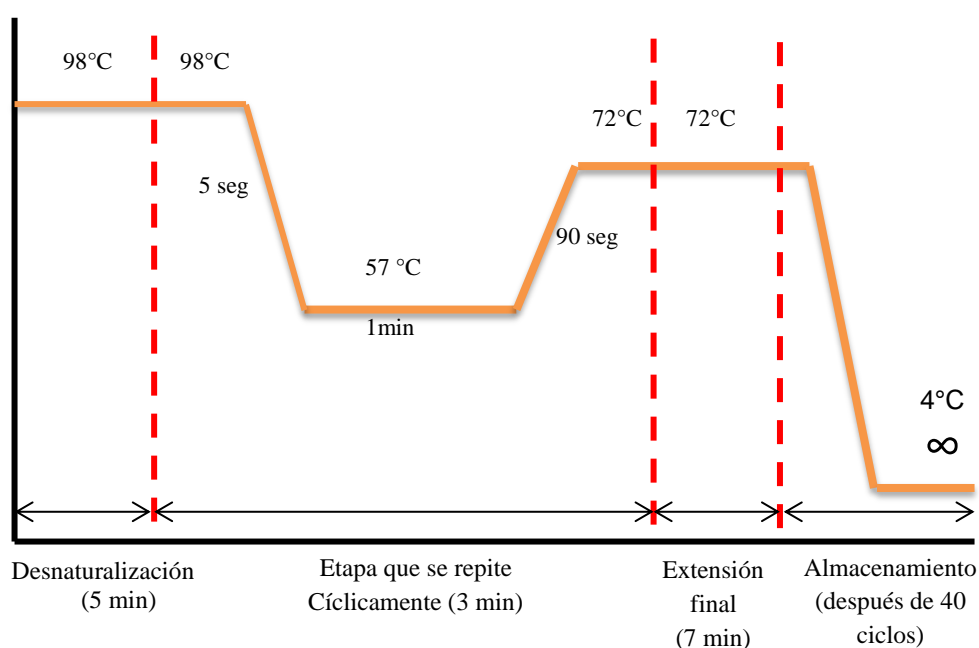


Figura 12. Programa de PCR para el promotor *Arabidopsis thaliana*.

En la figura 13 se muestran las condiciones de PCR directa utilizadas para la detección de fresa genéticamente modificada con el promotor CaMV y el terminador T-NOS.

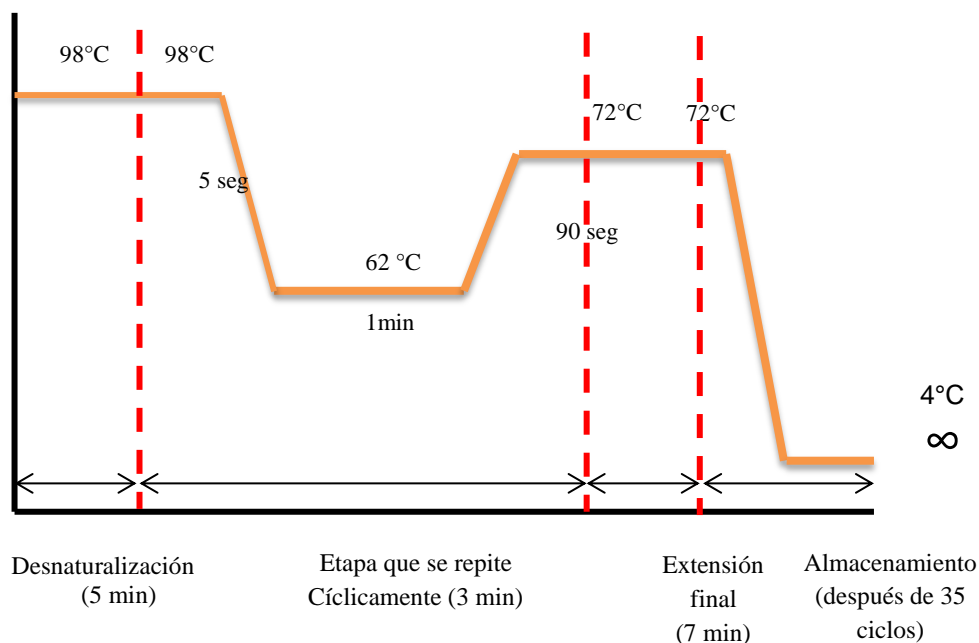


Figura 13. Programa de PCR para el promotor CAMV y el terminador T-Nos.

2.4.5 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa es una de las técnicas analíticas utilizadas en la caracterización de ácidos nucleicos en base a la forma y tamaño de las moléculas (Guevara et al., 2003).

La carga negativa, producto de los grupos fosfatos en el ADN y el ARN, resulta en una migración de las moléculas hacia el ánodo cuando se aplica un campo eléctrico; sin embargo, la matriz, formada por la agarosa en la sales del tampón, ofrece una resistencia al movimiento. Generalmente los geles de agarosa en corrida horizontal son utilizados para separar fragmentos entre 20 a 50000 pb, y se emplea concentraciones comprendidas entre un 0.7 % y un 3% (Guevara et al., 2003).

Una vez concluida la PCR se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2.5% para poder visualizar los resultados obtenidos. En la Tabla 19 se pueden ver los reactivos y materiales que se necesitan.



Tabla 19. Reactivos y materiales para electroforesis.

Reactivos	Material y Equipo
<ul style="list-style-type: none">▪ Agarosa▪ Tris acetato y EDTA (TAE) 1X como solución buffer, pH=8▪ Bromuro de etidio (BrEt)▪ Marcador de peso molecular (100 pb)▪ Colorante blue/orange 6X▪ Muestras de las reacciones de PCR	<ul style="list-style-type: none">▪ Camara y cassette de electroforesis horizontal▪ Horno de microondas▪ Juego de micropipetas▪ Parafilm▪ Trasluminador▪ Parafilm▪ Equipo para fotografía de luz UV▪ Balanza analítica electrónica

Metodología

Preparación de gel de agarosa

1. Para el gel de agarosa al 2.5% se pesó 1.25 gramos de agarosa en la balanza analítica, En un matraz Erlenmeyer de 200 mL y se agregaron 50 mL de tris acetato y EDTA (TAE 1X) como solución buffer (pH \rightarrow 8).
2. Se calentó en el microondas aproximadamente 1 minuto hasta que la agarosa se disolvió por completo.
3. La solución se dejó enfriar y se le agregó una gota de bromuro de etidio (BrEt) y se agitó para disolverlo
4. Se vertió en el soporte de la cámara de electroforesis colocando el peine para la formación de los pocillos
5. Se dejó gelificar la agarosa para retirar el peine y se añadió amortiguador TAE 1X a la cámara de electroforesis hasta cubrir el gel

Carga y corrida del gel

1. Se colocó en un trozo de parafilm 3 μ L de bromuro de etidio (BrEt), 3 μ L colorante de blue/orange y 2 μ L de marcador de peso molecular de 100 pb
2. Se colocó en un trozo de parafilm 3 μ L de bromuro de etidio (BrEt), 3 μ L colorante de blue/orange y 5 μ L del producto de la PCR



-
3. Posteriormente se colocaron todas las muestras en cada pocillo del gel
 4. Finalmente se conectó a la fuente de poder y se suministró 60V; La corrida se da por terminada hasta que el colorante pasa $\frac{3}{4}$ partes del gel

Visualización de los geles de agarosa

El gel se colocó en la base del trasluminador de luz UV y se encendió la cámara fotográfica y la lámpara de luz UV, se enfocó la imagen y se tomó fotografía del gel.



CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Objetivo particular 1

Diseñar primers específicos de fresa mediante programas bioinformáticos para la identificación de fresa en productos frescos y comercializados.

Se diseñaron los primers de *Fragaria x ananassa* que amplificaron para reconocer el gen (olp) mediante programas bioinformáticos se realizó siguiendo los pasos del Anexo 1. Se analizó la secuencia para la cual amplifican y se verificó que al realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con las muestras de fresa fresca y las muestras de productos procesados el tamaño del amplificado es de 254pb para así detectar la presencia del fragmento de ADN de *Fragaria x ananassa*.

3.2 Objetivo particular 2

Identificar la especie *Fragaria x ananassa* con los primers diseñados para detectar fresa en productos frescos y procesados por medio de PCR.

Se extrajo ADN de 2 muestras de fresa procedentes de un mercado local mediante el kit “wizard® magnetic ADN purification system for food” y se cuantificó mediante espectrofotometría en el Nanodrop obteniendo concentraciones de ADN en la muestra 1 de 181.4ng/μL y en la muestra 2 de 189.6ng/μL con una pureza de 1.75 y 1.76 respectivamente. Sin embargo, debido a la dificultad de la extracción del ADN de la fresa se optó por dejar concentradas las dos muestras para una mejor visualización ya que las muestras tienen un valor de pureza inferior a 1.8.

En la Figura 14 se muestran los resultados de la PCR realizada mediante el Kit *promega* utilizando los primers de *Fragaria x ananassa* con una temperatura de hibridación de 56.5°C en el pocillo F1 se colocó la muestra de ADN con menor pureza y una concentración menor a comparación de la muestra F2; Sin embargo, se puede observar en las dos concentraciones un amplificado de 254pb. Lo cual indica que los primers diseñados para la fresa hibridan a las condiciones que se muestran en la Figura 11 y se podrá utilizar posteriormente el ADN de estas muestras como control positivo para la identificación de fresa.

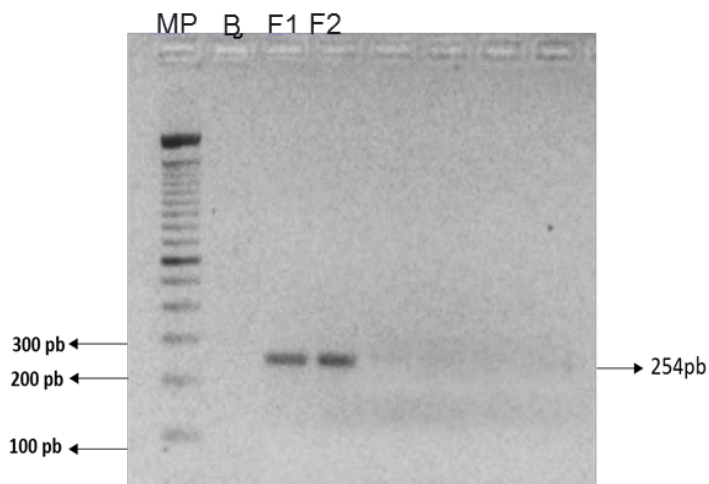


Figura 14. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la amplificación de dos muestras de fresa fresca, Marcador de peso molecular de 100pb (MP), Blanco (B), ADN de *Fragaria x ananassa* 1 (F1) y ADN de *Fragaria x ananassa* 2 (F2).

➔ Identificación de *Fragaria x ananassa* en fresa fresca

Se extrajo el ADN de 10 muestras de fresa frescas mediante el kit “wizard® magnetic ADN purification system for food” y se cuantificó mediante espectrofotometría en el Nanodrop obteniendo concentraciones de ADN de 146.4 ng/mL a 549.1 ng/mL. Los valores que se obtuvieron en la relación 260/280 que se encuentran en la tabla 20 muestran que no existe una contaminación significativa por lo cual el ADN pudo utilizarse en la realización de la PCR.

Tabla 20. Concentración de ADN de las muestras de Fresa Fresca.

MUESTRA	Relación 260/280	ng/mL
F1	1.81	187.3
F2	1.80	302.3
F3	1.71	169.9
F4	1.76	146.4
F5	1.78	341.5
F6	1.88	182.9
F7	1.82	241.4
F8	1.76	549.7
F9	1.90	179.8
F10	1.83	259.3



Posteriormente se utilizó el kit de PCR *Promega* y los primers diseñados de *Fragaria x ananassa* con las condiciones del programa que se encuentra en la Figura 11, los geles de agarosa se prepararon al 2.5% a 60 V. Se colocaron cada 5 muestras de fresa fresca; como control positivo se utilizó ADN que anteriormente había amplificado en la zona de interés 254pb (*Fragaria x ananassa*).

En la figura 15 se muestra el gel de agarosa de las primeras 5 muestras de fresa fresca: (F1) fresa fresca del mercado del Carmen, (F2) fresa fresca Walmart Perinorte, (F3) fresa fresca de la central de abastos de Ecatepec, (F4) fresa fresca del mercado de Jamaica y (F5) fresa fresca del mercado de San Juan, Ciudad de México. Se puede observar en los cinco carriles un amplificado de 254pb, como se observa en los carriles de las muestras (F3) Y (F5) el amplificado se ve más tenue en comparación a las otras 3 muestras esto se debe a la concentración de ADN de estas ya que es menor a las tres restantes; Sin embargo se pudieron utilizar estas muestras ya que los primers amplificaron en la zona de interés.

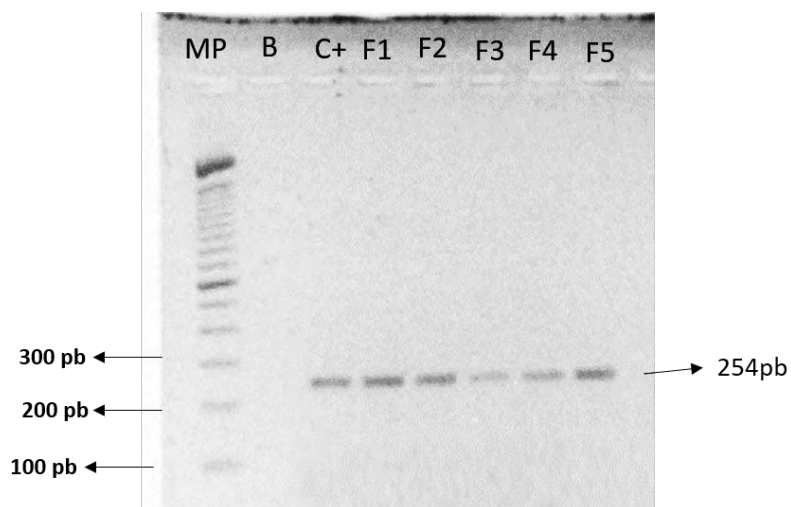


Figura 15. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la amplificación de 5 muestras de fresa fresca utilizando primers de *Fragaria x ananassa*. Marcador de peso molecular de 100pb (MP), Blanco (B), control positivo (C+), Fresa fresca de Wal-Mart Tlalnepantla (F1), Fresa fresca de Mercado de Carmen (F2), Fresa fresca de Soriana Tlalnepantla (F3), Fresa fresca de Central de abastos Ecatepec (F4), Fresa fresca Chedraui Select, Tereo (F5).

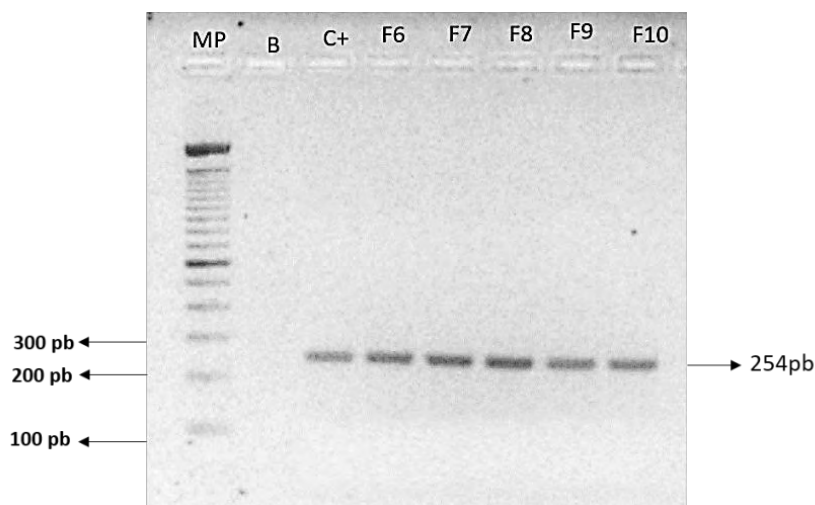


Figura 16. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la amplificación de 5 muestras de fresa utilizando primers de *Fragaria x ananassa*. Marcador de peso molecular de 100pb (MP), Blanco (B), control positivo, (C+), Fresa fresca de Mercado de Jamaica CDMX (F6), Fresa fresca del mercado San Juan CDMX (F7), Fresa fresca Central de abastos Iztapalapa CDMX (F8), Fresa fresca Mercado Villa Victoria (F9) y Fresa fresca Mercado San Miguel Allende (F10).

En la figura 16 se pueden observar las cinco muestras restantes de fresa fresca (F6) Fresa fresca de Mercado de Jamaica CDMX, (F7) Fresa fresca del mercado San Juan CDMX, (F8) Fresa fresca de Central de abastos Iztapalapa CDMX, (F9) Fresa fresca Mercado Villa Victoria y (F10) Fresa fresca Mercado San Miguel Allende. Los fragmentos amplificados de 254pb de las cinco muestras se alcanzan a ver con claridad a pesar que las concentraciones de ADN son distintas entre sí, cabe mencionar que la muestra (F8) fresa fresca procedente de la central de abastos de Iztapalapa tuvo la concentración de ADN más alta 549 ng/mL y presenta la banda ligeramente más marcada a comparación de las demás.

➔ Identificación de *Fragaria x ananassa* en productos procesados

En los 10 productos procesados que contengan fresa en donde no hubo una extracción de ADN previa puesto que se utilizó la fresa directamente del producto cabe mencionar que la mayoría de los productos eran mermeladas por lo que se realizó un lavado previo a las fresas con agua libre de nucleasas para eliminar el exceso de polisacáridos y evitar un posible error por este motivo se realizaron las PCR mediante el kit de PCR directo *Thermo scientific phire plant direct*.

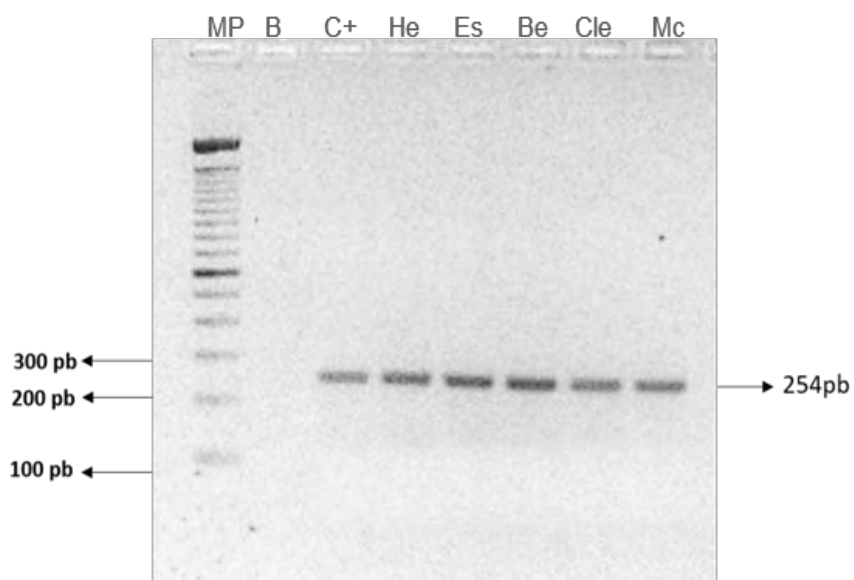


Figura 17. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la amplificación de 5 muestras de productos procesados de fresa. Marcador de peso molecular 100pb (MP), Blanco (B), control positivo (C+), Mermelada Helios de España (He), Mermelada Mackays de Escocia (Es), Mermelada bebe de España (Be), Mermelada Clemente Jaques de México (Cle) y Mermelada Mc Cormick de México (Mc).

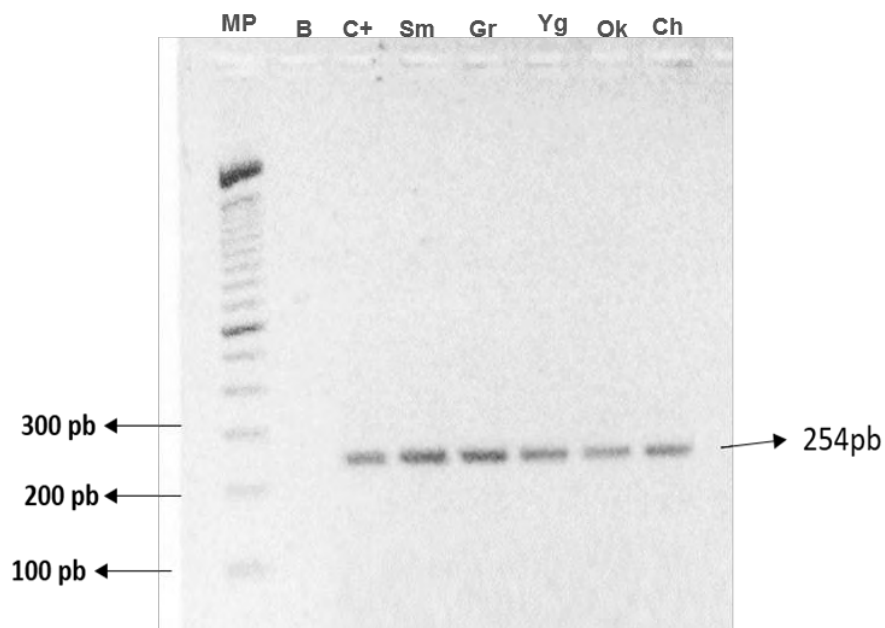


Figura 18. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la amplificación de 5 muestras de productos procesados de fresa. Marcador de peso molecular 100pb (MP), Blanco (B), Control positivo (C+), Mermelada Smuckers de U.S.A (Sm), Mermelada Great value de México (Gr), yogurt griego yoplait (Yg), Yogurt griego oikos (Ok), yogurt griego chobani (Ch).



En la Figura 18 se muestran las últimas 5 muestras de productos de fresa, se puede observar en el pocillo del blanco no hay amplificado por lo que esta reacción se realizó sin alguna contaminación, En el control positivo y las muestras se observa un amplificado de 254pb demostrando la presencia de *Fragaria x ananassa*.

Al finalizar los programas de PCR de las 10 muestras fresa fresca y las 10 muestras de productos procesados de fresa con los primers diseñados para fresa (*Fragaria x ananassa*) se verificó que amplifican en la zona de interés e hibridan correctamente con el programa de PCR que se desarrolló Figura 11; por lo que las condiciones que se plantearon fueron satisfactorias para que estos primers pudieran amplificar en todas las muestras que se estudiaron y por ende identificar el ADN de fresa en los productos procesados.

3.3 Objetivo particular 3

Evaluar la especificidad de los primers diseñados de fresa mediante PCR con especies filogenéticamente cercanas para detectar fresa en los productos frescos y comercializados.

Para la extracción de ADN de especies filogenéticamente cercanas a la fresa (papa, zanahoria, jitomate, plátano y zarzamora) se utilizó el kit de WIZARD® MAGNETIC ADN PURIFICATION SYSTEM FOR FOOD, estas muestras fueron cuantificadas mediante espectrofotometría usando el Nanodrop, En la tabla 21 se muestran las lecturas que van de 276 ng/mL a 452 ng/mL, se decidió no diluir las muestras ya que la concentración del ADN de la fresa que amplifica se encontraba en un rango de 146.4 y 547 ng/mL. En los resultados que muestran en la relación 260/280 las muestras se encuentran cercano al 1.8 óptimo que demuestra que no existe contaminación en el material genético extraído.

Tabla 21. Cuantificación de ADN para pruebas de especificidad

Muestra	Nomenclatura	Relación 260/280	Concentración (ng/mL)
Papa	P	1.87	452.4
Zanahoria	Z	1.80	382.3
Jitomate	J	1.88	347.9
Plátano	PL	1.82	356.7
Zarzamora	Z	1.76	276.4



Teniendo ya el ADN de las muestras se continuó con la prueba de PCR utilizando el kit de PCR *Promega* y los primers de fresa; el programa utilizado se encuentra en la Figura 11 y finalmente se evaluó el producto obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y se observó en el trasiluminador.

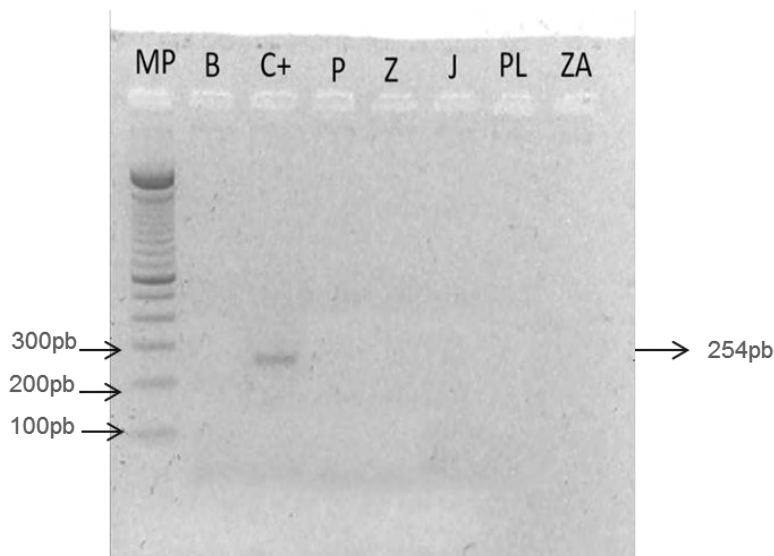


Figura 19. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V prueba de especificidad de primers de fresa. Marcador de peso molecular 100pb (MP), Blanco (B), control positivo (C+), ADN de papa (P), ADN de Zanahoria (Z), ADN de Jitomate (J), ADN de plátano (PL) y ADN de Zarzamora (ZA).

En la figura 19 se encuentra un amplificado el pocillo del control positivo que es la muestra de ADN de fresa fresca como se observa en la imagen el amplificado está es tenue esto se debe al método de extracción de ADN ya que tuvo un valor de pureza menor a 1.8; Sin embargo el amplificado que se muestra es de 254pb correspondiente a la zona de interés para los primers de fresa; en los carriles siguientes que contienen ADN de papa, zanahoria, jitomate, plátano y frambuesa no presentan un amplificado por lo que los primers de fresa (*Fragaria x ananassa*) que se diseñaron son específicos de la especie ya que solo amplificaron con el ADN de la fresa.

3.4 Objetivo particular 4

Diseñar primers mediante programas bioinformáticos del promotor *Arabidopsis thalina*, para identificar fresa genéticamente modificada.



Se diseñaron los primers de *Arabidopsis thalina* que amplificaron para reconocer el gen AtSEC2 mediante programas bioinformáticos se realizó siguiendo los pasos del Anexo 2, Se analizó la secuencia para la cual amplifican y se verificó que al realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la muestra de ADN de la planta de *Arabidopsis thalina* el tamaño del amplificado fue de 679pb para así detectar la presencia del fragmento de ADN delimitado por los primers.

Para la muestra de ADN de *Arabidopsis thalina* se consiguieron semillas de esta con ayuda del CINVESTAV-IPN, las cuales fueron sembradas en agar nutritivo hasta su crecimiento como se muestra en la figura 18 fue aproximadamente una semana (7 días). Posteriormente la planta fue colocada en un buffer de dilución que forma parte del kit para PCR directo *Thermo Scientific phire plant direct* utilizando los primers siguiendo las condiciones mencionadas en la Figura 12 para su posterior uso como control positivo.



Figura 20. *Arabidopsis thalina* sembrado en agar nutritivo a 0.5% después de 7 días.

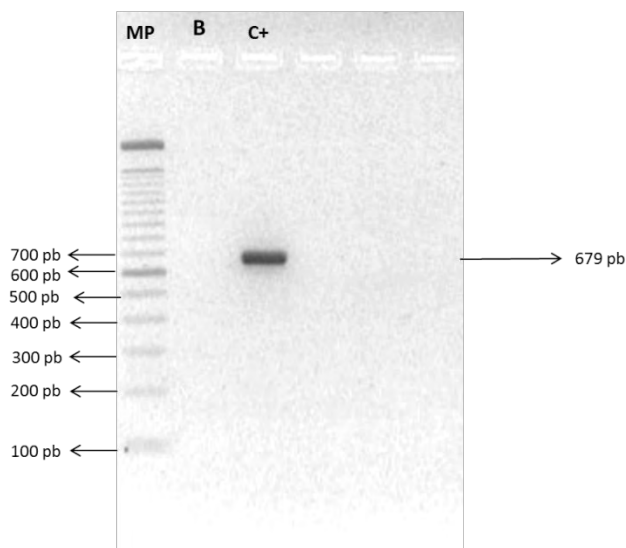


Figura 21. Gel de agarosa al 2.5% a 60 V para la amplificación de *Arabidopsis* utilizando los primers de *Arabidopsis thalina*. Marcador de peso molecular de 100pb (MP), Blanco (B) y ADN de la planta de *Arabidopsis thalina* (C+).

En la figura 21 se puede ver un amplificado de 679pb correspondiente a la zona de interés de los primers diseñados de *Arabidopsis* por lo que esta muestra de ADN se puede utilizar como control positivo para la identificación de fresa genéticamente modificada con el promotor de *Arabidopsis thalina*, en el carril del Blanco no se encontró un amplificado corroborando que la PCR se realizó sin alguna contaminación.

3.5 Objetivo particular 5

Evaluar la especificidad de los primers de Arabidopsis, CaMV y del terminador T-Nos mediante PCR con maíz transgénico y la planta de *Arabidopsis thalina*.

Se realizó extracción de ADN de maíz que contiene el gen de CaMV y T-NOS al igual que la canola que contiene el gen de T-NOS para ser utilizadas como controles positivos en la identificación de organismos genéticamente modificados y de maíz no transgénico para verificar la especificidad de los promotores, las muestras de canola y maíz transgénico ya habían sido utilizados en trabajos anteriores por lo que se encontraban en el laboratorio; La extracción que llevo a cabo fue mediante el protocolo de (Sambrook & Rusell, 2001). Y se cuantifico mediante espectrofotometría en el Nanodrop obteniendo los siguientes resultados:



Tabla 22. Cuantificación de ADN para controles positivos de CaMV y T-NOS.

Muestra	Antes de diluir			Después de diluir	
	Nomenclatura	Relación 260/280	Concentración (ng/mL)	Relación 260/280	Concentración (ng/mL)
Maíz transgénico	M	1.96	3477.5	1.80	80.54
Canola	C	1.88	1653.7	1.79	86.3
Maíz no transgénico	MN	1.82	2367.4	1.84	78.6

En la tabla 22 se muestra la relación 260/280 del ADN extraído de maíz y canola los cuales tienen un valor cercano a 1.8 por lo que las muestras se pueden utilizar para realizar PCR, la concentración de estas es muy elevada y al utilizarlo así corríamos el riesgo que los primers no hibridaran correctamente por lo que se redujeron a 60 ng/mL al diluirlas con agua libre de nucleasas. En el cuadro podemos ver los datos antes y después de las diluciones de las muestras de ADN.

Para verificar la especificidad del promotor *Arabidopsis thaliana*. Se realizó PCR directa con los primers correspondientes y el kit Thermo Scientific *phire plant direct* con las condiciones ya establecidas en Figura 11 y Figura 12 después se evaluó el producto obtenido mediante electroforesis con gel de agarosa al 2.5% y se observó en el trasiluminador.

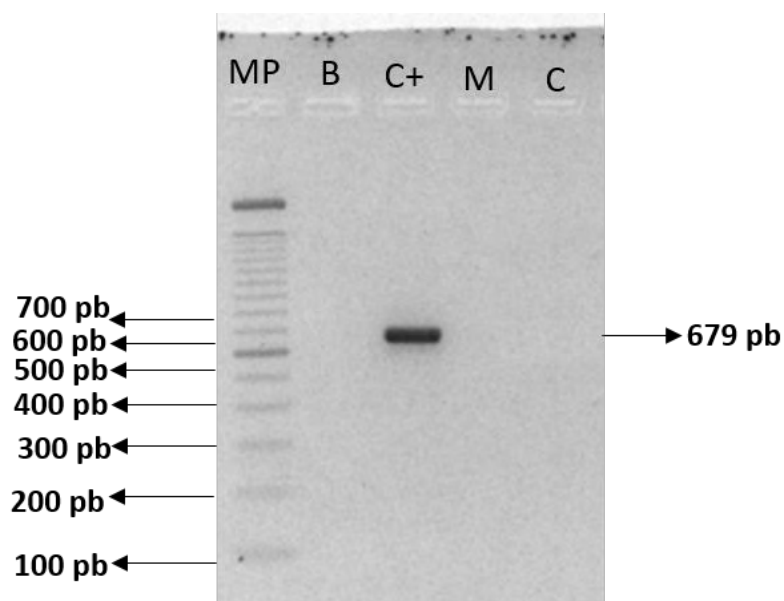


Figura 22. Gel de agarosa al (2.5%) para la especificidad de *Arabidopsis thaliana*. Marcador de peso molecular de 100pb (MP), Blanco (B), ADN de planta de *Arabidopsis thaliana* (C+), ADN de maíz transgénico (M) y ADN de canola transgénica (C).



En la figura 22 se puede ver el amplificado de 679pb en el control positivo que contiene ADN de la planta de *Arabidopsis thaliana* en los pocillos siguientes contienen ADN de maíz transgénico y de canola sin encontrar un amplificado demostrando que los primers diseñados son específicos de la especie y podrán ser utilizados para la identificación de fresa genéticamente modificada en fresa fresca y en productos procesados con ese promotor.

Para corroborar la amplificación de la zona de interés de los primers seleccionados del promotor CAMV y del terminador T-Nos se utilizó PCR directa *Thermo Scientific phire plant direct* utilizando los primers mencionados en la Tabla 17. Se evaluó el producto obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y se observó en el trasiluminador.

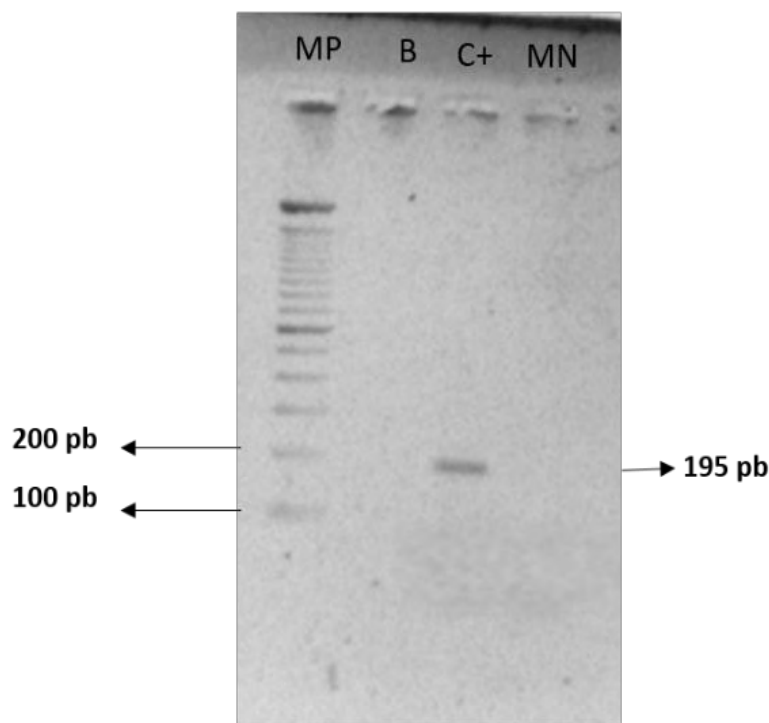


Figura 23. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la prueba de especificidad del promotor CaMV. Marcador de peso molecular de 100pb (MP), Blanco (B), control positivo: Maíz transgénico para CaMV (C+) y ADN de maíz no transgénico (MN).

En la figura 23 se aprecia un amplificado en el carril de control positivo que corresponde ADN de maíz transgénico que contiene el gen CaMV mostrando un fragmento de 195pb y en el carril de (MN) que corresponde al ADN de maíz no transgénico no se encuentra un amplificado.

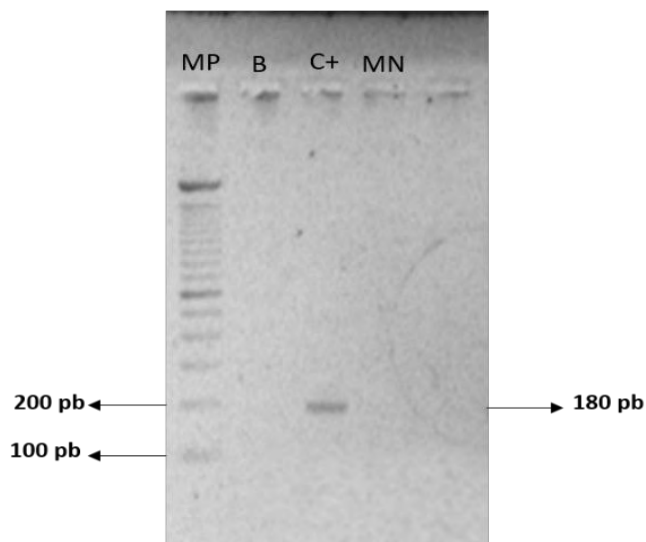


Figura 24. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la prueba de especificidad del terminador T-Nos. Marcador de peso molecular de 100pb (MP), Blanco (B), control positivo: ADN de canola transgénica (C+) y ADN de maíz no transgénico (MN).

En la figura 24 se aprecia un fragmento en el carril de control positivo que corresponde ADN de la canola transgénica que contiene el gen T-Nos mostrando un amplificado de 180pb al contrario del carril de MN que corresponde al ADN de maíz no transgénico demostrando que los primers amplifican únicamente en la zona de interés.

Después de corroborar que la muestra de maíz transgénico y canola transgénica únicamente amplifica para CAMV y T-Nos respectivamente se decidió utilizarlos como controles positivos en las PCR para la identificación de fresa genéticamente modificada.

3.6 objetivo particular 6

Aplicar técnica de PCR al ADN de fresa fresca y productos comerciales con los primers de *Arabidopsis thaliana*, CAMV y T-Nos para determinar la presencia de organismos genéticamente modificados en estos.

Después de verificar que los primers de CaMV, *Aarabidopsis thaliana* y el terminador T-NOS son específicos para su especie se llevó acabo la técnica de PCR directo con el kit *Thermo Scientific phire plant direct* para la identificación de organismos genéticamente modificados en la fresa.



En la figura 13 se muestran las condiciones a las que se sometieron las muestras de PCR directa para detectar la presencia de CAMV y T-NOS. Así mismo en la figura 12 se muestra el programa utilizado para el promotor *Arabidopsis thaliana*. Al finalizar los resultados se evaluaron en gel de agarosa al 2.5% a 60V teniendo como como controles positivos: CaMV 195pb, T-NOS 180pb y *Arabidopsis thaliana* 679pb; en caso que alguna muestra de fresa amplifique en alguna de estas indicaría que se ha modificado genéticamente utilizando la secuencia del promotor o terminador.

→ Detección del promotor CAMV 35S en fresa fresca.

Se realizaron las PCR mediante el kit de PCR directo *Thermo scientific phire* con los primers del promotor CaMV a las condiciones que se establecieron en la Figura 13 posteriormente se evaluó el producto obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y se visualizó mediante el trasluminador.

En la figura 25 se muestran las primeras cinco muestras de fresa fresca: (F1) fresa fresca de Walmart Tlalnepantla, Edo de México (F2) fresa fresca de Mercado del Carmen, Edo de México (F3) fresa fresca de Soriana Tlalnepantla, Edo de México, (F4) fresa fresca de central de abastos Ecatepec, Edo de México (F5) fresa fresca mercado de Chedraui select, Edo de México. En ninguna de estas muestras se obtuvo un amplificado por lo que se muestra la ausencia del gen CaMV en las primeras 5 muestras de fresa fresca.

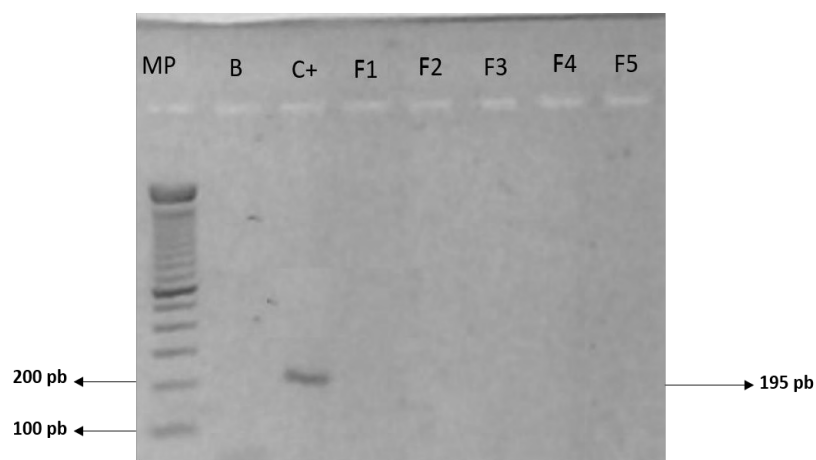


Figura 25. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la identificación del promotor CAMV en cinco muestras de fresa fresca. Marcador de peso molecular de 100pb (MP), Blanco (B), control positivo (C+), Fresa fresca de Walmart Tlalnepantla (F1), Fresa fresca de Mercado de Carmen (F2), Fresa fresca de Soriana Tlalnepantla (F3), Fresa fresca de Central de abastos Ecatepec (F4), Fresa fresca Chedraui Select, Tereo (F5).



En la figura 26 se muestran las cinco muestras restantes de fresa fresca (F6) Fresa fresca mercado de Jamaica, Ciudad de México, (F7) Mercado de San Juan, Ciudad de México, (F8) Central de abastos Iztapalapa, Ciudad de México, (F9) Mercado Villa victoria, Edo de Méx, (F10) Mercado San Miguel Allende, Guanajuato en la que al igual que la figura 25 solo se observa el amplificado del control positivo que contiene ADN de CaMV de 195pb (ADN de Maíz transgénico) indicando que no han sido modificadas genéticamente con este promotor; También se puede observar que en el carril del blanco (B) no hay ningún amplificado demostrando que la PCR de realizo correctamente sin ser contaminada.

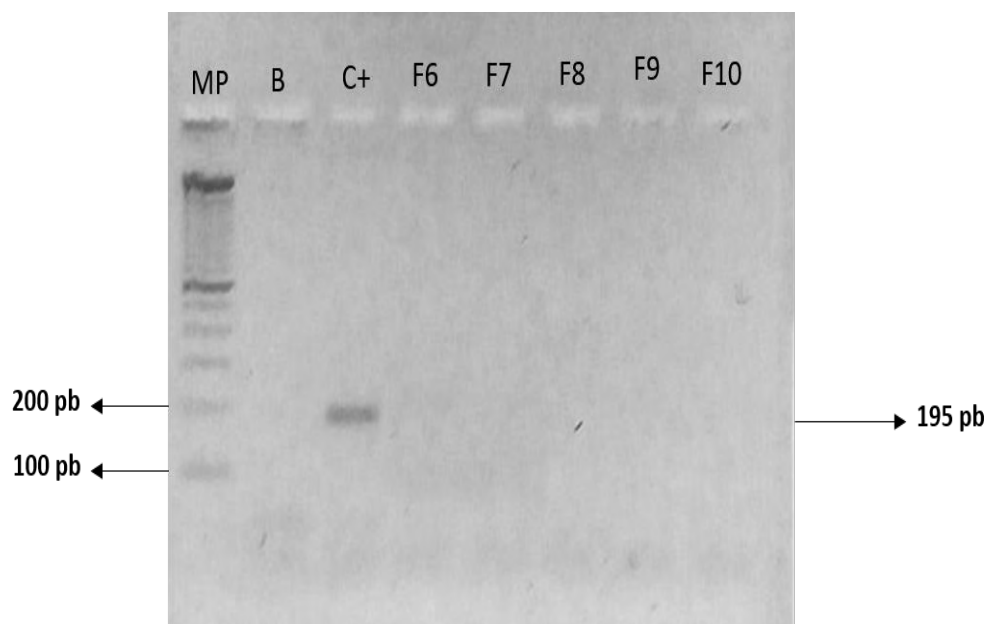


Figura 26. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la identificación del promotor CAMV en cinco muestras fresa fresca. Marcador de peso molecular de 100pb (MP), Blanco (B), control positivo, (C+), Fresa fresca de Mercado de Jamaica CDMX (F6), Fresa fresca del mercado San Juan CDMX (F7), Fresa fresca Central de abastos Iztapalapa CDMX (F8), Fresa fresca Mercado Villa Victoria (F9) y Fresa fresca Mercado San Miguel Allende (F10).

➔ **Detección del promotor CAMV 35S en muestras de productos comercializados**

Después de realizar las pruebas de detección del promotor CaMV en las fresas frescas se procedió a realizar el mismo procedimiento en las muestras de los productos comerciales que contienen fresa realizando el mismo lavado previo con agua libre de nucleasas a las fresas de las mermeladas.



En la figura 27 se observa los primeros 5 productos procesados de fresa, (Ch) yogurt griego chobani (Ok) yogurt griego oikos de fresa, (Yg) yogurt griego yoplait de fresa, (Gr) mermelada de fresa Great value, (Sm) mermelada de fresa smuckers. Se observó que en el blanco (B+) no hay un fragmento lo cual significa que la reacción se realizó sin presencia de contaminación y la única banda que amplificó pertenece al control positivo (Maíz transgénico 195pb) descartando que estas muestras presenten promotor CaMV.

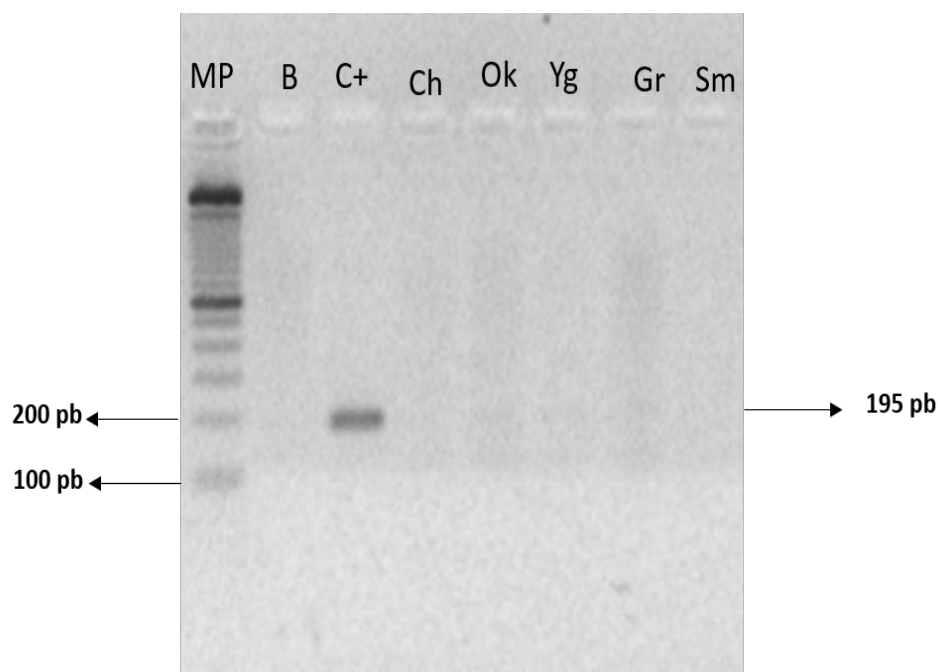


Figura 27. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la identificación del transgen CAMV en cinco productos de fresa. Marcador de peso molecular 100pb (MP), Blanco (B), control positivo ADN de maíz transgénico (C+), yogurt griego chobani (Ch), yogurt griego oikos de fresa (Ok), yogurt griego yoplait de fresa(Yg), Mermelada de fresa Great value (Gr), mermelada de fresa smuckers (Sm).

En la Figura 28 se muestran las cinco muestras de productos procesados de fresa restantes: (He) mermelada de fresa marca Helios originaria de España (Es) mermelada de fresa marca Mackays originaria de Escocia, (Be) mermelada de fresa marca Bebé originaria de España (Cl) mermelada de fresa marca Clemente Yacques originaria de México (Mc) mermelada de fresa marca McCormick originaria de México. Se observa solo un fragmento de 195pb del control positivo C+ y ninguna de las cinco muestras presenta fragmento indicando que no se ha llevado a cabo modificación genética utilizando el promotor CaMV en estas muestras.

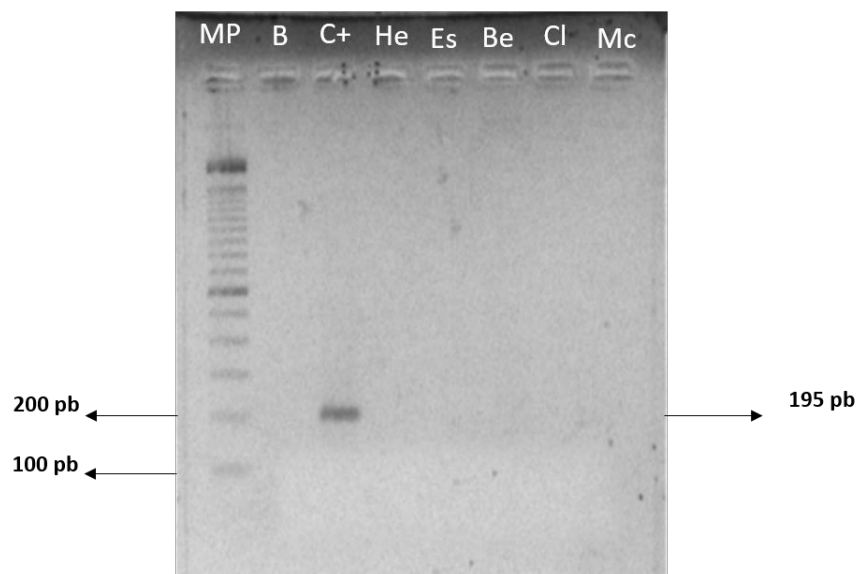


Figura 28. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la identificación del transgen CAMV en los cinco productos restantes de fresa. Marcador de peso molecular de 100pb (MP), Blanco (B), control positivo (C+), mermelada de fresa marca Helios (He), mermelada de fresa marca mackays (Es), mermelada de fresa marca bebé (Be), mermelada de fresa marca clemente yacques (Cl) y mermelada de fresa marca McCormick (Mc).

El promotor CaMV 35S es el más utilizado en las plantas que son modificadas genéticamente debido a esto se esperaba encontrar fresa genéticamente modificada con este promotor ya que en la lista de promotores utilizados en la fresa, CaMV es uno de los principales (Yonghua, 2017). Sin embargo en ninguna de las 20 muestras analizadas se encontró su presencia

➔ **Detección del terminador T-Nos en muestras de fresa fresca**

Se realizaron las PCR mediante el kit de PCR directo *Thermo scientific phire* con los primers del terminador a las condiciones que se establecieron en la Figura 13 posteriormente se evaluó el producto obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y se visualizó mediante el trasiluminador para estas reacciones se utilizó como control positivo ADN de canola transgénica que contiene el gen de T-Nos para corroborar la existencia de material transgénico.

En la figura 29 se presentan los resultados de las primeras 5 muestras de fresa fresca observando que en el pocillo del blanco no hay un amplificado lo que significa que la reacción se realizó sin alguna contaminación y solo se observa el amplificado del control positivo perteneciente al ADN de canola transgénica.

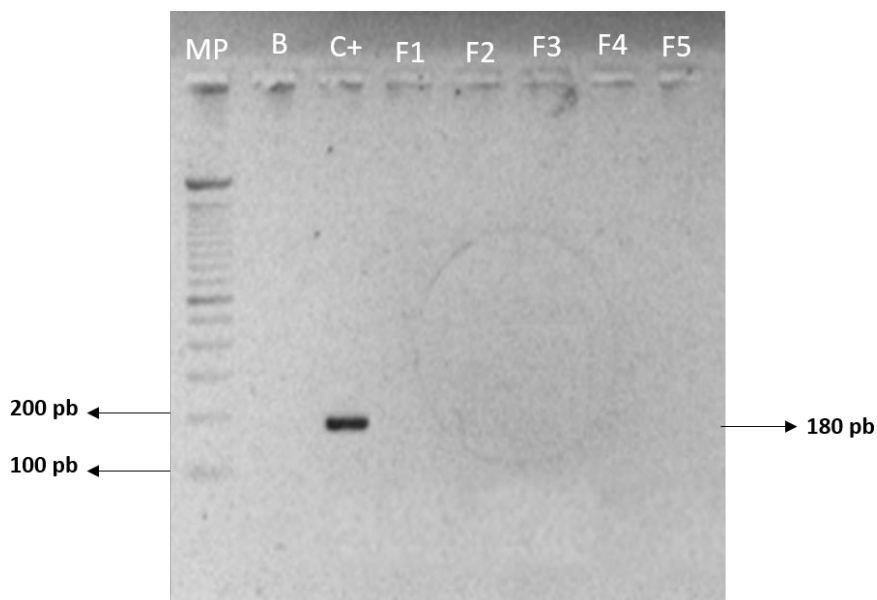


Figura 29. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la identificación del terminador T-NOS en cinco muestras fresa fresca. Marcador de peso molecular de 100pb (MP), Blanco (B), control positivo (C+), Fresa fresca de Wal-Mart Tlalnepantla (F1), Fresa fresca de Mercado de Carmen (F2), Fresa fresca de Soriana Tlalnepantla (F3), Fresa fresca de Central de abastos Ecatepec (F4), Fresa fresca Chedraui Select, Toreo (F5).

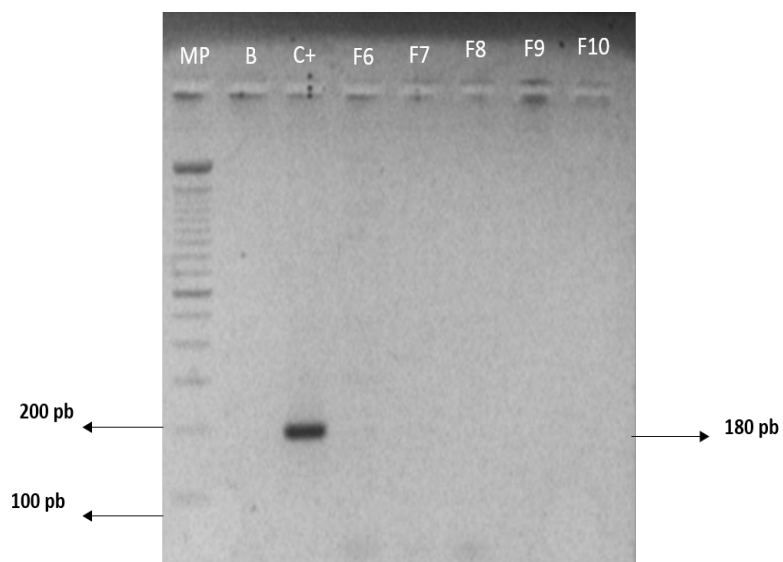


Figura 30. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la identificación del terminador T-Nos en las últimas cinco muestras de fresa fresca. Marcador de peso molecular de 100pb (MP), Blanco (B), control positivo, (C+), Fresa fresca de Mercado de Jamaica CDMX (F6), Fresa fresca del mercado San Juan CDMX (F7), Fresa fresca Central de abastos Iztapalapa CDMX (F8), Fresa fresca Mercado Villa Victoria (F9) y Fresa fresca Mercado San Miguel Allende (F10).



En la figura 30 se observan las últimas 5 muestras de fresa fresca (F6, F7, F8, F9 y F10) y solo se aprecia un fragmento amplificado correspondiente al pocillo de control positivo. En ninguna de las 10 muestras de fresa fresca evaluadas se visualiza un amplificado descartando la presencia del terminador T-NOS para la modificación genética a la fresa, por otro lado como se puede observar en las figuras 29 y 30 se ven claramente el amplificado del control positivo que contiene ADN de canola transgénica con 180pb. Así como la ausencia de algún amplificado en el carril del blanco demostrando que no hubo contaminación al realizar estas reacciones.

→ Determinación del terminador T-Nos en muestras de productos comercializados de fresa.

Después de realizar las pruebas de detección del promotor T-Nos en las fresas frescas se procedió a realizar el mismo procedimiento en las muestras de los productos comerciales que contienen fresa

En la Figura 31 se observan los primeros 5 productos comercializados de fresa: (Ch) yogurt griego chobani (Ok) yogurt griego oikos de fresa, (Yg) yogurt griego yoplait de fresa, (Gr) mermelada de fresa Great value, (Sm) mermelada de fresa smuckers; El primer pocillo pertenece al marcador de peso molecular, el segundo pocillo es el blanco sin amplificado alguno demostrando que la reacción se realizó sin contaminación alguna, en el pocillo de (Ok) yogurt oikos danone de fresa se observa un amplificado de 180pb al igual que el control positivo danone está siendo la única muestra que amplificó demostrando que se utilizó el terminador T-NOS de *Agrobacterium tumefaciens* para modificar genéticamente la fresa que se utilizó para la elaboración de este yogurt que proviene de México y sin declarar que esta haya sido modificada genéticamente según la etiqueta que portaba.

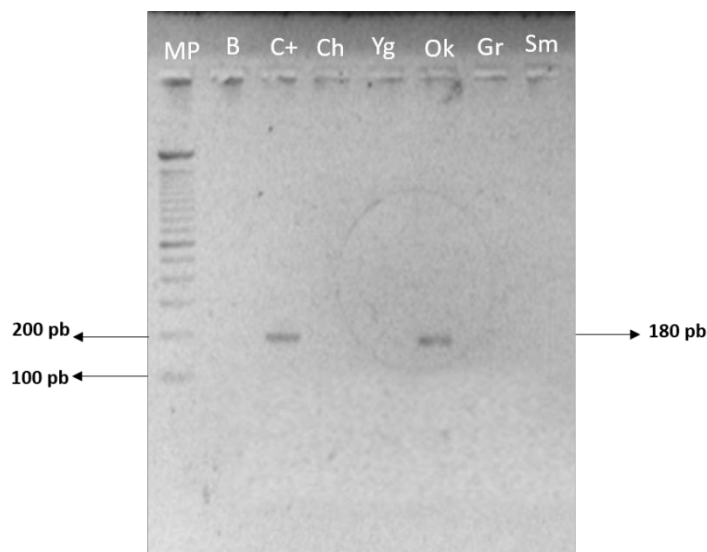


Figura 31. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la identificación del terminador T-NOS en cinco productos de fresa. Marcador de peso molecular 100pb (MP), Blanco (B), control positivo ADN de maíz transgénico (C+), yogurt griego chobani (Ch), yogurt griego oikos de fresa (Ok), yogurt griego yoplait de fresa(Yg), Mermelada de fresa Great value (Gr), mermelada de fresa smuckers (Sm).

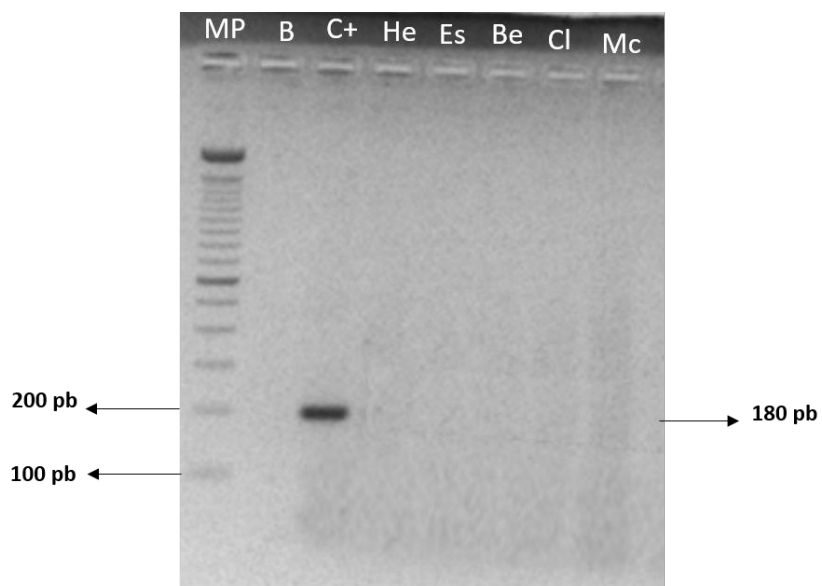


Figura 32. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la identificación del terminador T-NOS en los últimos cinco productos de fresa. Marcador de peso molecular de 100pb (MP), Blanco (B), control positivo (C+), mermelada de fresa marca Helios (He), mermelada de fresa marca mackays (Es), mermelada de fresa marca bebé (Be), mermelada de fresa marca clemente yacques (Cl) y mermelada de fresa marca McCormick (Mc).



En la Figura 32 se observa los últimos 5 productos procesados de fresa, (He) mermelada de fresa marca Helios originaria de España, (Es) mermelada de fresa marca Mackays originaria de Escocia, (Be) mermelada de fresa marca Bebé originaria de España, (Cl) mermelada de fresa marca Clemente Yacques originaria de México (Mc), mermelada de fresa marca McCormick originaria de México. Solo se aprecia el amplificado del control positivo de 180pb que pertenece al ADN de la canola transgénica demostrando que no se ha utilizado el terminador T-Nos en estas últimas cinco muestras que son muestras de importación.

→ **Detección del promotor *Arabidopsis thalina* en muestras de fresa fresca**

Se realizó las PCR mediante el kit de PCR directo *Thermo scientific phire* con los primers del promotor *Arabidopsis thalina* a las condiciones que se establecieron en la Figura 12 posteriormente se evaluó el producto obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y se visualizó mediante el trasiluminador anteriormente no se habían reportado resultados obtenidos con este promotor. Estas reacciones se realizaron mediante PCR directo utilizando como control positivo ADN de la planta *Arabidopsis thalina*.

En la Figura 33 se muestra el gel de electroforesis de las primeras cinco muestras de fresa fresca: (F1) fresa fresca de Wal-Mart Tlalnepantla, Edo. De México, (F2) fresa fresca de Mercado del Carmen, Edo de México, (F3) fresa fresca de Soriana Tlalnepantla, Edo de México, (F4) fresa fresca de central de abastos Ecatepec, Edo de México, (F5) fresa fresca mercado de Chedraui select, Edo de México. En donde el carril del blanco (B) no se encuentra ningún amplificado demostrando que la reacción en cadena de la polimerasa se realizó correctamente. Así mismo se puede observar que el único amplificado que se visualiza pertenece al control positivo de 679pb para *Arabidopsis thalina*.

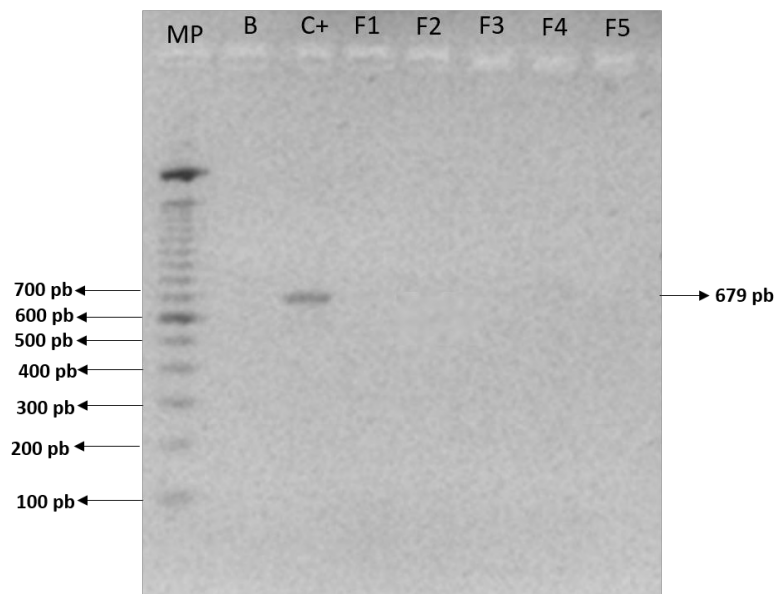


Figura 33. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la identificación del promotor *Arabidopsis thalina* en cinco muestras de fresa fresca. Marcador de peso molecular de 100pb (MP), Blanco (B), control positivo (C+), Fresa fresca de Wal-Mart Tlalnepantla (F1), Fresa fresca de Mercado de Carmen (F2), Fresa fresca de Soriana Tlalnepantla (F3), Fresa fresca de Central de abastos Ecatepec (F4), Fresa fresca Chedrahui Select, Toreo (F5).

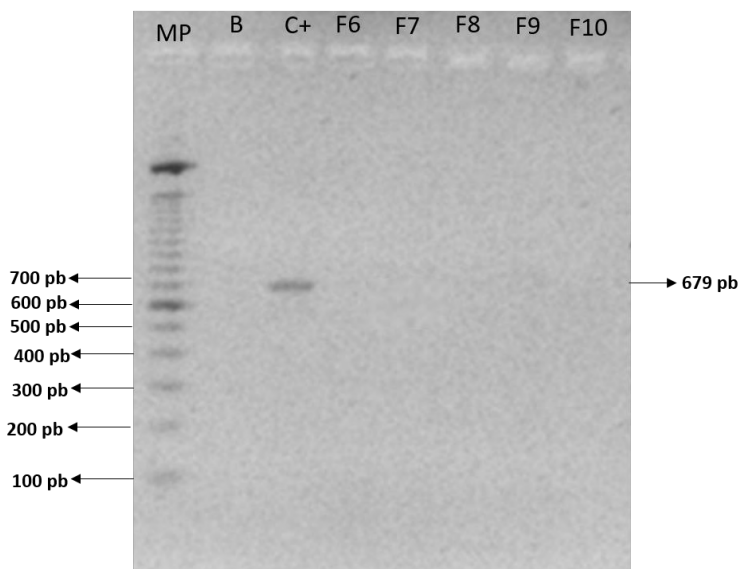


Figura 34. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la identificación del promotor *Arabidopsis thalina* en cinco muestras de fresa fresca. Marcador de peso molecular de 100pb (MP), Blanco (B), control positivo, (C+), Fresa fresca de Mercado de Jamaica CDMX (F6), Fresa fresca del mercado San Juan CDMX (F7), Fresa fresca Central de abastos Iztapalapa CDMX (F8), Fresa fresca Mercado Villa Victoria (F9) y Fresa fresca Mercado San Miguel Allende (F10).



En la figura 34 se observa el gel de electroforesis de las cinco muestras restantes de fresa fresca: (F6) Fresa fresca mercado de Jamaica, Ciudad de México, (F7) Mercado de San Juan, Ciudad de México, (F8) Central de abastos Iztapalapa, Ciudad de México, (F9) Mercado Villa victoria, Edo de Méx. , (F10) Mercado San Miguel Allende, Guanajuato.

En ninguna de las diez muestras de fresa fresca existió una amplificación señalando la usencia del promotor del gen *AtSEC2 (Arabidopsis thalina)* en las muestras de fresa fresca 9 muestras originaria del Estado de México y 1 del Estado de Guanajuato. En ambas figuras se observa que en el carril del blanco (B) no hay amplificadas demostrando así que las reacciones se realizaron sin ningún tipo de contaminación.

➔ **Detección del promotor *Arabidopsis thalina* en muestras de productos comercializados de fresa**

Para finalizar se detectó la presencia del gen *AtSUC2 (Arabidopsis thalina)* en los productos procesados de fresa mediante PCR directo siguiendo las condiciones establecidas en la Figura 12.

En la figura 35 se muestra en gel de electroforesis de las primeras 5 muestras de productos procesados de fresa: (Ch) yogurt griego chobani, (Ok) yogurt griego oikos de fresa, (Yg) yogurt griego yoplait de fresa, (Gr) mermelada de fresa Great value, (Sm) mermelada de fresa smuckers de las cuales dos presentaron un amplificado en 679pb las bandas pertenecen a la muestras de (Yg) yogurt griego Yoplait y (Ok) yogurt griego Oikos Danone demostrando que estos productos contienen fresa genéticamente modificada al cual se ve que se le ha insertado del gen *AtSUC2* de (*Arabidopsis thalina*) la cuál según (Zhao, 2016) en los ultimos 10 años se le ha insertado este gen a las fresas de la especie *Fragaria x ananassa* para sus resistencia a fitoplasmas y la resistencia a las condiciones climáticas adversas. Sin embargo ninguno de estos 2 productos lo menciona en su etiqueta.

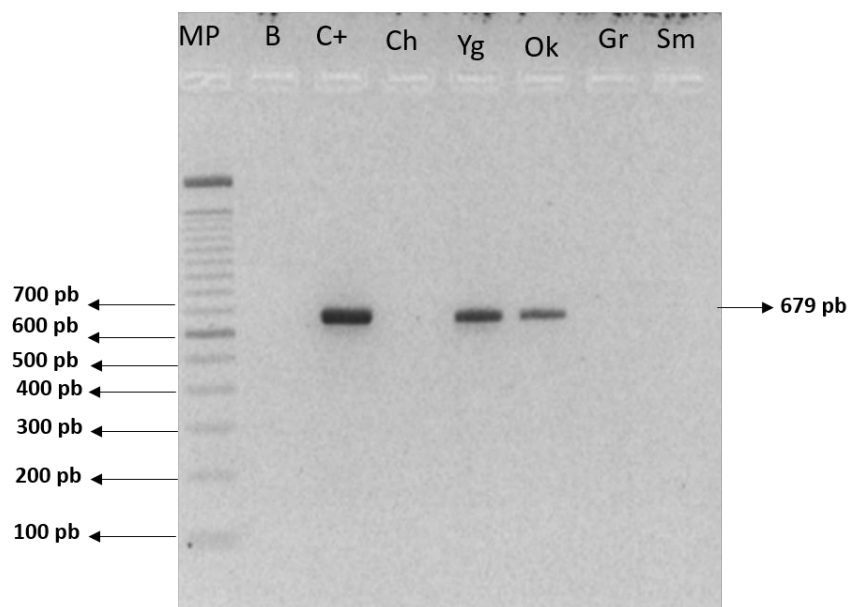


Figura 35. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la identificación del promotor *Arabidopsis thalina* en productos de fresa. Marcador de peso molecular 100pb (MP), Blanco (B), control positivo ADN de maíz transgénico (C+), yogurt griego chobani (Ch), yogurt griego oikos de fresa (Ok), yogurt griego yoplait de fresa(Yg), Mermelada de fresa Great value (Gr), mermelada de fresa smuckers (Sm).

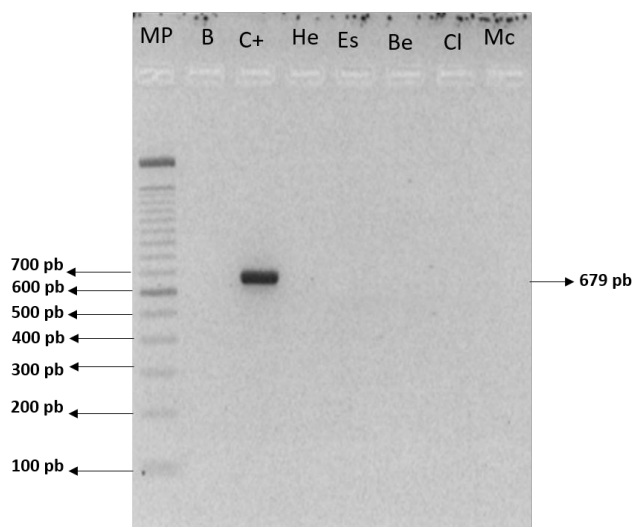


Figura 36. Gel de agarosa al (2.5%) a 60 V para la identificación del promotor *Arabidopsis thalina* en productos de fresa. Marcador de peso molecular de 100pb (MP), Blanco (B), control positivo (C+), mermelada de fresa marca Helios (He), mermelada de fresa marca mackays (Es), mermelada de fresa marca bebé (Be), mermelada de fresa marca clemente yacques (Cl) y mermelada de fresa marca McCormick (Mc).



En la figura 36 se observan los últimos 5 productos de fresa (He) mermelada de fresa marca Helios originaria de España (Es) mermelada de fresa marca Mackays originaria de Escocia, (Be) mermelada de fresa marca Bebé originaria de España, (Cl) mermelada de fresa marca Clemente Yacques originaria de México, (Mc) mermelada de fresa marca McCormick originaria de México. No amplificaron para el promotor de *Arabidopsis* solo se logra observar la banda de amplificación de control positivo 679pb. Las PCR para detectar promotor *Arabidopsis* en productos comerciales se realizaron de manera adecuada ya que el carril del blanco no muestra la presencia de algún amplificado. Sin embargo (Yonghua, 2017) enlista promotores que se han utilizado para modificar genéticamente la fresa entre los que se encuentran: CaMV 35S, T-Nos, AtSUC2 (*Arabidopsis thaliana*) y pBISPG. Por lo anterior no se puede descartar la posibilidad que no sean transgénicos porque pudieron utilizar otro promotor o terminador que no se haya estudiado en este trabajo.

Como se puede observar los dos amplificados que se obtuvieron son las muestras de ADN de fresa extraída de las muestras de yogurt griego. Al igual que para el terminador T-NOS para descartar que estas hayan amplificado por una modificación genética realizada en la leche puesto que son yogurts se rastreó en el GeneBank la secuencia de ADN del *Lactobacillus* y se buscó la similitud con los primers del promotor *Arabidopsis thaliana* descubriendo que no hay similitud entre estas dos especies descartando que estas hayan amplificado por algún transgen de la leche y no de los primers de *Arabidopsis thaliana*.

Finalmente en los cuadros 23 y 24 se muestra un resumen de los resultados obtenidos para la presencia o ausencia de los transgenes CaMV, T-NOS y *Arabidopsis Thalina* en las muestras de fresa fresca y en las muestras de los productos procesados.

Tabla 23. Detección de OGM'S en fresa fresca.

NOMENCLARUTA	PROCEDENCIA	CaMV	T-NOS	<i>Arabidopsis Thalina</i>
F1	Wal-Mart, Tlalnepantla, Edo. de México	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
F2	Mercado del Carmen, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO



F3	Soriana, Tlalnepantla, Edo. de México	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
F4	Central de Abastos, Ecatepec, Edo. de México	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
F5	Chedraui select, Toreo, Edo de. México	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
F6	Mercado de Jamaica, Ciudad de México	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
F7	Mercado de San Juan, Ciudad de México	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
F8	Central de Abastos, Iztapalapa, Ciudad de México	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
F9	Mercado Villa Victoria, Edo. de México.	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
F10	Mercado San Miguel Allende, Guanajuato	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Tabla 24. Detección de OMG'S en productos procesados de fresa.

Nomenclatura	Producto	Marca	País de origen	CaMV	T-NOS	<i>Arabidopsis Thalina</i>
He	Mermelada de fresa	Helios	España	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Es	Mermelada de fresa	Mackays	Escocia	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Be	Mermelada de fresa	Bebé	España	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Cle	Mermelada de fresa	Clemente Jacques	México	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Mc	Mermelada de fresa	Mc Corick	México	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Sm	Mermelada de fresa	Smuckers	Estados Unidos	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO



Gr	Mermelada de fresa	Great Value	México	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
YG	Yogurt griego sabor fresa	Yoplait griego	México	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
OK	Yogurt griego sabor fresa	Danone Oikos	México	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
CH	Yogurt griego sabor fresa	Chobani	Estados Unidos	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO



CONCLUSIÓN

El diseño de primers para la fresa (*Fragaria x ananassa*) y para el promotor *Arabidopsis* mediante programas bioinformáticos fue exitosa ya que estos amplificaron en la zona de interés y fueron específicos ya que no amplificaron con otras especies filogénicamente cercanas.

La técnica de extracción de ADN para las fresas es inconsistente ya que al probar con varios métodos de extracción su composición química dificultaba puesto que el azúcar junto la pectina actuaba como un agente gelificante y complicaba la precipitación del ácido nucleico. Así que El kit especial para plantas “Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR”, resultó ser de gran ayuda para optimizar el proceso durante la búsqueda de Organismos Genéticamente Modificados, pues permitió llevar a cabo la PCR de forma directa con la fresa y productos que la contengan como las mermeladas.

Los primers seleccionados para el promotor CaMV y el terminador T-Nos fueron específicos para detectar organismos genéticamente modificados ya que hicieron posible la detección de ADN transgénico en algunas de las muestras de estudio

Se detectó la presencia de fresa en mediante los primers diseñados de *Fragaria x ananassa* en las 20 muestras estudiadas incluyendo productos procesados y fresa fresca.

Se detectaron organismos genéticamente modificados pues encontraron 2 muestras con presencia de ADN del promotor *Arabidopsis thaliana* indicando manipulación genética en las muestras provenientes de la mermelada de fresa del yogurt griego de Danone y Yoplait. Al mismo tiempo se encontró la presencia del terminador de la nopalina sintetasa T-NOS en la muestra de yogurt griego yoplait y aunque las muestras que se amplificaron son provenientes del yogurt se descartó que esto haya sido ocasionado por organismos modificados de la leche pues al investigar las secuencias de ADN de *Lactobacillus* y los primers de *Arabidopsis thaliana* y T-NOS no existe similitud alguna entre ellos.

Sin embargo siendo México el tercer exportador de berries en el mundo y obteniendo resultados positivos de organismos genéticamente modificados en productos elaborados en México como los yogurts oikos y yoplait griego es indispensable el análisis de las fresas y de los productos que la contenga ya sea para producto interno o para exportación ya que esta información no se da a



conocer al consumidor se está incumpliendo con la normatividad vigente en materia de bioseguridad como la es la NOM-001-SAG/BIO-2014 que exige el etiquetado de cualquier material genéticamente modificado ya sean semillas o material vegetativo destinados a siembra, cultivo y producción agrícola para evitar desviaciones de uso y tener un control de trazabilidad, al igual que la NOM-164-SEMARNAT/SAGARPA-2013 que establece condiciones de los resultados de las liberaciones realizadas de organismos genéticamente modificados y sus posibles riesgos para el medio ambiente y la diversidad biológica.

En la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) se encarga de regular actividades de utilización de organismos genéticamente modificados, de acuerdo con los resultados obtenidos en México se está comercializando productos de consumo cotidiano que se han modificado genéticamente para conferirles alguna característica y no se tiene algún registro en la etiqueta de estos.



GLOSARIO

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

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

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

Arabidopsis thalina: es una especie de crucífera nativa de Europa se utiliza como planta modelo por pequeño genoma, fácil manejo y su corto tiempo de generación.

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

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

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

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

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

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

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

Organismos Genéticamente Modificados (OGM): Son variedades de especies conocidas a las que se les ha conferido alguna capacidad funcional (detectable, heredable e



intencionalmente útil), por tecnologías de ingeniería genética, a partir de la incorporación de factores hereditarios (genes) de especies distantes o cercanas.

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

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

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

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

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



REFERENCIAS

1. Anderson, L. (2011). *Transgénicos. Ingeniería genética, alimentos y nuestro medio*. Madrid: Gaia.
2. Avinash, C. (2018). Control temporal y espacial de la expresión génica en cultivos hortícolas. *Horticulture Research*, 34-76.
3. Barreiro M. (1999). *Fresa. La producción en México y la generación de divisas*.
4. Barrera, G. (2003). *Prima Nacional Estratégico de la Fresa en Mexico*. Morelia: Fundación produce Michoacán.
5. Bartz, J. (2002). *Postharvest Physiology and Pathology of vegetables*. Nueva York, Estados Unidos: Marcel Dekker.
6. Baudilio, J. (1993). *Fresas, Fresones y Tomates*. Barcelona, España: AEDOS.
7. Berumén, J. (2009). *Union Agrícola Regional de Productores de Fresa y Hortelizas*. Michoacán: Campesina.
8. Bianchi, P. (2018). *Guía completa del cultivo de las fresas* (13 ed.). Oregon: De Vecchi.
9. Bolívar, F. (2018). *Transgénicos grandes beneficios, ausencia de daños y mitos*. México: Colegio Nacional.
10. Bolívar, F. G. (2007). *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. México: Academia Mexicana de Ciencias.
11. Casal, I. (2015). *Plantas Transgénicas*. Madrid: Isebiot.
12. Cortázar, A. M. (2004). *Métodos Físico-Químicos en Biotecnología*. México: Instituto de Biotecnología.
13. FAOSTAT. (21 de Enero de 2017). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Obtenido de Top production of strawberry: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
14. Ferri, E. (2003). *Alimentos Transgénicos (y organismos manipulados genéticamente)*. Barcelona: Caja España.
15. Flores, R. (2010). *Fresa (Fragaria X ananassa Duch) Producción, manejo y poscosecha*. Bogota, Colombia: Cundinamarca.
16. FND. (2017). *PANORAMA DE LA FRESA*. CDMX: FIRA.
17. Guevara, R., Llanos, F., & Vidal, A. (2003). *MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE*



ELECTROFORESIS PARA PROTEINAS Y ADN. LIMA: CAPAC.

18. Hancock, J. (1999). *Strawberries*. Londres, Inglaterra: CABI PUBLISHING.
19. Hemphill, M. (1991). *Strawberries - Cultivation, Antioxidant Properties and Health Benefits*. (N. Melone, Ed.) Nueva York, Estados Unidos: Nova science.
20. Herdandez, J. (2012). Desarrollan variedades de plantas de fresa libre de plagas y virus. *Imagen Agropecuaria* , 3-9.
21. Holden Marcia J., L. M. (2009). *The use of 35S and Tnos Expression Elements in the Measurement of Genitcally Engineered Plant Materials*. Analytical and Bionalytical Chemistry.
22. Holden, M., Levine, M., & Tandace, S. (2010). The use of 35S and Tnos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materi. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2-8.
23. Holst, J., Berthau, Y., & Hougs, L. (2012). Detección de organismos genéticamente modificados no autorizados (OGM) y materiales derivados. *biotechnology advances*, págs. 4-7.
24. Huerta, O. (2016). Detección de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) genéticamente modificados comercializados en México por reacción en cadena de la polimerasa. *Tesis de Ingenieria. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán* . UNAM.
25. Karamollaog, I., Öktem, H., & Mutlu, M. (2009). DNA biosensor for detection of genetically modief organism (GMO´S). *Biochical Engeeneering*, 142-150.
26. Ledesma, C. (2016). Fresa transgénica: importancia, beneficios y avances científicos en México. *Ciencia y Tecnología Universitaria*, 2-8.
27. Lepage, C. (2012). *La verdad sobre los transgénicos*. Barcelona: Icaria.
28. Lopéz, M. (2003). *Tecnologías Moleculares de Trazabilidad alimentaria*. Madrid: Genoma España.
29. López, S. (1998). *Producción de fresas y fresones*. Valencia, España: Agroguías.
30. Manning, K. (1994). Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation. *PLANTA*, 62-68.
31. Neri, D. (2016). *Strawberry: Growth, Development, Diseases*. Wallingford: CABI.
32. Ortiz, G. V. (2004). *Los cultivos y los alimentos transgénicos*. Bogota : Grupo semillas.
33. Padilla, C. (2016). Principios y práctica de la electroforesis en gel de agarosa . *The*



- Biotechnology education company*, 3-4.
34. Perez Castro, A. M. (2008). *Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia.
 35. Pérez, C., Mendel, J., & Ortiz, L. (2008). *Reacción en cadena de la polimerasa*. Valencia, España: Universidad Politecnica de valencia.
 36. Podzorski, R., Loeffelholz, R., & Haiden, R. (2006). Detection and Characterization of Molecular Amplification Products: Agarose Gel Electrophoresis, Southern Blot Hybridization, Restriction Enzyme Digest Analysis, and Enzyme-Linked Immunoassay. *Springer*, 243-263.
 37. Rentería, L., Serrato, A., Córtez, J., & Palacios, E. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. México: INECC.
 38. Rodríguez et al. (2003). *Los Alimentos Transgenicos*.
 39. Rodríguez Ferri. (2003). *Lo que usted Debe Saber Sobre los Alimentos Transgénicos (y organismos manipulados genéticamente)*. Valencia.
 40. SAGARPA. (2018). *Atlas Agroalimentario*. Mexico: SIAP.
 41. Sambrook, J., & Rusell, D. (2001). *Molecular Cloning* (3rd ed ed.). New york: Cold Spring Harbor laboratory.
 42. Sanchez, T. (2008). *Plantas Transgenicas*. Madrid: Nature.
 43. SEMARNAT. (2018). *Normatividad en bioseguridad*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
 44. SENASICA. (20 de Enero de 2018). *Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria*. Obtenido de Regulación Nacional de OGM'S:
<https://www.gob.mx/senasica/documentos/regulacion-nacional-de-ogm>
 45. Sunilkumar Ganesan. (2002). *Developmental and Tissue-Specific Expression of CaMV 35S promoter in cotto as revealed by GFP*. *Plant Molecular Biology*.
 46. Tamay de dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la Polimerasa*. México: Mediagraphic.
 47. Trujillo, F. (2017). *Planeación Agrícola Nacional (FRESA MEXICANA)*. CDMX: SAGARPA.
 48. Wrolstad, R. (2013). *Food Carbohydrate Chemistry*. Portland: IFT.
 49. Xu, W. (20 de Julio de 2016). *Development of Accurate Nucleic Acid Detection*



Technology. Obtenido de Functional Nucleic Acids Detection in food safety:

<https://doi.org/10.1007/978>

50. Yonghua, Q. (2017). Transgenic strawberry: State of the art for improved traits. *Biotechnology Advances*, 4-7.
51. Zhao, Y. (2016). Expresión del transgen en fresas impulsadas por un promotor heterólogo específico del floema. *plant cell reports*, 34-43.



ANEXOS

ANEXO 1

Pasos para obtener los primers para la amplificación de *Fragaria × ananassa*

1. Buscar el número del genbank de *Fragaria × ananassa* en NCBI.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AF199508.1>)

NCBI Resources How To

Nucleotide Nucleotide Advanced

GenBank -

Fragaria x ananassa osmotin-like protein (olp) gene, complete cds

GenBank: AF199508.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: []

LOCUS AF199508 1098 bp DNA linear PLN 17-APR-2002
DEFINITION Fragaria x ananassa osmotin-like protein (olp) gene, complete cds.
ACCESSION AF199508
VERSION AF199508.1 GI:6470276
KEYWORDS .
SOURCE Fragaria x ananassa (strawberry)
ORGANISM *Fragaria x ananassa*
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae;
Pentapetalae; rosids; Fabales; Rosales; Rosaceae; Rosoideae;
Potentillaceae; Fragariinae; Fragaria.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1098)
AUTHORS Wu, J., Khan, A.A., Shih, C.T. and Shih, D.S.
TITLE Cloning and sequence determination of a gene encoding an
osmotin-like protein from strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.)
JOURNAL DNA Seq. 12 (5-6), 447-453 (2001)
PUBMED 11913795
REFERENCE 2 (bases 1 to 1098)
AUTHORS Wu, J.L., Khan, A.A., Shih, C.T. and Shih, D.S.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (28-OCT-1999) Biological Sciences, Louisiana State
University, Baton Rouge, LA 70803, USA
FEATURES
source 1..1098
/organism="Fragaria x ananassa"
/mol_type="genomic DNA"
/cultivar="Chandler"
/db_xref="taxon:3747"

2. Entrar a la página de primer quest tool y con el número de genbank oprimir el botón de obtener primers (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>)

Order Menu Products & Services Support & Education Tools

PrimerQuest Tool

Assay Design Results

Sequence Entry

Enter sequence(s) manually

ACCAACCAGCAAGAATCTATTGOCACAAAATGCTTATARTCCACCAAAATCATGAGCCTTCTCAAAAACCT
CCCTACTGTTTGTCCATCCTTTACTTTGCTGCATCAACCGTTAATGCAGCGACCTTCAATAAAAAACAA
CTGGCCCTTCACTGTTTGGGCCGGCGAGTGCAGCGGTGGCAACAACTCGGCACCGGCCAAACATG
GACGATAATGTGGCAGCCGGAACAAAGGAGCTCGCATTTGGCCCCGAACAAATGCAACTTTGATGGAG
CCGACCTGGAGATGCCAAACCGGTGACTGGCGGCTCTCTCCAGTGTCAAGGCTATGGCAGCCCC
CAACACCTTCGCGAATATGACCTTAACCAATACATGAACAGGATTTCTATGATCTCTCGATTGATGG
CTTCATGTCCGATGGACTTATGCTCTCTAAAGGCTGACAGTGGGATCAGATGACCCCGATA
TCAATGACACTGCGCGCCAGTGTGGGCTCCCGGTGCATTTAATGATGCTGACACTGTGCTCAAAAC

Sequence Name GI# 6470276 Clear Sequence Entry

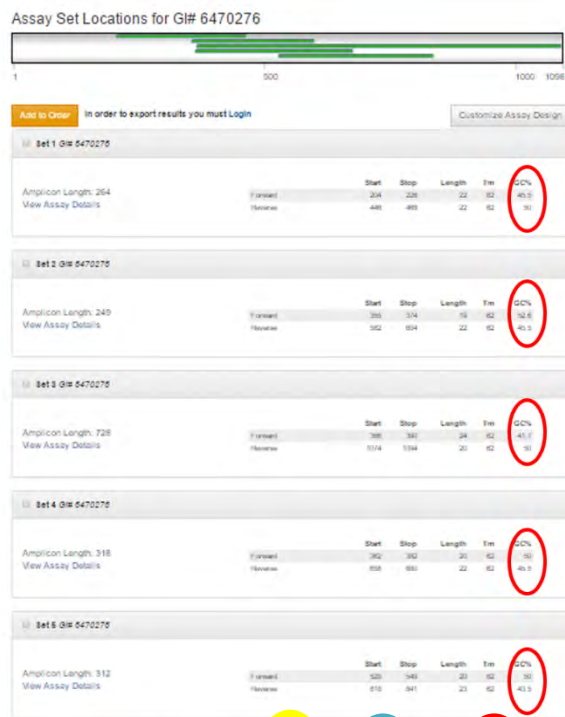
Download sequence(s) using Genbank or Accession ID

Upload sequences in an Excel file

Choose Your Design

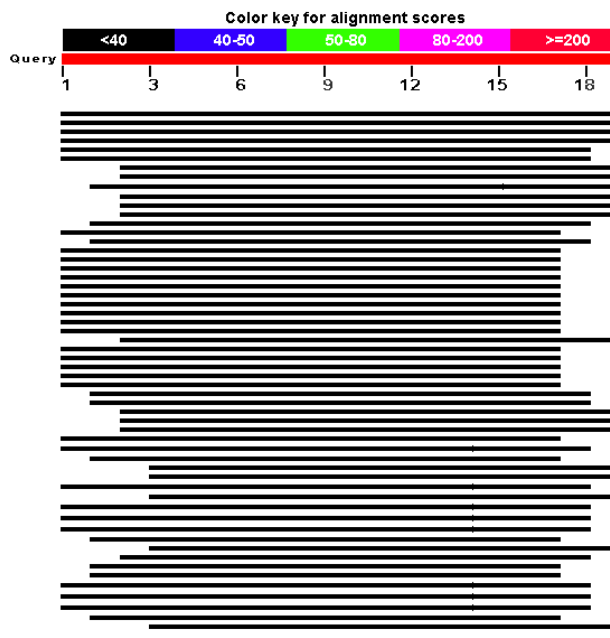
PCR 2 Primers qPCR 2 Primers + Probe qPCR 2 Primers Intercalating Dyes Show Custom Design Parameters

3. Elegir la pareja de primers que contenga un mayor porcentaje de G/C(40-60%)



		Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	<u>CAAACACCCCTCGCCGAATA (Sense)</u>	355	374	19	62	52.6
Reverse	<u>GACCACAGTGACCAGAATTACA (AntiSense)</u>	582	604	22	62	45.5

4. Checar el blast de los dos primers para ver si son específicos a la especie de no ser homólogos no podrá amplificar en la región deseada.





ANEXO 2

El cálculo de la temperatura media T_m para establecer el programa de PCR se muestra a continuación:

$$T_m = [(\#Guanina + \#Citosina)4 + (\#Adenina + \#Timina)2] - 5$$

Tabla 25. Temperaturas de hibridación de los primers de *Fragaria × ananassa*

PRIMERS	T_m	T_m PROMEDIO
FRONTAL <u>CAAACACCCTCGCCGAATA</u>	$T_m = [(2+8)4 + (7+2)2] - 5 = 54^\circ\text{C}$	56.5°C
REVERSO <u>GACCACAGTGACCAGAATTACA</u>	$T_m = [(4+6)4 + (9+3)2] - 5 = 59^\circ\text{C}$	

ANEXO 3

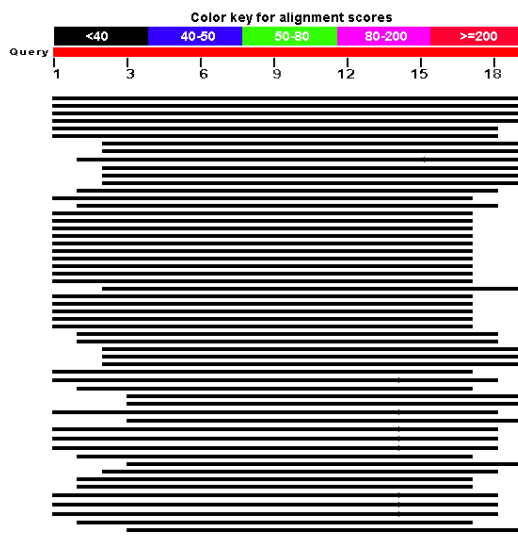
Pasos para obtener los primers para la amplificación de fresa transgénica con el promotor de *Arabidopsis* en el gen AtSUC2

1. - Buscar el número de genbank de la *Arabidopsis* en el gen AtSUC2

The screenshot shows the NCBI GenBank interface for the *A.thaliana AtSUC2* gene. The GenBank ID **X79702.1** is highlighted with a red arrow. The entry includes the following information:

- LOCUS:** X79702 2137 bp DNA linear PLN 14-JUL-2016
- DEFINITION:** A.thaliana AtSUC2 gene.
- ACCESSION:** X79702
- VERSION:** X79702.1
- KEYWORDS:** SUC2 gene; sucrose-H₂ symporter.
- SOURCE:** *Arabidopsis thaliana* (thale cress)
- ORGANISM:** *Arabidopsis thaliana*
- REFERENCE:** 1. Truernit, E. and Sauer, M.
- TITLE:** The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H₂ symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2
- JOURNAL:** *Plant J* 136 (3), 564-570 (1995)
- PUBMED:** 7447585
- REFERENCE:** 2 (bases 1 to 2137)

2. Entrar a la página de primer quest tool y con el número de genbank oprimir el botón de obtener primers (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>)



ANEXO 4

Tabla 26. Temperaturas de Hibridación de los primers de *Arabidopsis thaliana*

PRIMERS	T_m	T_m PROMEDIO
FRONTAL <u>GCGCAGTACAAATAAACAGTGG</u>	$T_m = [(6+4)4 + (9+3)2] - 5 = 59^\circ\text{C}$	57°C
REVERSO <u>TCCGAAGAGGAGACAGTGAA</u>	$T_m = [(7+3)4 + (8+2)2] - 5 = 55^\circ\text{C}$	

ANEXO 5

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

- Búsqueda bibliográfica, ubicando la secuencia de primer (Sanchez, 2008).

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

Irem Karamollaoğlu^a, Hüseyin Avni Öktem^a, Mehmet Mutlu^{b,*}

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

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

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

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

T-NOS sense: 5' GAATCCTGTTGCCGGTCTTG 3'

T-NOS antisense: 5' TTATCCTAGTTTGCGCGCTA 3'