



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“Detección de cacahuete transgénico (*Arachis
hypogaea L.*) mediante la técnica de PCR en
productos frescos y procesados”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

CRISTINA REYNOSA MONTOYA

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

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

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

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

Detección de cacahuete transgénico (*Arachis hypogaea L.*) mediante la técnica de PCR en productos frescos y procesados.

Que presenta la pasante: **Cristina Reynosa Montoya**
Con número de cuenta: **413093161** para obtener el Título de la carrera: **Ingeniería en Alimentos**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de Junio de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. Susana Patricia Miranda Castro	
SECRETARIO	Dra. Elsa Gutiérrez Cortez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
2do. SUPLENTE	I.A. Miriam Alvarez Velasco	

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

LMCF/javg

DEDICATORIAS

Dedico la finalización de este trabajo y a la vez el término de una etapa más de mi vida...

A mis padres, por el apoyo incondicional que me brindan siempre en cada decisión que tomo, por darme la educación, valores y fortaleza para alcanzar mis metas. ¡Lo logre!, y esto es lo mejor que me pudieron haber dado. Los amo.

A mi hermana, por los consejos, palabras y enseñanzas que me has dado, pero sobre todo por exigirme dar más de lo que pensaba que podía. Te amo mi pequeña Lau.

A mis padrinos, Ernestina Montoya y Alberto Reyes, por cuidarme desde que era un bebé y estar ahí en las primeras fases de mi niñez, por darme más hermanas, hermano, y sobrinas. Los quiero muchísimo y toda la familia Reyes Montoya tiene un lugar muy importante en mi vida y en mi corazón.

A Efrain Piña Martínez, por ser mi amigo, mi pareja, mi apoyo en cada paso que di en la carrera y que doy en la vida. Eres lo mejor que me ha pasado. Que Dios te bendiga siempre. Te amo mi I.Q.

A mis tíos Juan, Ramiro, Ignacio y Alejandro, por contar con ustedes en las buenas y en las malas, por sus consejos, y sus anécdotas de cuando eran jóvenes, porque a través de ellos conocí a mi Abuelita Aurelia. Espero que estén orgullosos de mí.

A Karla, Yeceni y Pedrito, los mejores amigos que la UNAM me dio, hicieron que estos 5 años de la carrera fueran increíbles con tantas cosas que vivimos juntos y experiencias que nunca olvidaré. Los quiero.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Francisco Montiel Sosa, por su asesoría y apoyo para la elaboración de este trabajo de tesis.

A la M. en M. Josefina Moreno Lara, por su gran ayuda en la etapa experimental y en la redacción de este trabajo, así como su asesoría y tiempo que me brindo.

Al M. en C. Ernesto Marín Flamand, por su gran apoyo incondicional en el trayecto de la fase experimental en el laboratorio, el tiempo y asesoría, así como la confianza brindada.

A mis sinodales por los consejos, y tiempo que brindaron a la revisión de esta tesis, sus experiencias, recomendaciones y orientación, que me permitieron concluir este proyecto de la mejor manera.

A la UNAM, sobre todo a la FES Cuautitlán y sus profesores: Daniel Mauricio Vicuña Gómez, Miriam Edith Fuentes Romero, Miriam Álvarez Velasco, Francisco Javier López Martínez, Elsa Gutiérrez Cortez, Ricardo Moisés González Reza, Víctor Manuel Ávalos Ávila, por el aprendizaje académico y personal que me dedicaron ya que son parte fundamental de este logro.

A Efrain Piña Martínez, Pedro García Gutiérrez, Viridiana Reynosa Aguiñaga, Eduardo Arzate García, Ignacio Montoya Santos, Víctor Hugo Vásquez Núñez y Fernando Reynosa Aguiñaga, por sus donaciones de semillas y planta de cacahuete para la realización de este proyecto.



INDICE

INDICE DE FIGURAS.....	VIII
INDICE DE TABLAS.....	XIII
RESUMEN.....	14
INTRODUCCIÓN	15
CAPITULO 1. GENERALIDADES.....	17
1.1 Cacahuate (<i>Arachis hypogaea L.</i>).....	17
1.1.1 Origen de la especie	17
1.1.2 Clasificación taxonómica	18
1.1.3 Descripción morfológica (<i>Arachis hypogaea L.</i>)	19
1.1.4 Composición química de la semilla de cacahuate	22
1.1.5 Producción Mundial de cacahuate	24
1.1.6 Producción de cacahuate en México.....	25
1.1.7 Exportación e Importación de cacahuate en México.....	27
1.1.8 Enfermedades que atacan al cultivo	29
1.1.9 Productos derivados del cacahuate	32
1.1.10 Etnobotánica del cacahuate (<i>Arachis hypogaea L.</i>), producto medicinal.....	32
1.2 Organismos genéticamente modificados (OGM)	33
1.2.1 Definición de un Organismo Genéticamente Modificado.....	33
1.2.2 Historia de los Organismos Genéticamente Modificados	34
1.2.3 Cacahuate transgénico	34
1.2.4 Promotores y Terminadores.....	35
1.2.5 Transgenes de importancia agronómica	38
1.2.6 Resistencia a enfermedades bacterianas	38
1.2.7 Tolerancia a factores abiótico	39
1.2.8 Otras aplicaciones.....	39
1.2.9 Situación actual de Organismos Genéticamente Modificados	40
1.2.10 Legislación en México (etiquetado).....	43



1.2.12	Legislación Mundial	44
1.2.13	Impactos de los alimentos transgénicos sobre la salud	46
1.3	Técnicas biotecnológicas para la identificación de transgenes	47
1.3.1	Técnicas basadas en el análisis de proteínas.....	47
1.3.2	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	48
1.3.3	Fundamento y componentes de la PCR	48
1.3.4	Etapas de la reacción	50
1.3.5	Análisis del producto de la PCR	52
1.3.6	Tipos de PCR	57
1.3.7	Aplicaciones de la PCR.....	60
1.3.8	Ventajas y Desventajas de la PCR	60
1.3.9	Criterios a considerar para la selección adecuada de los primers	61
CAPITULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....		64
2.1	Descripción del cuadro metodológico	65
2.2	Materiales y métodos	66
2.2.1	Material biológico	66
2.2.2	Extracción de ADN.....	67
2.2.3	Cuantificación de ADN por medio de absorbancia	69
2.2.4	Diseño de Primers	70
2.3	Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR	71
2.3.1	Etapas y Ciclos de la reacción.....	73
2.3.2	Evaluación de los productos obtenidos de la PCR mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa	75
2.3.3	Visualización de fragmentos	77
CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		78
3.1	Objetivo Particular 1	78
3.1.1	Primers específicos para la detección de cacahuete (<i>Arachis hypogaea L.</i>)	78
3.1.2	Extracción y Cuantificación de ADN de las muestras.....	78
3.1.3	Identificación de cacahuete (<i>Arachis hypogaea L.</i>) como control positivo	79



3.1.4 Prueba de especificidad de los primers diseñados para cacahuate (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	80
3.1.5 Amplificación de cacahuate (<i>Arachis hypogaea</i> L.) en semillas y hojas de las plantas 81	
3.1.6 Identificación de <i>Arachis hypogaea</i> L. con primers del alérgeno Ara h II de cacahuate	84
3.1.7 Control positivo para la detección de <i>Arachis hypogaea</i> L. en PCR directa	84
3.2 Objetivo Particular 2	88
3.2.1 Extracción y Cuantificación de los productos procesados	88
3.3 Objetivo Particular 3	92
3.3.1 Amplificación de maíz transgénico como control positivo para la identificación del promotor CaMV35S.....	92
3.3.2 Amplificación de maíz transgénico como control positivo para la identificación del terminador T-nos.....	93
3.4 Objetivo Particular 4	93
3.4.1 Detección del promotor CaMV35S en productos frescos de cacahuate	94
3.4.2 Detección del promotor CaMV35S en productos elaborados con cacahuate	95
3.4.3 Detección del terminador T-nos en productos frescos de cacahuate	97
3.4.5 Detección del terminador T-nos en productos elaborados con cacahuate.....	98
CONCLUSIONES.....	102
RECOMENDACIONES	103
BIBLIOGRAFÍAS	104
ANEXOS.....	112



INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Semilla de cacahuete (Orendain2012).....	17
Figura 2.	Variedades de plantas de cacahuete por Grégory (Gillier y Silvestre, 1970).....	18
Figura 3.	Planta de cultivo de cacahuete (<i>Arachis hypogaea L.</i>) (Band, 1887).....	19
Figura 4.	A la izquierda: ramificación alternadas; a la Derecha: ramificación secuenciales (Gillier y Silvestre, 1970).....	19
Figura 5.	Sistema radicular de una plántula en la fase de 4 hojas en el tallo principal (Gillier y Silvestre, 1970).....	20
Figura 6.	A: tallo de la inflorescencia, B: ginóforos, C: brácteas en la base de cada rama floral, D: brácteas bífidas en la base de cada flor, E: yema terminal de la inflorescencia (Gillier y Silvestre, 1970).....	21
Figura 7.	Flor de cacahuete. A: cáliz, B: estandarte, C: ala, D: carena, E: anteras, F: columna estaminal, G: estigma (Gillier y Silvestre, 1970).....	21
Figura 8.	Grano de cacahuete (Wines and Olives, 1990).....	22
Figura 9.	Principales países productores de cultivo de cacahuete (Blengino, 2015).....	24
Figura 10.	Estados con mayor y menor producción de cacahuete en México (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, 2016).....	26
Figura 11.	Principales estados productores de cacahuete en México (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, 2016).....	27
Figura 12.	Gráfico de TMAC de la producción de Morelos (SAGARPA, 2009).....	28
Figura 13.	Importaciones agroalimentarias de México proveniente de China (SAGARPA, 2014).....	29
Figura 14.	Diabrotica speciosa (SAGARPA-INIFAP, 2010).....	29
Figura 15.	Insecto chicharrita (Mulder, 2012).....	30
Figura 16.	Insecto nocivo (<i>Spodoptera exigua huber</i>) (Gillier y Silvestre, 1970).....	30
Figura 17.	Daños causado por “Gallina ciega” (<i>Phyllophaga spp.</i>) mostrando larvas y pudriciones (SAGARPA-INIFAP, 2002).....	30
Figura 18.	Pústulas causadas por roya o chahuixtle (<i>P. arachidis</i>) en el tejido (SAGARPA-INIFAP, 2002).....	31
Figura 19.	Planta de cacahuete atacada por <i>Cercospora arachidicola</i> (SAGARPA-INIFAP, 2010).....	31
Figura 20.	Productos derivados del cacahuete (American Peanut council México, 2014; Galdisa, 2014).....	33
Figura 21.	Estructura de un gen en células eucariotas (P: región promotora, C: región codificadora, T: región terminadora, E: exones, I: intrones) (Sánchez, 2010).....	35
Figura 22.	Esquema de un promotor de célula eucariota (Andrés, 2017).....	36
Figura 23.	Terminador rho p independiente (Andrés, 2017).....	37
Figura 24.	Terminador rho p dependiente (Andrés, 2017).....	37
Figura 25.	Investigación Biotecnológica en México y el uso de OGM (SAGARPA-CIBIOGEM, 2011).....	40
Figura 26.	Países productores de cultivos transgénicos (ISAAA, 2016).....	42
Figura 27.	Componentes para realizar la técnica de PCR (Larios, 2013).....	50



Figura 28.	Desnaturalización de la cadena de ADN (Cortázar y Silva, 2004).....	51
Figura 29.	Hibridación de los primers (Cortázar y Silva, 2004).....	51
Figura 30.	Extensión de los primers añadiendo nucleótidos (Cortázar y Silva, 2004).....	52
Figura 31.	Representación esquemática de la técnica PCR (Pérez, s.f.).....	53
Figura 32.	Elementos necesarios para una electroforesis (López y Sandoval, 2013).....	54
Figura 33.	Electroforesis Horizontal, debe cuidarse que el ánodo se coloque hacia el extremo del gel donde corren las muestras para que no salgan del gel (López y Sandoval, 2013).....	55
Figura 34.	Preparación de un gel de agarosa (López y Sandoval, 2013).....	55
Figura 35.	Electroforesis de ácidos nucleicos. Se presenta un gel de agarosa en el cuál se visualiza un marcador de peso molecular junto a la muestras para ayudar en la determinación del peso molecular de los fragmentos (López y Sandoval, 2013).....	56
Figura 36.	Representación de un ensayo de qPCR usando el método Taqman (Rodríguez y Rodríguez, 2006).....	57
Figura 37.	Ejemplo de un fragmento amplificado de PCR con adaptadores (Luque y Herráez, 2006).....	60
Figura 38.	Aplicaciones de la PCR (Bolivar <i>et al.</i> , 2014).....	61
Figura 39.	Programa de la PCR punto final para primers específicos de cacahuete.....	73
Figura 40.	Programa de la PCR directa para primers específicos del alérgeno Ara h II de cacahuete.....	74
Figura 41.	Programa de la PCR directa para el promotor CaMV35S y el terminador T-nos.....	74
Figura 42.	Electroforesis con gel de agarosa al 0.8% a 90V para la identificación de la especie <i>Arachis hypogaea L.</i> (control positivo); (M) marcador de peso molecular de 1 kb; (B) blanco; (C-7) cacahuete de Coyoacán; (C-8) cacahuete de Tlalnepantla; (C-3) cacahuete de Toluca; (H) planta de cacahuete de Morelos.....	79
Figura 43.	Electroforesis con gel de agarosa al 0.8% a 90V para la prueba de especificidad de los primers diseñados para cacahuete (<i>Arachis hypogaea L.</i>); (M) marcador de peso molecular de 1 kb; (B) blanco; (C+) control positivo muestra de cacahuete C-7 cacahuete de Coyoacán; (P) pollo; (Cd) cerdo; (Ca) calabaza; (N) nuez; (Co) cacao.....	81
Figura 44.	Electroforesis con gel de agarosa al 0.8% a 90V para la identificación de la especie <i>Arachis hypogaea L.</i> en semillas de cacahuete; (M) marcador de peso molecular de 1 kb; (B) blanco; (C-3) cacahuete de Toluca; (C-4) cacahuete de Jalisco; (C+) control positivo muestra de Coyoacán C-7; (C-6) cacahuete de Monterrey; (C-8) cacahuete de Tlalnepantla; (C-9) cacahuete de Guanajuato.....	82
Figura 45.	Electroforesis con gel de agarosa al 0.8% a 90V para la identificación de la especie <i>Arachis hypogaea L.</i> en cacahuete; (M) marcador de peso molecular de 1 kb; (B) blanco; (C+) control positivo muestra de Coyoacán C-7; (H) planta de cacahuete de Morelos; (C-5) cacahuete de Oaxaca.....	84



Figura 46.	Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del alérgeno Ara h II del cacahuete con PCR directa; (M1) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (H) planta de cacahuete de Morelos; (C) semilla de cacahuete de Coyoacán; (M2) marcador de peso molecular de 50 pb.....	85
Figura 47.	Electroforesis con gel de agarosa al 3% a 60V para la identificación del alérgeno Ara h II de las semillas de cacahuete con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 50 pb; (B) blanco; (C+) control positivo planta de Morelos H; (C-1) cacahuete de Teoloyucán; (C-2) cacahuete de E. U.; (C-3) cacahuete de Toluca; (C-4) cacahuete de Jalisco; (C-5) cacahuete de Oaxaca.....	87
Figura 48.	Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del alérgeno Ara h II de las semillas de cacahuete con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 50 pb; (B) blanco; (C+) control positivo planta de Morelos H; (C-6) cacahuete de Monterrey; (C-7) cacahuete de Coyoacán CDMX; (C-8) cacahuete de Tlalnepantla; (C-9) cacahuete de Guanajuato.....	87
Figura 49.	Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del alérgeno Ara h II de la especie <i>Arachis hypogaea</i> L. en productos procesados con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo planta de Morelos H; (CRA) crema de cacahuete; (CRG) crema untable de cacahuete; (CHTS) cacahuete salado; (CHTM) botana de cacahuete; (CHTN) cacahuete enchilado.....	89
Figura 50.	Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del alérgeno Ara h II de la especie <i>Arachis hypogaea</i> L. en productos procesados con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo planta de Morelos H; (CRJ) crema de maní; (CHTG) botana surtida de cacahuete.....	90
Figura 51.	Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del alérgeno Ara h II de la especie <i>Arachis hypogaea</i> L. en productos procesados con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (MZP) dulce de mazapán; (MK) chocolate snickers; (CHTC) cacahuete con nuez de la india; (CJN) cacahuete japonés; (C+) control positivo planta de Morelos H.....	91
Figura 52.	Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del alérgeno Ara h II de la especie <i>Arachis hypogaea</i> L. en productos procesados con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo planta de Morelos H; (DPa) palanqueta de cacahuete.....	91
Figura 53.	Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del promotor CaMV35S como control positivo con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico.....	92
Figura 54.	Electroforesis con gel de agarosa al 3% a 60V para la identificación del	



	terminador T-nos como control positivo con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico.....	93
Figura 55.	Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del promotor CaMV35S en productos frescos de cacahuete con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 50 pb; (C+) control positivo maíz transgénico; (C-1) cacahuete de Teoloyucán; (C-2) cacahuete de E. U.; (C-3) cacahuete de Toluca; (C-4) cacahuete de Jalisco; (C-5) cacahuete de Oaxaca; (B) blanco.....	94
Figura 56.	Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del promotor CaMV35S en productos frescos de cacahuete con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico; (C-6) cacahuete de Monterrey; (C-7) cacahuete de Coyoacán CDMX; (C-8) cacahuete de Tlalnepantla; (C-9) cacahuete de Guanajuato; (H) planta de cacahuete de Morelos.....	94
Figura 57.	Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del promotor CaMV35S en productos procesados de cacahuete con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico; (CRA) crema de cacahuete; (CRJ) crema de maní; (CRG) crema untable de cacahuete; (CHTS) cacahuete salado; (CHTM) botana de cacahuete; (CHTG) botana surtida de cacahuete; (CHTN) cacahuete enchilado.....	95
Figura 58.	Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del promotor CaMV35S en productos procesados de cacahuete con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico; (MK) chocolate snickers; (MZP) dulce de mazapán; (CHTC) cacahuete con nuez de la india; (CJN) cacahuete japonés; (DPa) palanqueta de cacahuete.....	96
Figura 59.	Electroforesis con gel de agarosa al 3% a 60V para la identificación del terminador T-nos en productos frescos de cacahuete con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 50 pb; (B) blanco; (C-1) cacahuete de Teoloyucán; (C-2) cacahuete de E. U.; (C-3) cacahuete de Toluca; (C-4) cacahuete de Jalisco; (C-5) cacahuete de Oaxaca; (C+) control positivo maíz transgénico.....	97
Figura 60.	Electroforesis con gel de agarosa al 3% a 60V para la identificación del terminador T-nos en productos frescos de cacahuete con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 50 pb; (B) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico; (C-6) cacahuete de Monterrey; (C-7) cacahuete de Coyoacán CDMX; (C-8) cacahuete de Tlalnepantla; (C-9) cacahuete de Guanajuato; (H) planta de cacahuete de Morelos.....	98
Figura 61.	Electroforesis con gel de agarosa al 3% a 60V para la identificación del terminador T-nos en productos procesados de cacahuete con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico; (CRA) crema de cacahuete; (CRJ) crema de	



	maní; (CRG) crema untable de cacahuate; (CHTS) cacahuate salado; (CHTM) botana de cacahuate; (CHTG) botana surtida de cacahuate; (CHTN) cacahuate enchilado.....	99
Figura 62.	Electroforesis con gel de agarosa al 3% a 60V para la identificación del terminador T-nos en productos elaborados con cacahuate con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico; (MK) chocolate snickers; (CJN) cacahuate japonés; (MZP) dulce de mazapán; (DPa) palanqueta de cacahuate; (CHTC) cacahuate con nuez de la india.....	100



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Subespecies de <i>Arachis</i> .	19
Tabla 2. Composición química de cacahuete sin cáscara.	23
Tabla 3. Composición química de harina de cacahuete.	24
Tabla 4. Estados productores de cacahuete en México.	25
Tabla 5. Productos de Importación de México.	28
Tabla 6. Producto realizados en la empresa.	32
Tabla 7. Principales países productores de OGM en 2016.	41
Tabla 8. Criterios principales para la selección de primers (Cortázar y Silva, 2004).	62
Tabla 9. Muestras naturales para analizar	66
Tabla 10. Productos comerciales a analizar.	66
Tabla 11. Secuencia de primers específicos para cacahuete (<i>Arachis hypogaea L.</i>)	70
Tabla 12. Secuencia de primers específicos del alérgeno Ara h II de cacahuete (<i>Arachis hypogaea L.</i>)	70
Tabla 13. Secuencias de primers del promotor CaMV35S y el Terminador T-nos.	71
Tabla 14. Componentes del kit para PCR punto final por cada muestra.	71
Tabla 15. Componentes del kit para PCR directa por cada muestra.	72
Tabla 16. Cuantificación y purezas de ADN de las muestras de semilla de cacahuete (<i>Arachis hypogaea L.</i>)	78
Tabla 17. Cuantificación y purezas de ADN de las muestras filogenéticamente cercanas y lejanas al cacahuete.	80
Tabla 18. Cuantificación y purezas de ADN de algunas muestras de semillas y plantas de cacahuete (<i>Arachis hypogaea L.</i>)	82
Tabla 19. Cuantificación y pureza del ADN de las semillas de cacahuete.	86
Tabla 20. Cuantificación y purezas del ADN de los productos procesados de cacahuete.	88
Tabla 21. Resumen de resultados de transgénicos en semillas y plantas de cacahuete.	101
Tabla 22. Resumen de resultados de transgénicos en productos procesados que contienen cacahuete.	101



RESUMEN

En México se consume alrededor de 158,000 toneladas de cacahuete al año. La mayoría de los consumidores mexicanos ignoran que es un alimento transgénico y si dichos alimentos son utilizados para la elaboración de los productos que consumen día a día, por ello demandan que las empresas informen en las etiquetas de sus productos naturales como procesados si contienen o no transgénicos, ya que es un derecho como consumidor conocer esa información. Sin embargo, este derecho no está garantizado por la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados vigente en nuestro país. Por tal motivo el objetivo de este trabajo se centro en identificar cacahuete transgénico (*Arachis hypogaea L.*) en semillas, plantas y productos procesados comercializados en México mediante una técnica biomolecular llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación del promotor CaMV35S del virus mosaico de la coliflor y el terminador T-nos de *Agrobacterium tumefaciens*, con el fin de detectar la presencia de Organismos Genéticamente Modificados. Para ello se utilizó como control positivo maíz transgénico. Se evaluaron en total 22 productos; 8 semillas de cacahuete de diferentes regiones del país, una planta de cacahuete, semilla importada de Estados Unidos de América y 12 productos procesados de diferentes marcas que declaran en su etiquetado estar elaborados con cacahuete. Para la identificación de cacahuete (*Arachis hypogaea L.*) se diseñó una pareja de primers específicos de esta especie con programas bioinformáticos, para dicha identificación se utilizó como control positivo la planta de cacahuete. Se extrajeron el ADN de las muestras de cacahuete y de los productos procesados utilizando el protocolo de Sambrook y Russell 2001; se realizaron los amplificados con la PCR punto final y PCR directa para la detección de cacahuete transgénico en los productos frescos y procesados, y se visualizaron los resultados mediante electroforesis con geles de agarosa a diferentes concentraciones.

Se detectaron 6 muestras transgénicas, de las cuales 2 muestras resultaron contener el promotor CaMV35S en su genoma y 4 muestras mostraron contener el terminador T-nos en su genoma. Concluyendo que existe la presencia de cacahuete genéticamente modificado en nuestro país. Cabe mencionar que la mayoría de los cultivos transgénicos aprobados y comercializados utilizan estas secuencias para detectar Organismos Genéticamente Modificados en alimentos.

Palabras clave: cacahuete, transgénico, genéticamente modificado, PCR, CaMV35S, T-nos.



INTRODUCCIÓN

México cuenta con 26 estados productores de cacahuete, teniendo así 75,152.93 hectáreas de superficie de siembra (SAGARPA-INIFAP, 2015b). Los estados con mayor producción y rendimiento de este cultivo son: Chihuahua, Sinaloa, Chiapas, Oaxaca, Puebla, Guerrero y San Luis Potosí (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, 2016).

El consumo a nivel nacional de este producto ha tenido un crecimiento constante en los últimos 6 años, llegando a 158,000 toneladas, que es casi el doble de la producción nacional (FIRA, 2014). El 80% de los cacahuates va destinado a la industria de la confitería-botana, el 10% se emplea para la producción de aceites y el resto se consume fresco (Agropecuaria, 2011). Debido a esto la industria botanera debe importar alrededor de 81 mil toneladas al año (Reforma, 2012).

El cacahuete (*Arachis hypogaea L.*) es originario de Brasil e India. En China y la India son los principales países productores de este cultivo; donde China representa un 45% de la producción mundial (Shan *et al.*, 2011), mientras que en la India su producción es de 35% de todos los cultivos de cacahuete en su país (Keshavareddy *et al.*, 2013). México contribuye con el 2.45% de la producción mundial de cacahuete que se consume (FIRA, 2014).

Sin embargo este cultivo tiende a sufrir grandes pérdidas por resultados de enfermedades fúngicas y vírales en todo el mundo (Sundaresha *et al.*, 2016), además a los cambios abióticos como es el déficit de humedad del suelo de las regiones donde se cultivan (Sarkar *et al.*, 2016). Por lo que esta planta ha sido estudiada para su modificación genética, con el fin de desarrollar genotipos tolerantes a la sequía en los últimos tiempos, utilizando factores de transcripción (Sarkar *et al.*, 2016); como también debilitar las enfermedades fúngicas, esto es desarrollando plantas que sobreexpresan genes que confieren resistencia utilizando tecnología transgénica (Sundaresha *et al.*, 2016).

En India se presentó una amenaza a los cultivos en el 2000, por un virus que causa necrosis en el tallo de la planta de cacahuete. Se encontró asociado a la enfermedad el virus *raya de tabaco*, este pertenece a la familia *bromoviridae*, se propaga principalmente a través de las malas hierbas del cultivo. Por lo que se recurrió a los transgénicos utilizando el gen de la proteína Coat para desarrollar genotipos tolerantes al virus *raya de tabaco* en cacahuete cultivado, se logró a través de la transformación genética intervenida por *agrobacterium* (Mehta *et al.*, 2013).

Por todo lo mencionado anteriormente, el presente estudio se centró en detectar cacahuete transgénico (*Arachis hypogaea L.*). A pesar de que México cuenta con 26 estados productores de este cultivo, no es autosuficiente para cubrir la demanda de este producto ante sus consumidores, por lo que debe importar cacahuete de otros



países. China es uno de los países que importa cacahuete a México, mostrando un índice de que sus cultivos pueden presentar organismos genéticamente modificados. Si bien es cierto, los programas de mejoramiento de cultivos de cacahuete se están realizando en todo el mundo utilizando el enfoque transgénico (Keshavareddy *et al.*, 2013).

México cuenta con la Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010, con el nombre de: Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados- Información comercial y sanitaria; donde indica todas las características con la que es elaborado el producto y fechas importantes para su consumo, sin embargo no exige que se declare que el producto tenga un origen transgénico. Es de gran importancia que el consumidor Mexicano conozca lo que está adquiriendo tanto en semillas como en productos procesados, ya que ellos tienen el derecho de elegir si lo consumen o no.

No obstante el Diario Oficial de la Federación dio a conocer el 30 de Diciembre del 2014 la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SAG/BIO-2014 donde habla de las especificaciones generales de etiquetado de organismos genéticamente modificados que sean semillas o material vegetativo destinados a siembra, cultivo y producción agrícola. Aunque esta norma se encuentra vigente y fue publicada el 26 de mayo del 2017 por SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria), hasta ahora no hay productos que contengan la leyenda "SEMILLA GENÉTICAMENTE MODIFICADA".



CAPITULO 1. GENERALIDADES

1.1 Cacahuete (*Arachis hypogaea* L.)

El nombre cacahuete proviene del náhuatl “*tlacáhuatl*”, compuesto de las palabras *tlalli*, tierra, y *cacahuatl*, cacao, es decir “cacao de la tierra”. También se le conoce como “mani” (Figura 1), pero este nombre proviene del grupo lingüístico *arahuaco* de la cultura prehispánica taína que habilitaban en las islas de la Española, Cuba y Puerto Rico, en el Caribe (CONABIO, 2015).



Figura 1. Semilla de Cacahuete (Orendain, 2012).

1.1.1 Origen de la especie

Las primeras teorías sobre el origen geográfico del cacahuete lo asignaban al Continente Africano, pero se considera actualmente que es originario de la parte meridional del Brasil, ya que ahí crecen espontáneamente las seis especies restantes que constituyen el género. Tiene una gran abundancia, que va desde Brasil hasta Argentina, y se sitúa desde los 10° a los 35° de latitud sur. La presencia endémica del hongo *Puccinia arachidis*, es específico del cacahuete (Robles, 1991).

Se considera que la presencia del cacahuete en África se debe a los portugueses, que lo llevaron a la costa occidental del continente, y los españoles desde México lo llevaron a Filipinas, donde se extendió a China, Japón, Australia, India y África (Costa Oriental) (Robles, 1991).



1.1.2 Clasificación taxonómica

El género *Arachis* pertenece a la familia de las Leguminosas, a la subfamilia de las Papilionáceas. Durante largo tiempo, la única especie conocida del género era la *Arachis hypogaea* descrita por Linneo en 1753, y hasta 1838 fueron descritas por Bentham cinco nuevas especies espontáneas en Brasil (Gillier y Silvestre, 1970).

Ha sido Grégory, el que ha demostrado el interés de basar la clasificación del cacahuate en el sistema de ramificación, y sobre todo en el orden de aparición de las yemas reproductoras y vegetativas. Bunting, ha precisado este criterio al distinguir dos grandes series con ramificaciones alternativas y ramificaciones en secuencia, correspondientes respectivamente a los grupos “Virginia” por una parte, y “Valencia y “Spanish” por otra, de Grégory. Actualmente, son las más utilizadas y se apoyan en una base genética indiscutible (Figura 2) (Gillier y Silvestre, 1970).

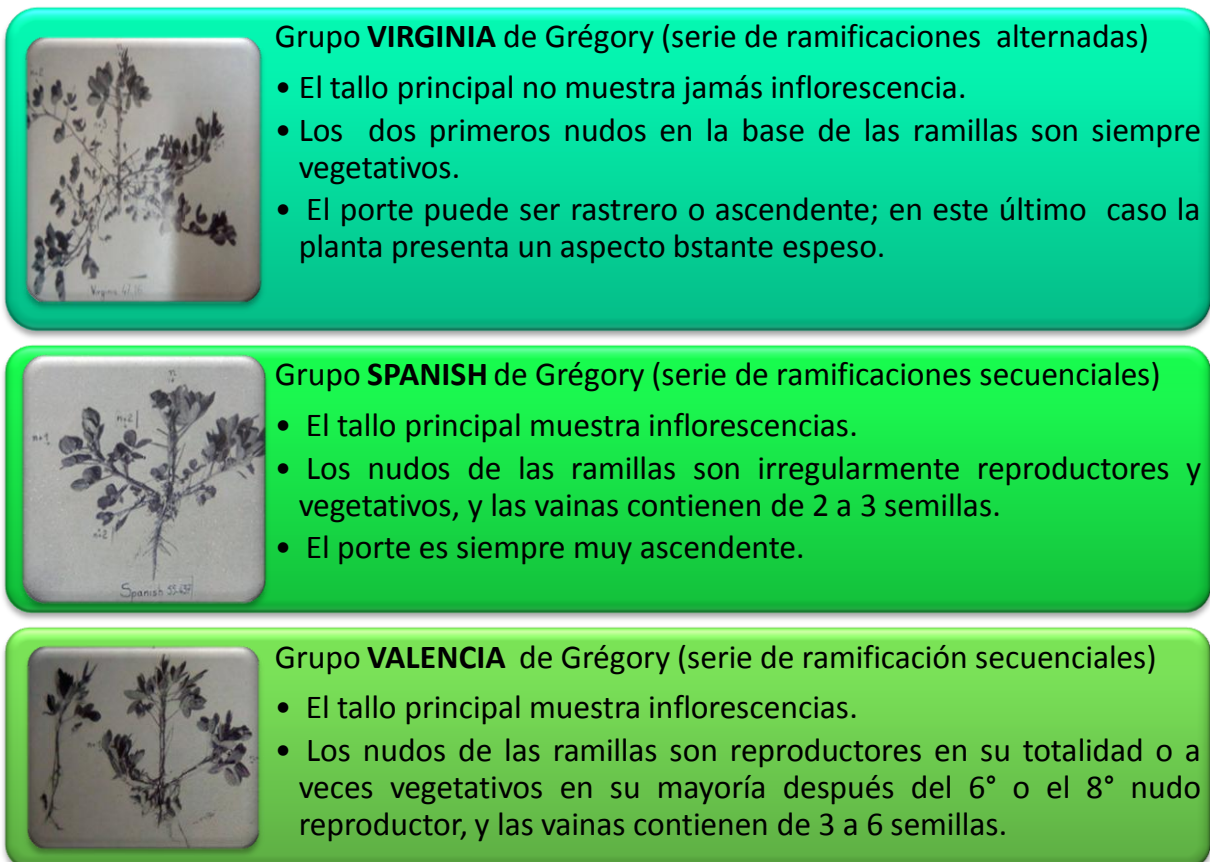


Figura 2. Variedades de plantas de cacahuate por Grégory (Gillier y Silvestre, 1970).

Estas variedades botánicas están comprendidas en 2 subespecies que de acuerdo con Krapovickas (1968 y 1973) son las que se muestran en la Tabla 1 (Sánchez, 1992).

Tabla 1. Subespecies de *Arachis*.

Subespecie	Varietad	Grupo
<i>hypogaea</i>	<i>hypogaea</i>	Virginia
	<i>Hirsuta</i> Koehler	Peruano
<i>Fastigiata</i> Waldron	<i>fastigiata</i>	Valencia
	<i>vulgaris</i>	Spanish

Sánchez, 1992

1.1.3 Descripción morfológica (*Arachis hypogaea* L.)

El cacahuate cultivado se clasifica en la sección de las axonomorfas anuales (Figura 3) (Gillier y Silvestre, 1970).

Figura 3. Planta de cultivo de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) (Band, 1887).

➤ PORTE

Los cacahuates cultivados son ascendentes o rastreros.

El tallo principal de orden n , nacido de la yema terminal del epicotilo, es siempre ascendente, están en general pocos ramificados.

En el tipo rastrero, dan dos ramillas vegetativas y dos ramillas reproductoras (Figura 4) (Gillier y Silvestre, 1970).

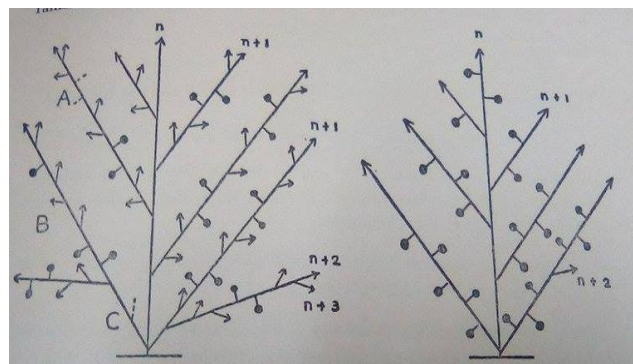


Figura 4. A la Izquierda: ramificación alternadas; a la Derecha: ramificación secuenciales (Gillier y Silvestre, 1970).



➤ TALLOS

El tallo principal y las ramificaciones primarias pueden medir de 0.20 a 0.70m de longitud, según las variedades y las condiciones del medio. Las ramificaciones son siempre herbáceas, de color verde claro, verde oscuro, o más o menos púrpureo. Son de sección angulosa en su juventud y se tornan cilíndricas al envejecer (Gillier y Silvestre, 1970).

➤ RAÍCES

El sistema radicular está formado por un pivote central que puede hundirse a más de 1.30m en los suelos cultivados, y por raíces laterales que nacen a diversas alturas de este pivote y se ramifican abundantemente para constituir una densa cabellera, presenta unas formaciones leñosas (Figura 5) (Gillier y Silvestre, 1970).

Como tantas leguminosas, las raíces del cacahuate presentan nódulos debidos a la asociación simbiótica de la planta con bacterias que fijan el nitrógeno. Estas aparecen unos quince días después del brote; se encuentran sobre el pivote (Gillier y Silvestre, 1970).

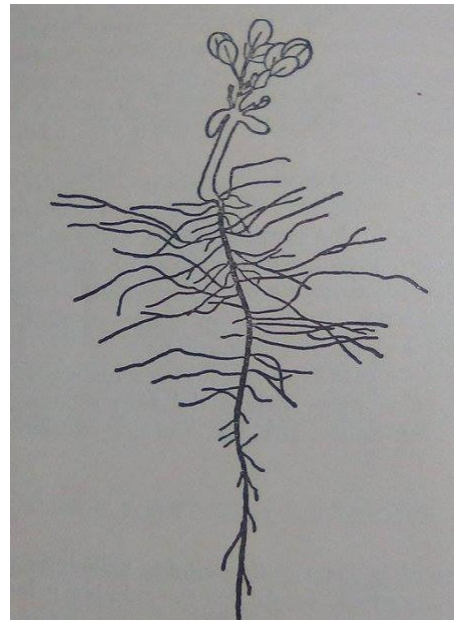


Figura 5. Sistema radicular de una plántula en la fase de 4 hojas en el tallo principal (Gillier y Silvestre, 1970).

➤ HOJAS

Las hojas son pinadas con dos pares de folíolos sustentados por un peciolo de 4 a 9 cm de longitud. Los folíolos son subsentados y opuestos de forma más o menos elíptica, de color verde más o menos oscuro o más o menos amarillo según las variedades. Los folíolos tienen estomas en ambas caras y comprenden un mesófilo esponjoso que se presenta con un tejido capaz de almacenar agua, se repliegan durante la noche y se entienden de día (Gillier y Silvestre, 1970).

➤ INFLORESCENCIAS

Las inflorescencias del cacahuate se presentan de 3 a 5 flores. Nacen en las ramillas vegetativas, en la axila de una flor completa o rudimentaria. La inflorescencia se presenta como una ramilla vegetativa, generalmente de dimensiones muy reducidas (Figura 6) (Gillier y Silvestre, 1970).

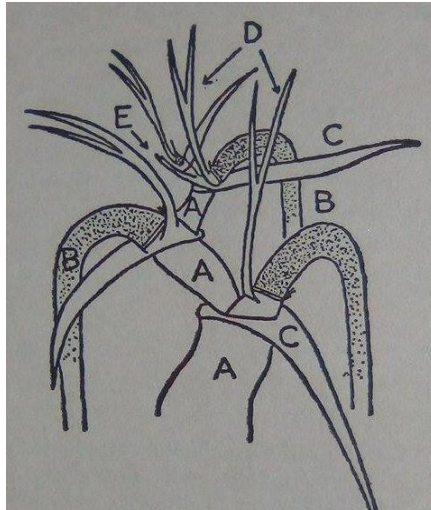


Figura 6. A: tallo de la inflorescencia, B: ginóforos, C: brácteas en la base de cada rama floral, D: brácteas bífidas en la base de cada flor, E: yema terminal de la inflorescencia (Gillier y Silvestre, 1970).

➤ FLORES

Las flores son amarillas, papilionáceas y sentadas. El cáliz está compuesto por cinco sépalos soldados por sus bases en un tubo calicinal (*hypanthium*) pubescente. El estandarte presenta diversos matices amarillos y posee unas estrías de tonalidades y dibujos diferentes, caracteres que pueden servir para distinguir los tipos y variedades. Las partes que conforman la flor se pueden ver en la Figura 7 (Gillier y Silvestre, 1970).

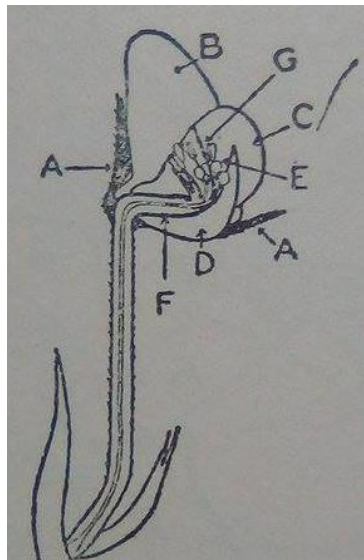


Figura 7. Flor de cacauate. A: cáliz, B: estandarte, C: ala, D: carena, E: anteras, F: columna estaminal, G: estigma (Gillier y Silvestre, 1970).



➤ FRUTO

Después de la fecundación, la base del ovario se alarga para permitir la aparición de un órgano, mal llamado ginóforo, que es, en realidad, una parte del propio fruto y en cuyo extremo, se desarrolla la vaina después de su penetración en el suelo. El ginóforo tiene una longitud que no pasa de los 15 cm, mientras se desarrolla verticalmente, la vaina adquiere una posición horizontal, entre 2 y 7 cm bajo la superficie del suelo. La vaina está formada por una cubierta y de uno a cuatro granos (Gillier y Silvestre, 1970).

El color amarillo paja de la cubierta está muy influenciado por los factores externos, tales como el color de la tierra y las condiciones del secado. Las dimensiones de las vainas varían aproximadamente entre 1 x 0.5 cm y 8 x 2 cm. Las semillas son de dimensiones, formas y colores diferentes según las variedades. Su peso suele oscilar entre 0.2 y 2 gramos; su forma puede ser esférica, elíptica o más o menos alargada. El color del tergumento seminal puede ser blanco, rosado, rojo, violáceo, negro o incuso rojo y blanco (Figura 8) (Gillier y Silvestre, 1970).



Figura 8. Grano de cacahuete (Wines and Olives, 1990).

1.1.4 Composición química de la semilla de cacahuete

En la Tabla 2, se muestra la composición química del cacahuete sin cáscara, y en la tabla 3 se muestra la composición química de la harina de cacahuete (Verdú *et al.*, 2009).



Tabla 2. Composición química de cacahuate sin cáscara.

Cantidades x 100g de porción	Cantidad
Energía (Kcal)	581
Energía (Kj)	2428
Agua (g)	5
Proteína (g)	27
Grasa total (g)	49
AG Saturados (g)	9.2
AG Monoinsaturados	23.5
AG Poliinsaturado	14
Hidratos de carbono (g)	8.5
Fibra (g)	8.1
Sodio (mg)	3.3
Potasio (mg)	601
Calcio (mg)	72
Magnesio (mg)	329
Fosforo (mg)	432
Hierro (mg)	4.9
Cobre (mg)	1.02
Zinc (mg)	4.3
Cloro (mg)	7
Manganeso (mg)	2.1
Vitamina B ₁ (mg)	0.2
Vitamina B ₂ (mg)	0.14
Vitamina B ₆ (mg)	0.5
Vitamina E (mg)	8.1

Verdú et al., 2009



Las semillas oleaginosas tienen una composición equilibrada en proteínas, hidratos de carbono y grasas. Después de extraer el aceite, el componente principal, es la harina resultante, donde su contenido mayoritario son las proteínas (Tabla 3) (Primo, 1987).

Tabla 3. Composición química de harina de cacahuete.

COMPONENTE	Id de cacahuete (%)
Proteínas	49
Hidrato de carbono	38
Grasas	3.5
Cenizas	3.5
Fibra	3
Humedad	3

Primo, 1987

1.1.5 Producción Mundial de cacahuete

Los principales países productores de cacahuete se encuentran en la Figura 9.

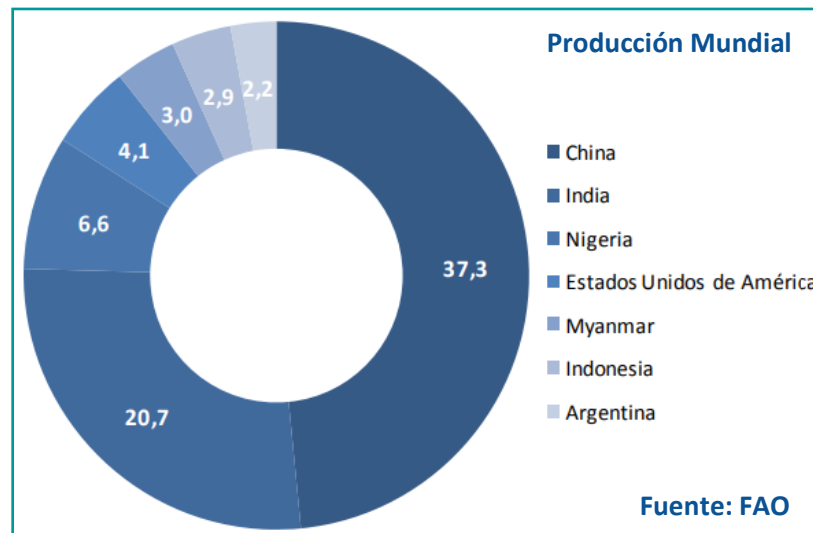


Figura 9. Principales países productores de cultivo de cacahuete (Blengino, 2015).

La producción mundial de cacahuete ronda las 45.654 millones de toneladas y es liderada por China con un 37% de la producción total, seguida por India con el 20% del total, con alrededor de 9 millones de toneladas. China ha conseguido posicionarse como primer productor y exportador de cacahuete en el mundo, aprovechando sus ventajas comparativas en términos de condiciones de suelos y zonas productivas, rendimientos y mano de obra (Blengino, 2015).



El rendimiento de este cultivo varía en gran medida según el clima, la calidad del suelo, el sistema de cultivo y la variedad de semilla cultivada: más de 2ton/ha en los Estados Unidos; 1.8-1.9 ton/ha en Argentina; alrededor de 1 ton/ha en Indonesia, Brasil, Tailandi, México, Sudáfrica y Myanmar; y apenas 0.5-0.7 ton/ha en los demás países africanos (CCI, 2012).

1.1.6 Producción de cacahuete en México

México cuenta con 26 estados productores de cacahuete, algunos con producciones arriba de 22,000 toneladas al año, y otras con producciones muy bajas de 6 toneladas al año (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, 2016).

El 90% de la producción en México se destina a consumo como fruto seco, por lo que es poca la participación como productor de aceite y el follaje se usa como forraje para el ganado (SAGARPA-INIFAP, 2015b).

A continuación en la Tabla 4 y en la Figura 10 se muestra la producción nacional de cacahuete, desde el estado con mayor producción y rendimiento de siembra, hasta el que aporta menor porcentaje de esté.

Tabla 4. Estados productores de cacahuete en México.

POSICIÓN	ESTADO	PRODUCCIÓN (Ton)	RENDIMIENTO (Ton/Ha)
1	Chihuahua	22,899	2.98
2	Sinaloa	18,466	1.2
3	Chiapas	15,954	2.17
4	Oaxaca	10,054	1.74
5	Puebla	9,012	1.31
6	Guerrero	4,628	1.68
7	San Luis Potosí	2,683	1.01
8	Nayarit	1,918	2.12
9	Morelos	1,793	1.8
10	Guanajuato	1,770	2.18
11	Sonora	1,583	1.53
12	Michoacán	1,316	1.63
13	Jalisco	1,101	1.5
14	Veracruz	676	1.05
15	Campeche	603	1.12
16	Hidalgo	398	1.18
17	Zacatecas	382	1.79
18	Durango	243	0.8
19	Tamaulipas	150	0.81



20	México	117	1.77
21	Colima	105	1.02
22	Yucatán	51	1.95
23	Nuevo León	36	1.2
24	Aguascalientes	30	1.87
25	Quintana Roo	7	0.48
26	Querétaro	6	1.5

Secretaría de Desarrollo Agropecuario, 2016

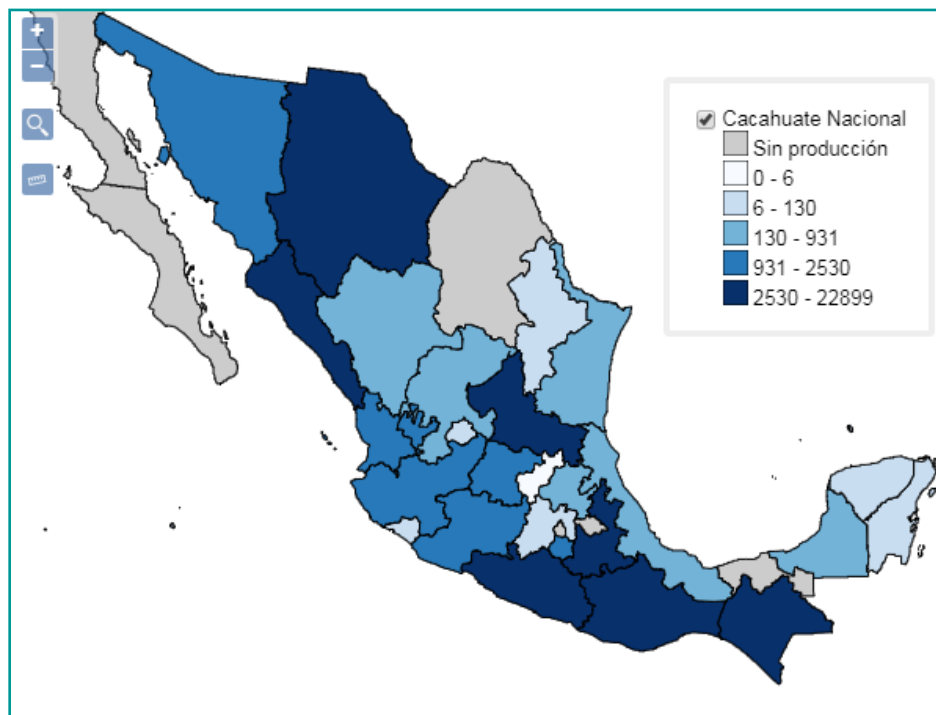


Figura 10. Estados con mayor y menor producción de cacahuete en México (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, 2016).

Haciendo una recopilación con la información ya mencionada (Figura 11), podemos decir que los principales estados con mayor producción de cacahuete en México son: Chihuahua 23.86% de producción nacional, Sinaloa 19.24%, Chiapas 16.62%, Oaxaca 10.47%, Puebla 9.39%, Guerrero 4.82% y San Luis Potosí 2.8% (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, 2016).

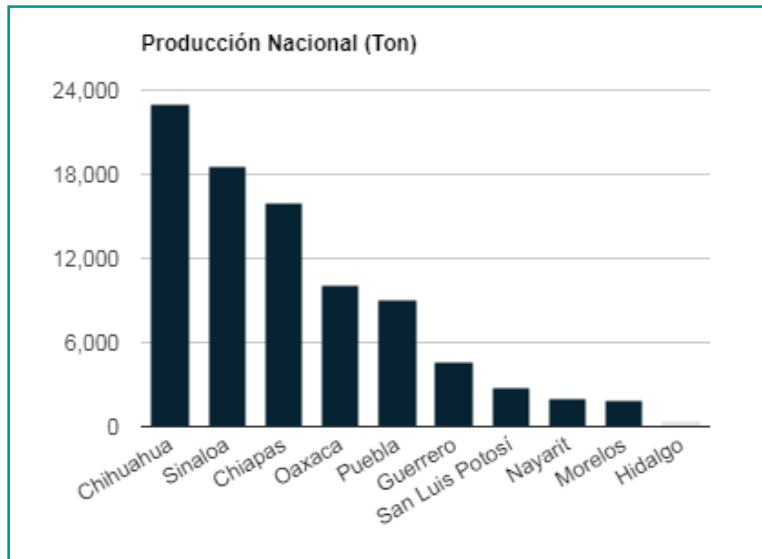


Figura 11. Principales estados productores de cacahuete en México (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, 2016).

1.1.7 Exportación e Importación de cacahuete en México

En México se pretende implementar nuevas tendencias para el cultivo del cacahuete. Un ejemplo es el estado de Morelos, ya que el cacahuete es un cultivo que tiene un mercado potencial que podría sustituir importaciones en México de Estados Unidos, China, Japón, Canadá y la Unión Europea (SAGARPA, 2009).

En la Figura 12 se muestra la gráfica donde se analiza la dinámica de la producción estatal en relación con la variación en la demanda nacional de importaciones de los productos de interés. Las variables de análisis son la tasa media anual de crecimiento (TMAC) de la producción estatal respecto a la TMAC de las importaciones del producto particular, en el periodo 2003 a 2007 (SAGARPA, 2009).

El cacahuete representa uno de los principales productos con potencial, al que debieran enfocarse los esfuerzos, dado que en el país está creciendo su demanda, y su producción por otra parte, está decreciendo en Morelos (SAGARPA, 2009).

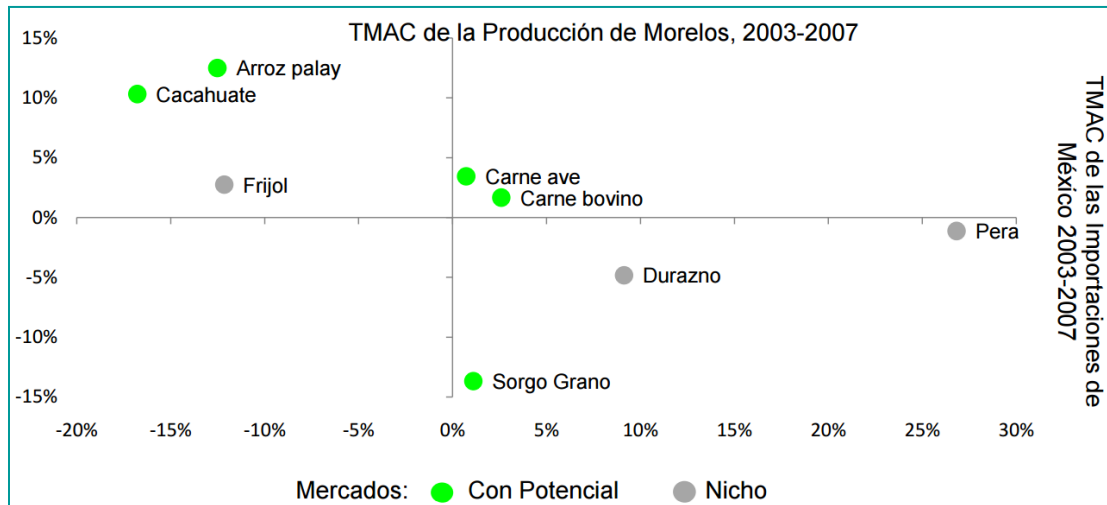


Figura 12. Gráfico de TMAC de la Producción de Morelos (SAGARPA, 2009).

En la Tabla 5 se pueden apreciar los productos que presentan una mayor oportunidad para su impulso en el estado “El Tamaño del Mercado 2007” nos indica el total de las compras que México efectuó ese año al extranjero de estos productos, en millones de dólares, y en la columna “Participación en el Mercado Interno 2007” el porcentaje que esas importaciones representaron en el mercado interno. El cacahuate, también representa oportunidades de negocio dentro de un mercado de tamaño de proporción intermedio (SAGARPA, 2009).

Tabla 5. Productos de Importación de México.

	Productos de interés en el mercado nacional	Tamaño del Mercado 2007 (millones de dólares)	Participación en el mercado interno 2007
Con Potencial	Carne bovino*	1,278	20.06%
	Sorgo grano*	347	23.24%
	Carne ave*	334	14.34%
	Arroz palay*	248	74.58%
	Cacahuate*	111	58.30%
Nicho	Pera*	88	77.63%
	Frijol*	67	8.37%
	Durazno	34	22.94%

* Estos productos presentan potencial competitivo a nivel nacional.

SAGARPA, 2009

Como se ha mencionado anteriormente, China es uno de los principales países de cultivo de cacahuate. Como se sabe, la siembra de cacahuate en México es mínima a



comparación de China, por lo que México tiende a importar de China un 5% de cacahuate a comparación de otros productos agroalimentarios, el cacahuate se encuentra en un nivel considerable con respecto a los demás (Figura 13) (SAGARPA, 2014).

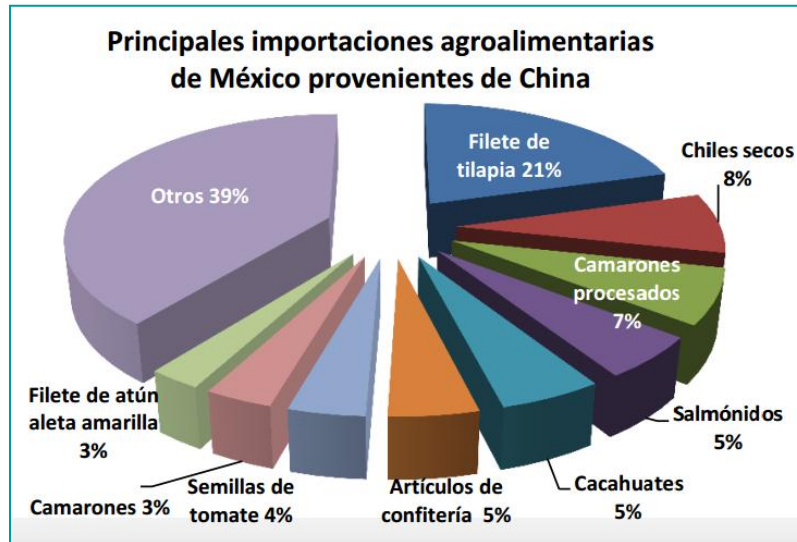


Figura 13. Importaciones agroalimentarias de México proveniente de China (SAGARPA, 2014).

1.1.8 Enfermedades que atacan al cultivo

Existen diversos factores que tienden a atacar al cultivo de cacahuate, estos suelen ser enfermedades y algunas plagas de insectos, en las regiones de producción del cultivo. Las plagas que más atacan al cacahuate son: larva de diabrotica, gallina ciega, chicharritas, gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano falso medidor (*Trichoplusia*) y gusano peludo (*Estigmene acrea*) (SAGARPA-INIFAP, 2015).

- ❖ **Diabroticas:** Estos insectos aparecen desde que la planta emerge y permanece hasta la cosecha; los daños se manifiestan por los orificios semicirculares que hacen en las hojas y con los cuales pueden matar a una planta pequeña. El control de esta plaga es más importante cuando la planta es pequeña (Figura 14) (SAGARPA-INIFAP, 2015a).



Figura 14. Diabrotico speciosa (SAGARPA-INIFAP, 2010).



Figura 15. Insecto chicharrita (Mulder, 2012).

❖ **Chicharritas:** El daño lo ocasionan succionando la savia de las plantas, causando amarillamiento a las hojas que posteriormente se secan en su totalidad comenzando por los bordes. Este daño aparenta una madurez prematura pero la realidad es que la chicharrita lo ha causado. El control debe hacerse cuando por primera vez, se encuentran ninfas al examinar el envés de las hojas (Figura 15) (SAGARPA-INIFAP, 2015a).

Para el control de estas dos plagas de insectos se aplica Paratión metílico 50% en dosis de 1.0 litro por hectárea o Malatión 1000E, en dosis de 1.0 a 1.5 litros por hectárea (SAGARPA-INIFAP, 2015a).

❖ **Gusano soldado (*Spodoptera exigua* Huber):** Las palomillas son color café grisáceo; las larvas son color verde claro con la cabeza negra y las de mayor tamaño son de color verde oscuro con bandas claras a lo largo del cuerpo (Figura 16) (SAGARPA-INIFAP, 2002).



Figura 16. Insecto nocivo (*Spodoptera exigua* huber) (Gillier y Silvestre, 1970).



Figura 17. Daños causados por "Gallina ciega" (*Phyllophaga* spp.) mostrando larvas y pudriciones (SAGARPA-INIFAP, 2002).

❖ **Gallina ciega Orden Coleóptera:** Los adultos son escarabajos de color café a café oscuro; miden de 1.5 a 2.0cm de largo; las larvas son blancas con la cabeza café. Se alimentan de raíces y frutos de la planta de cacahuate, así como de otras especies cultivadas y malezas (Figura 17) (SAGARPA-INIFAP, 2002).

Para el control de estos dos tipos de gusanos se puede aplicar Orthene al 75%, con dosis de 750 gramos a un kilogramo por hectárea (SAGARPA-INIFAP, 2015c).



Las enfermedades que llegan a atacar al cacahuete son: Mancha de la hoja o peca, roya o chahuixtle y marchitez.

- **Roya o chahuixtle (*Puccinia arachidis*):** Se caracteriza por la aparición de pústulas anaranjadas en la cara inferior de la hoja, a las cuales corresponden puntos amarillos en la cara superior; las hojas toman un aspecto quemado, se enrollan y se caen antes de tiempo. Se presenta cuando las plantas empiezan a cerrarse, aproximadamente a los 45 días de nacidas, y llega a ocasionar daños severos (Figura 18). La enfermedad aparece cuando hay mucha humedad en el ambiente (SAGARPA-INIFAP, 2015c).

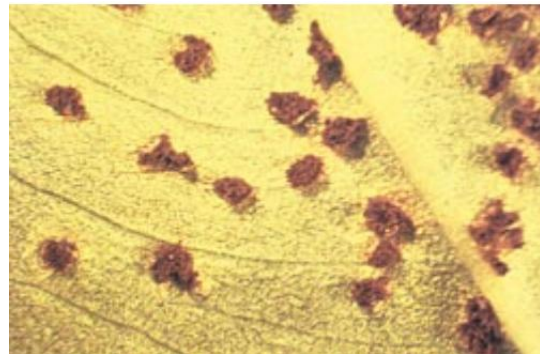


Figura 18. Pústulas causadas por roya o chahuixtle (*P. arachidis*) en el tejido (SAGARPA-INIFAP, 2002).

Para el control de esta enfermedad se utiliza Bravo 720, a razón de 1.5 a 2.5 kilogramos por hectárea y Benlate 50 DE a una dosis de 250 a 300 gramos por hectárea (SAGARPA-INIFAP, 2015c).



Figura 19. Planta de Cacahuete atacada por *Cercospora arachidicola* (SAGARPA-INIFAP, 2010).

- **Mancha de la hoja o peca:** Esta enfermedad puede presentarse en cualquier etapa del cultivo. El primer síntoma es la aparición de puntos pardos o negros semiredondos que se multiplican y se juntan hasta cubrir toda la hoja. El ataque grave de estos hongos (*Cercospora arachidicola*), ocasiona la caída temprana de las hojas, que es uno de los síntomas más típicos de la enfermedad; además el ciclo vegetativo se acorta y muchos frutos no alcanzan a madurar, produciendo solamente unos granos pequeños y arrugados (Figura 19) (SAGARPA-INIFAP, 2015c).

Se ha observado que esta enfermedad causa daños menos graves que la roya, y su control se puede realizar al mismo tiempo que se controla la roya, con el mismo producto y dosis por hectárea (SAGARPA-INIFAP, 2015c).



- **Marchitez:** Las raíces de las plantas afectadas toman un color marrón a café, así como el pivote. En el tallo principal aparece una mancha pardo-rojiza; las hojas y los tallos adquieren una tonalidad café y después negruzca, toda la planta muere. En las vainas causan manchas rojizas y la cubierta se vuelve gris y con numerosos puntitos negros. La enfermedad está presente en el suelo, el cual contiene los hongos que atacan a la planta rápidamente. Los daños pueden ser mayores en condiciones de mucha sequía y altas temperaturas (SAGARPA-INIFAP, 2015c).

Algunas medidas de control de esta enfermedad son: efectuar rotaciones con cultivos resistentes a esta enfermedad, como sandía, maíz y sorgo y evitar daños a raíces y frutos durante las labores (SAGARPA-INIFAP, 2015c).

1.1.9 Productos derivados del cacahuete

Existen empresas como “Golden Peanut Specialty Products” que utilizan el cacahuete como materia prima para darle un proceso y construir subproductos del grano, estos se mencionan en la Tabla 6.

Tabla 6. Producto realizados en la empresa.

PRODUCTO	CARACTERÍSTICAS
Harina de cacahuete	12% de grasa y 3 niveles de tostado
Extracto de cacahuete	100% natural, sabor único
Aceite de cacahuete	Aroma y sabor a cacahuete tostado

Golden Peanut Specialty Products, 2015

Otra empresa que elabora subproductos del cacahuete es “Galdisa”, esta se encuentra ubicada en Ciudad de México (CDMX), algunos de sus productos se presentan en la Figura 20.

Los productos que se encuentran con un asterisco, son elaborados en la empresa American Peanut council México.

1.1.10 Etnobotánica del cacahuete (*Arachis hypogaea L.*), producto medicinal

Esta planta es empleada en Veracruz para aliviar inflamaciones internas, en este caso se toma un preparado de las semillas molidas y mezcladas en agua; para tratar la “alferecía” se bebe como té un cocimiento de las hojas; y para el “ojero” se come una pasta elaborada a partir de las vainas (Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana, 2009).



En Morelos, se le utiliza para "producir leche", con tal motivo se recomienda ingerir la decocción de las semillas o tomar atoles de cacahuete. En Sonora las semillas y el aceite se emplean en problemas de debilidad sexual y aborto, flujo uterino, diabetes y trastornos capilares (Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana, 2009).

En Puebla se hace uso de esta planta contra los parásitos intestinales como lombrices (Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana, 2009).

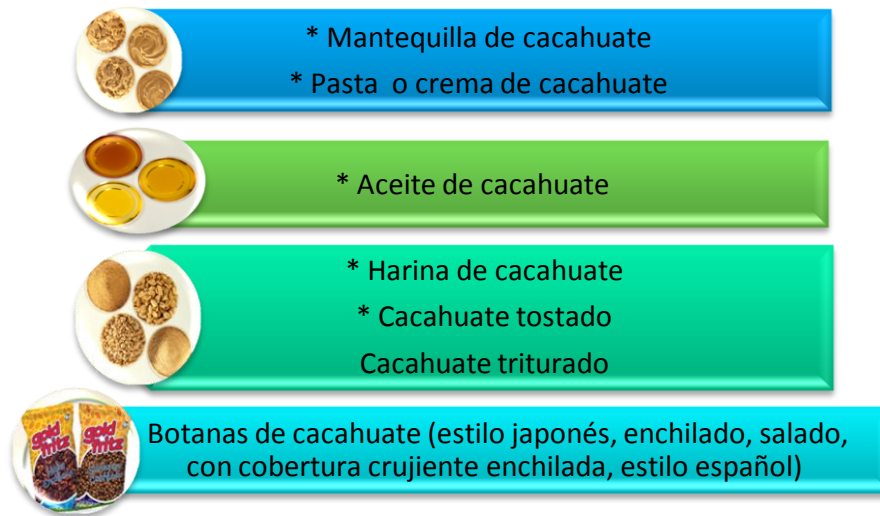


Figura 20. Productos derivados del cacahuete (American Peanut council México, 2014; Galdisa, 2014).

1.2 Organismos genéticamente modificados (OGM)

1.2.1 Definición de un Organismo Genéticamente Modificado

La Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) considera y define como "organismo genéticamente modificado" a aquel en el que cualquiera de sus genes u otro material genético ha sido modificado por medio de diferentes técnicas donde se ocupa el ADN (Pengue, 2000).

Los OGM también llamados transgénicos u Organismos Vivos Modificados (OVM), han sido desarrollados como una alternativa de productos biológicos, a los que se les confieren características deseadas específicas tales como resistencia a insectos plagas y/o la tolerancia a herbicidas (glifosato y glufosinato de amonio) y en cada desarrollo científico-técnico se caracterizan genes para que los ingenieros genéticos puedan introducirlos a diferentes organismos (COFEPRIS, 2013).



1.2.2 Historia de los Organismos Genéticamente Modificados

Los alimentos transgénicos, en dos palabras, son alimentos que contienen Organismos Genéticamente Modificados (OGM) (Riechmann, 2002).

Esta capacidad de transferir un gen de un organismo a otro emparentado o no, tuvo su origen en los descubrimientos de cómo la información genética es almacenada, duplicada y transmitida a la progenie. En sus aspectos generales, tres han sido los descubrimientos que ayudaron a desarrollar y permitir el crecimiento que ha tenido la biotecnología (Pengue, 2000).

El Primero fue el descubrimiento y la descripción de la molécula del ADN (Ácido desoxirribonucleico). Un gen es un segmento de ADN que induce a la célula a producir cierta proteína, desempeñar cierta función específica, o reproducirse a sí misma (Pengue, 2000).

El Segundo descubrimiento fue que cierto tipo de ADN bacteriano asume la forma de anillos flotantes llamados plásmidos. Los plásmidos son intercambiados por las bacterias. Esta característica los hacía mensajeros ideales para llevar nueva información genética a las bacterias o a las células de las plantas (Pengue, 2000).

El Tercer descubrimiento fue el de enzimas especiales, que en la naturaleza, cortan y pegan ADN. Se usan enzimas de restricción para cortar un gen y abrir el plásmido. Los extremos cortados del gen nuevo y del plásmido se atraen unos a otros, la aplicación de otra enzima denominada ligasa, une firmemente en su lugar el nuevo gen (Pengue, 2000).

1.2.3 Cacahuete transgénico

La biotecnología moderna ofrece herramientas para el mejoramiento de plantas que pueden ayudar a hacer frente a varios problemas que afectan actualmente a los cultivos como condiciones de estrés climático (sequía, bajas temperaturas, etc.) y la susceptibilidad a plagas y enfermedades (Hernández, 2015).

El cacahuete es uno de los cultivos que tiende a tener estos problemas por las zonas de siembra, las plagas y enfermedades que pueden llegar a presentar daño significativos, por ello la ingeniería genética a decidido volverlo resistente a estos factores, es decir, someterlo a modificaciones genéticas en su organismo para ser resistente a enfermedades como *Aspergillus flavus*, *Cercospora arachidicola* (Sundaresha *et al.*, 2016), virus *raya de tabaco* (Mehta *et al.*, 2013), el tikka causado por *Cercospora arachidicola* y *Cercosporidium personatum* (Rohini y Sankara, 2000) entre otras. Al déficit de humedad del suelo por las sequías y cambios abióticos que puede llegar a presentar el cultivo (Sarkar *et al.*, 2016).



1.2.4 Promotores y Terminadores

En la Figura 21 se distinguen las respectivas regiones de una molécula de ADN.

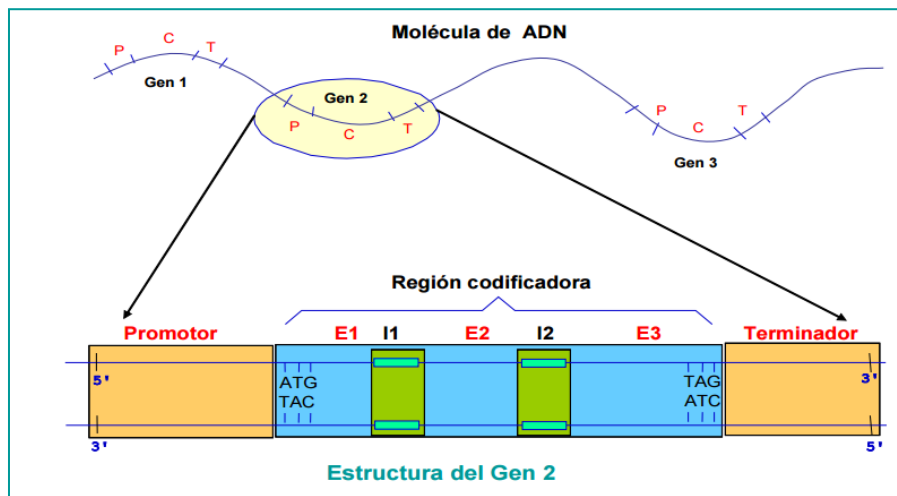


Figura 21. Estructura de un gen en células eucariotas (P: región promotora, C: región codificadora, T: región terminadora, E: exones, I: intrones) (Sánchez, 2010).

PROMOTOR

El promotor es la secuencia de ADN necesaria para que el ARN (Ácido ribonucleico) polimerasa se una al molde y lleve a cabo la reacción de iniciación. Como secuencia del ADN cuya función es ser reconocida por proteínas, el promotor difiere de las secuencias cuyo rol es ser transcritas o traducidas. La información para que un promotor funcione está directamente en una secuencia del ADN; su estructura será la señal. Por el contrario, las regiones expresadas tienen significado solamente después de que la información se transfiere en la forma de otro ácido nucleico o proteína (Cruz, 2017).

En los promotores eucariotas, que son muchos más complejos que los procariotas, se encuentran diferentes combinaciones de cajas reguladoras de la expresión. Las cajas Guanina-Citosina (GC) son más frecuentes en genes constitutivos. Las cajas Timina-Adenina-Timina-Adenina (TATA) lo son en genes inducibles. Todas estas cajas están situadas en una región de unos pocos cientos de pares de bases (pb) situadas en 5' del gen (Figura 22) (Andrés, 2017).

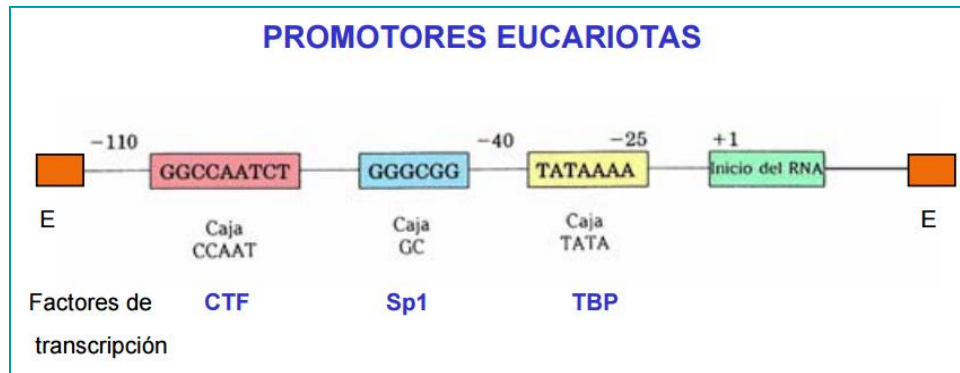


Figura 22. Esquema de un promotor de célula eucariota (Andrés, 2017).

TERMINADOR

Una vez que el ARN polimerasa ha comenzado la transcripción, la enzima se mueve a lo largo del molde, sintetizando el ARN hasta que se encuentra con una secuencia terminadora (t). En ese momento, la enzima deja de añadir nucleótidos a la cadena creciente de ARN, libera el producto terminado, y se disocia del molde de ADN. No se conoce en qué orden ocurren los dos últimos eventos. La terminación requiere que todos los enlaces hidrógeno que mantienen unido el híbrido ARN-ADN se rompan, después de lo cual se vuelve a formar el ADN bicatenario (Cruz, 2017).

Todos los terminadores de la transcripción son secuencias palindrómicas (en amarillo de la Figura 23) auto-complementarias interrumpidas por una secuencia que no lo es. Esto hace que el ARN de transcripción (ARNt) forme una estructura de bucle con tallo que hace detenerse a la ARN polimerasa (ARNpol) (Andrés, 2017).

Los terminadores rho ρ independientes presentan después de la secuencia palindrómica una serie seguida de Adenosinas (por lo menos 6) que al ser transcritas origina una serie de uracilos (U). El dúplex Adenina-Uracilo (A-U) es muy inestable y el transcrito de ARN se libera espontáneamente (Figura 23) (Andrés, 2017).

Con el terminador rho ρ dependiente, la secuencia palindrómica no está seguida de una serie de varias Adenasinas, si no que tiene una región rica en Citosina-Adenina (C-A). No se produce la liberación espontanea de transcrito y es necesaria la intervención de la proteína (rho) para deshacer el dúplex ADN-ARN (Figura 24) (Andrés, 2017).

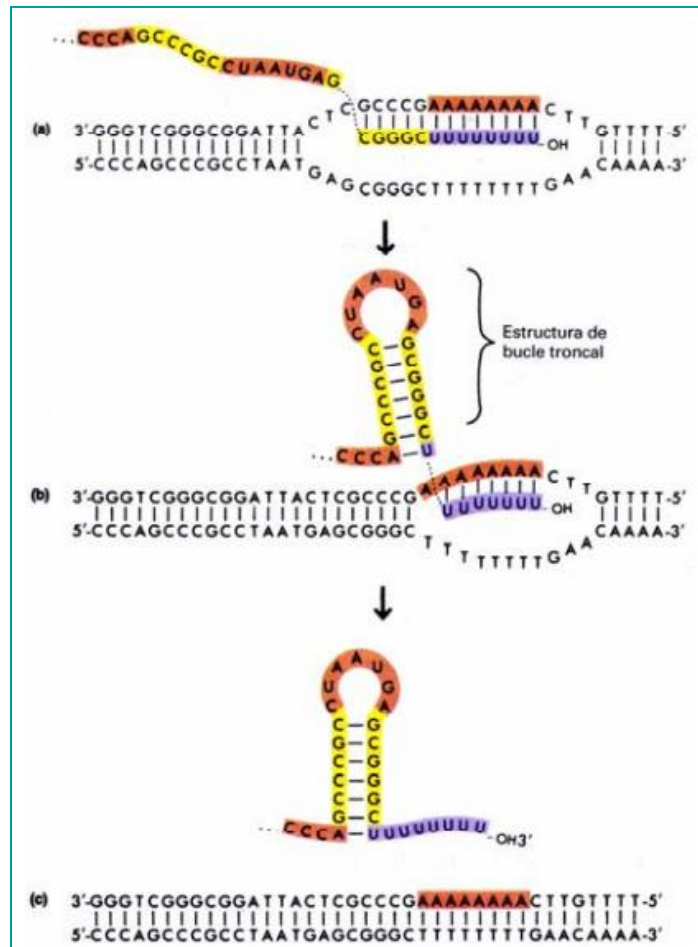


Figura 23. Terminador rho p independiente (Andrés, 2017).

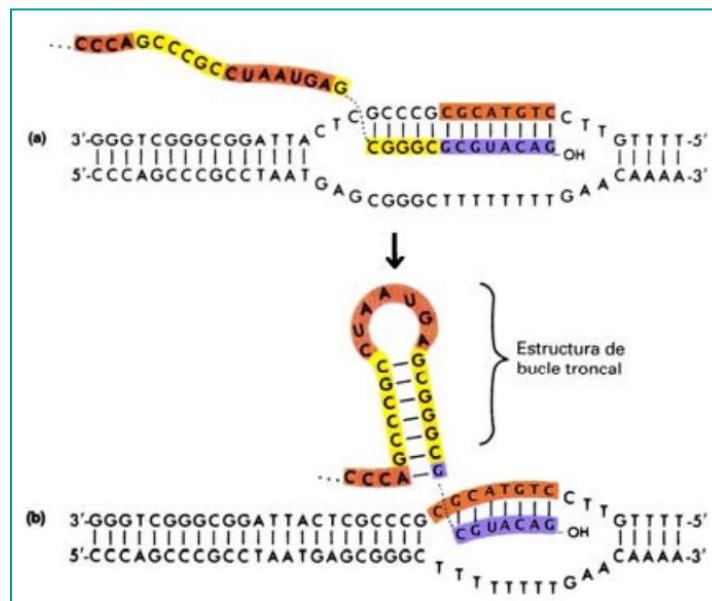


Figura 24. Terminador rho p dependiente (Andrés, 2017).



1.2.5 Transgenes de importancia agronómica

Un cultivo modificado mediante ingeniería genética es un cultivo de una planta utilizada para propósitos agrícolas en la que se han insertado uno o varios genes que codifican para características deseadas mediante técnicas de ingeniería genética (Hernández, 2015).

Debido a la naturaleza de la introducción del ADN, sólo un pequeño porcentaje de las células de la planta pueden ser modificadas exitosamente. El gen de resistencia a antibiótico más utilizado es el gen “nptII”, que codifica para una neomicina fosfotransferasa que provee resistencia a la kanamicina y el gen “hph” que codifica para la resistencia a la higromicina. El gen de resistencia a herbicida más utilizado es el gen “bar” que codifica para la fosfinotricina acetiltransferasa que inactiva al herbicida bialaphos (Hernández, 2015).

1.2.6 Resistencia a enfermedades bacterianas

El cacahuete a sufrido mayores pérdidas de cultivos como resultado de enfermedades fúngicas y virales en todo el mundo, siendo así una importante limitación de producción en el cultivo. Una de las maneras de mitigar las enfermedades fúngicas es desarrollando plantas que sobre-expresan genes que confieren resistencias, utilizando tecnologías transgénicas (Sundaresha *et al.*, 2016).

El NPR1 (Número de expresor de genes relacionados con la patogénesis) es un componente de respuesta como defensa de la planta. Así también es un regulador ascendente que controla la expresión de proteínas a través de un factor de transcripción TGA. La expresión de NPR1 a través del enfoque transgénico se ha demostrado que confiere resistencia contra una amplia gama de patógenos en diferentes especies vegetales, incluyendo importantes cultivos como el cacahuete (Sundaresha *et al.*, 2016).

Millones de pequeños agricultores en los trópicos semiáridos del subcontinente Indio dependen de la agricultura de cacahuete para su sustento. Una nueva amenaza ataca a los cultivos de India por un virus que causa necrosis en el tallo de la planta de cacahuete. Se encontró asociado a la enfermedad el virus *raya del tabaco*, este pertenece al género *Ilarvirus* de la familia *Bromoviridae*, se propaga principalmente a través de las malas hierbas que crecen alrededor del cultivo. Este se propaga a través de granos de polen por las tres especies de trips, que son *Frankliniella schultzei*, *Scirtothrips dorsalis* y *Megalothrips usitatus*. En el caso del cacahuete, *Frankliniella schultzei* actúa como el vector viral (Mehta *et al.*, 2013).

Por lo que se recurrió a los transgénicos utilizando el gen de la proteína Coat para desarrollar genotipos tolerantes al virus *raya del tabaco* en cacahuete cultivado, se



logró a través de la transformación genética intervenida por *agrobacterium* (Mehta *et al.*, 2013).

La ingeniería genética a tenido varios avances para los cultivos de cacahuete en India, realizando modificación de esta leguminosa, favoreciendo el uso de *Agrobacterium tumefaciens* en transformaciones in vitro para generar plantas transgénicas resistentes a las enfermedades como es el tikka causado por *Cercospora arachidicola* y *Cercosporidium personatum* (Rohini y Sankara, 2000).

1.2.7 Tolerancia a factores abiótico

El cacahuete (*Arachis hypogaea L.*) es un alimento importante, es un cultivo de leguminosas, que se siembra principalmente en regiones tropicales y subtropicales del mundo, produciendo de 35 a 40 millones de toneladas de vainas al año (Sarkar *et al.*, 2016).

Su productividad sufre disminución debido a la sequía recurrente a una cantidad suficiente de escasas de lluvias, Globalmente, alrededor del 20% de la superficie terrestre está bajo la sequía en cualquier punto de la temporada de siembra, por lo que es la principal limitación ambiental en la producción anualmente. La productividad del cacahuete sufre una pérdida de alrededor de 6 millones de toneladas por este problema (Sarkar *et al.*, 2016).

Para mejorar la tolerancia al estrés abiótico como la sequía, es más apropiado transferir un solo gen, codificando factores de transcripción (TF). Los TFs regulan la expresión del estrés inducido por múltiples genes posteriores a través de vías de traducción de señales, que a su vez modulan una serie de cambios en la planta de adaptación; para alcanzar el nivel deseado de tolerancia al estrés y rendimiento-ganancia por sequías (Sarkar *et al.*, 2016).

1.2.8 Otras aplicaciones

El cacahuete ha sido sometido a diversos estudios de interés para mejorar sus condiciones del cultivo con ayuda de organismos genéticamente modificados, recordando que estas mejoras son para la resistencia de enfermedades, cambios abióticos y plagas. Por lo que ahora este cultivo será nuevamente estudiado para la modificación de sus agentes alérgenos.

Un grupo de científicos de la Universidad Western Australia del Oeste descubrieron que los cacahuates pueden ser libres de agentes alérgicos. Dicen que al decodificar el ADN de los cacahuates puede convertirlos en alimentos libres de alergias (Swerdloff, 2016).



El profesor Rajeev Varshney, del Instituto de Investigación de Cultivos Internacionales para los Trópicos Semiáridos, se encuentra a cargo de este estudio en la universidad de Australia, en el 2016 mencionó que producir cacahuates libres de agentes alérgenos es más complicado que fabricar cacahuates con altos niveles productivos, y su desarrollo llevara más tiempo, pero no será imposible realizarlo (Swerdloff, 2016).

1.2.9 Situación actual de Organismos Genéticamente Modificados

Como se observa en la Figura 25, las modificaciones genéticas en las aplicaciones agrícolas ha sido un tema de interés para los investigadores, ya que recurren con mayor cantidad al uso de OGM para averiguaciones agrobiotecnologías, control de plagas y patógenos en los cultivos alimentarios (SAGARPA-CIBIOGEM, 2011).

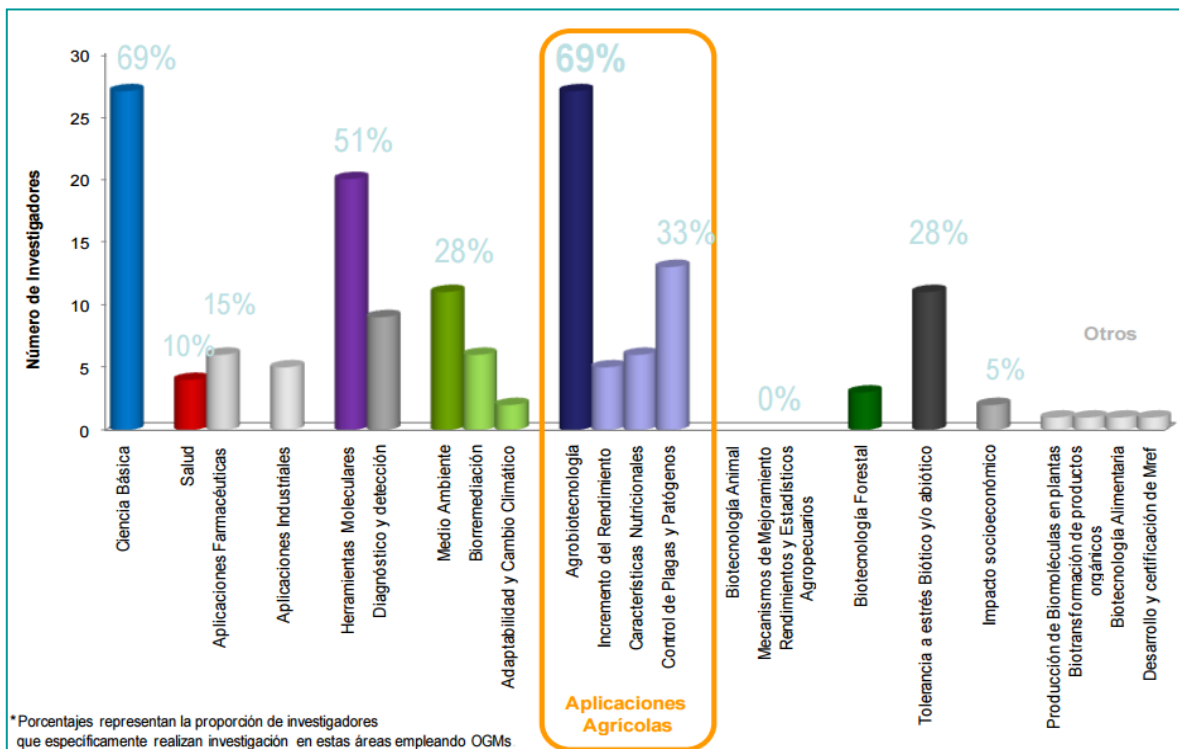


Figura 25. Investigación Biotecnológica en México y el uso de OGM (SAGARPA-CIBIOGEM, 2011).

Los países con mayor producción de OGM en el 2016, se mencionan en la Tabla 7 y en la Figura 26. Estados Unidos sigue siendo líder en la comercialización mundial de cultivos biotecnológicos desde 1996. En 2016, se sembraron 72.9 millones de hectáreas con los principales cultivos biotecnológicos: maíz (35.05 millones de hectáreas), soja (31.84 millones de hectáreas), algodón (3.70 millones de hectáreas), ciertas superficies de cultivos biotecnológicos: alfalfa (1.23 millones de hectáreas), colza/canola (0.62 millones de hectáreas) y remolacha, azucarera (0.47 millones de hectáreas) y pequeñas superficies de calabaza y papaya resistentes a virus (1.000



hectáreas cada uno), y papas/patatas Innate TM de oscurecimiento retardado (2.500 hectáreas) (ISAAA, 2016).

Las manzanas y las papas libres de pardeamiento y de magulladuras pueden contribuir a reducir el desperdicio y descarte de alimentos. Además, algunas entidades del sector público llevaron a cabo investigaciones en determinados cultivos, tales como arroz, plátano, papa, trigo, garbanzo, mostaza y caña de azúcar, que se encuentran en etapa avanzada de evaluación y es probable que ofrezcan una diversidad de opciones incluso mayor a los consumidores, especialmente en los países en desarrollo (Tabla 7 y Figura 26) (ISAAA, 2016).

Tabla 7. Principales países productores de OGM en 2016.

Puesto	País	Superficie (millones de hectáreas)	Cultivos biotecnológicos
1	Estados Unidos*	72,9	Maíz, soja, algodón, colza/canola, remolacha azucarera, alfalfa, papaya, calabaza, papa
2	Brasil*	49,1	Soja, maíz, algodón
3	Argentina*	23,8	Soja, maíz, algodón
4	Canadá*	11,6	Colza/canola, maíz, soja, remolacha azucarera, alfalfa
5	India*	10,8	Algodón
6	Paraguay*	3,6	Soja, maíz, algodón
7	Pakistán*	2,9	Algodón
8	China*	2,8	Algodón, papaya, álamo/chopo
9	Sudáfrica*	2,7	Maíz, soja, algodón
10	Uruguay*	1,3	Soja, maíz
11	Bolivia*	1,2	Soja
12	Australia*	0,9	Algodón, colza/canola
13	Filipinas*	0,8	Maíz
14	Myanmar	0,3	Algodón
15	España*	0,1	Maíz
16	Sudán*	0,1	Algodón
17	México*	0,1	Algodón, soja
18	Colombia*	0,1	Algodón, maíz
19	Vietnam	<0,1	Maíz
20	Honduras	<0,1	Maíz,
21	Chile	<0,1	Maíz, soja, colza/canola
22	Portugal	<0,1	Maíz
23	Bangladesh*	<0,1	Brinjal/Berenjena
24	Costa Rica	<0,1	Algodón, soja, ananá/piña
25	Eslovaquia	<0,1	Maíz
26	República Checa	<0,1	Maíz
	Total	185,1	

ISAAA, 2016



Figura 26. Países productores de cultivos transgénicos (ISAAA, 2016).

En el 2016, Brasil aumentó notablemente la superficie de cultivos biotecnológicos del maíz, la soja, el algodón y la canola en 11% y mantuvo de esta forma el segundo puesto como productos más grande de cultivos biotecnológicos, después de los Estados Unidos. En Brasil se cultivan 32.7 de las 91.4 millones de hectáreas de soja biotecnológicas que se cultivan en el resto del mundo (ISAAA, 2016).

- La superficie mundial cultivada se recuperó y aumentó a 185.1 millones de hectáreas de cultivos biotecnológicos en 2016, después de haber sido de 179.7 millones de hectáreas en 2015 y 181.5 millones de hectáreas en 2014 (ISAAA, 2016).
- En 2016, un total de 26 países, entre los cuales se encontraban 19 países en desarrollo y 7 países industrializados, plantaron cultivos biotecnológicos. Los



países en desarrollo fueron responsables del 54% de los cultivos biotecnológicos mientras que los países industrializados representaron el 46% (ISAAA, 2016).

1.2.10 Legislación en México (etiquetado)

En México se ha permitido la siembra de algunos cultivos transgénicos como algodón y soya desde hace más de 20 años. El Reglamento, al igual que lo dice la Ley, no “permite” ni prohíbe, a priori, la siembra de maíz modificado genéticamente o cualquier otro cultivo transgénico. Las instancias competentes en la SAGARPA y la SEMARNAT, deben evaluar cualquier solicitud de permiso para siembra de organismos genéticamente modificados que reciban y determinar en función de los niveles de riesgo evaluados científicamente y las medidas de bioseguridad, si procede o no la siembra del cultivo transgénico y si es así bajo qué condiciones se debe de dar aquella (CONACYT, 2014).

Adicionalmente dado que la Ley determina que para “todo OGM que esté destinado a ser liberado comercialmente debe ser previamente sometido a pruebas satisfactorias conforme a los estudios de riesgo, la evaluación de riesgos y los reportes de resultados aplicables en la realización de actividades de liberación experimental y de programa piloto” el Reglamento debe ser consistente con este enfoque por lo que se buscará que de existir algún efecto este sea positivo para los cultivos mexicanos muchos de los cuales se cultivan también en otras partes del mundo (CONACYT, 2014).

El Reglamento de la Ley de Biodiversidad de Organismos Genéticamente Modificados, es de orden público y de interés social, y tiene por objeto regular las actividades de utilización confinada, liberación experimental, liberación en programa piloto, liberación comercial, comercialización, importación y exportación de organismos genéticamente modificados, con el fin de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que estas actividades pudieran ocasionar a la salud humana o al medio ambiente y a la diversidad biológica o a la sanidad animal, vegetal y acuícola (Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, 2005).

Que para cumplir con su objeto, la Ley tiene entre otras finalidades establecer las bases del contenido de las Normas Oficiales Mexicanas en materia de bioseguridad, conforme a su artículo 2, fracción XII (DOF, 2014).

Se puso en puerta el 30 de Diciembre del 2014 el PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-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. Que de acuerdo con la Ley, el etiquetado de OGM que sean semillas o material vegetal propagativo destinados a siembra, cultivo y producción agrícola, quedará sujeto a las Normas Oficiales



Mexicanas que expida la SAGARPA, con la participación de la Secretaría de Economía, y que será obligatorio consignar en la etiqueta que se trata de OGM, las características de la combinación genética adquirida y sus implicaciones relativas a condiciones especiales y requerimiento de cultivo, así como los cambios en las características reproductivas y productivas (DOF, 2014).

Hoy en día esta norma se encuentra vigente y fue publicada el 26 de Mayo de 2017 por Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA, 2017).

El 3 de Enero del 2014 se puso en vigencia la 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. Que las liberaciones de OGMs en el ambiente deben realizarse “paso a paso” conforme a lo cual, todo OGM que éste destinado a ser liberado comercialmente debe ser previamente sometido a pruebas satisfactorias conforme a los estudios de riesgo, la evaluación de riesgos y los reportes de resultados aplicables en la realización de actividades de liberación experimental y de liberación en programa piloto de dichos organismos, de conformidad con el Artículo 9 fracción IX de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.

1.2.12 Legislación Mundial

EFSA (European Food Safety Authority)

Es el organismo Europeo encargado de garantizar la seguridad de los alimentos consumidos en Europa. Lo que hace la EFSA es evaluar el riesgo de los OGM y dar opiniones al respecto. Así pues, las empresas que soliciten la comercialización de sus productos en la Unión Europea, de acuerdo con la legislación europea, un comité científico independiente deberá efectuar un análisis de riesgos y evaluar así la seguridad del OGM en cuestión. Todo producto transgénico debe ser evaluado previamente por la EFSA antes de ser sometido a una decisión del consejo europeo (Baltá *et al.*, 2013).

De vez en cuando la EFSA emite comunicados donde explican las líneas de trabajo que están siguiendo. Estos documentos los orientan para garantizar transparencia y al mismo tiempo para encaminar a las empresas que quieran comercializar sus productos en la Unión Europea (Baltá *et al.*, 2013).

En la Unión Europea se cultiva comercialmente un maíz modificado genéticamente, el MON 810. La modificación genética de este producto tiene como objetivo proteger la cosecha contra una plaga nociva conocida como el piral del maíz, es un insecto que ataca a los cultivos de España. Fue autorizado en 1998 esta modificación genética para cuidar el cultivo de este insecto (Baltá *et al.*, 2013).



El 2 de marzo de 2010 se autorizó el cultivo y la transformación industrial de una papa para fécula modificada genéticamente, denominada “patata Amflora”. Esta papa tiene un mayor contenido de amilopectina. La fécula está destinada a usos industriales, tales como la producción de papel (Baltá *et al.*, 2013).

En el 2009 la Unión Europea está promulgando políticas más estrictas que requieren etiquetas obligatorias en todos los alimentos la proporción de ingredientes genéticamente modificados. El Reglamento (EC) 1829/2003 define condiciones específicas que permiten un máximo de 0.5% de presencia de OGM no autorizados en un alimento que ha recibido una evaluación positiva en términos de seguridad para la salud y medio ambiente, pero por encima del 0.5% está prohibido poner el producto en el mercado (karamollaoglu *et al.*, 2009).

FDA (Food and Drug Administration)

Es una organización perteneciente a los Estados Unidos del Department of Health and Human Service. La principal tarea de la FDA es “regular la multitud de productos medicinales de una manera tal que asegure la seguridad de los consumidores norteamericanos y la efectividad de los medicamentos comercializados”, dicha seguridad incluye también la relativa a la seguridad alimentaria, y también, en particular, a los OMG, tanto vegetales como animales (Baltá *et al.*, 2013).

En el “Federal Register” de 18 de enero de 2001, con la propuesta de notificación previa a la comercialización 66 FR 4706, la FDA emitió una regla propuesta que invitaba a que los desarrolladores presentarán una evaluación científica y reguladora de los alimentos que contengan OMG, 120 días antes de la comercialización de dichos alimentos (Baltá *et al.*, 2013).

Además del papel regulador de la FDA, y en coadyuvancia a esta, la APHIS (sanidad animal y vegetal) del Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA) regula la gran mayoría de las plantas transgénicas, ya que durante la investigación y el desarrollo de un artículo reglamentado que está destinado a ser utilizado como cultivo alimenticio, se puede solicitar a un desarrollador de APHIS una determinación de la situación reglamentaria del artículo. A su vez, el uso seguro de las sustancias plaguicidas está regulado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA). Por lo tanto, un alimento de bioingeniería que pueda contener una sustancia pesticida (también conocido como “protector para plantas incorporado” (PIP) ha de ser objeto de revisión por parte de la EPA (Baltá *et al.*, 2013).

La FDA establece que los animales genéticamente modificados están sujetos a control previo a la comercialización, ya sea que estén destinados a ser utilizados para la alimentación o para producir productos farmacéuticos u otros productos útiles. Distingue eso sí, algunas diferencias en lo que el proceso de supervisión actual con lleva dependiendo de los tipos de riesgo que los animales transgénicos pueden



plantear, y los tipos de usos a que se destinan. Además, los productos farmacéuticos producidos a partir de animales transgénicos deben ser aprobados por el mismo proceso que se aplica a otros productos farmacéuticos. Se considera pues que en general, no esperamos que los animales biofarmacéuticos sean utilizados para la alimentación. Explicitando el menor estudio de los casos no relacionados con alimentación (Baltá *et al.*, 2013).

En la actualidad, la totalidad de la superficie sembrada con transgénicos en el mundo está ocupada por cuatro cultivos, en su mayor parte destinados a la producción de piensos compuestos para la ganadería intensiva y otros usos industriales: soya (60% del total de cultivos MG), maíz (23%) algodón (11%) y colza (6%) (Baltá *et al.*, 2013).

1.2.13 Impactos de los alimentos transgénicos sobre la salud

El Dr. David Schubert, director del Laboratorio de Neurobiología Celular del Instituto Salk de Estudios Biológicos (San Diego, California, EEUU), considerado uno de los mejores institutos de investigación médica del mundo, escribió el pasado 14 de octubre de 2013 una carta al presidente de la República Mexicana en la que afirma que *“...es lógicamente falso asegurar que, como no hay evidencia de enfermedades relacionadas con la introducción de los productos genéticamente modificados, éstos son seguros para la salud. Afirmar esto requiere de un experimento bien diseñado con controles adecuados”*. Como apunta el Dr. Schubert en su carta, los síntomas de muchas enfermedades relacionadas con los factores ambientales tardan décadas en aparecer, y cuando los transgénicos se liberan a escala comercial no hay forma de monitorear los efectos adversos en la salud causados por el producto (PALT, 2014).

También hay muchas voces que se levantan en el ámbito científico criticando la falta de seriedad de muchos estudios de impacto. La Red Europea de Científicos para la Responsabilidad Social y Ambiental (ENSSER), en su Declaración publicada el 21 de octubre de 2013, afirma que *“no se han llevado a cabo estudios epidemiológicos que permitan establecer si hay algún efecto sobre la salud asociado al consumo de alimentos genéticamente modificados. Como estos tipos de alimentos no están etiquetados en América del Norte, donde se encuentran los principales productores y consumidores de cultivos genéticamente modificados, es imposible trazar o investigar de forma científica los patrones de consumo y sus impactos. Por lo tanto, afirmar que los OGM son seguros para la salud humana basándose en la experiencia de Estados Unidos”* (PALT, 2014).

Otro informe de la Asociación Médica Británica sobre los efectos en la salud humana concluye que *“muchas preguntas continúan sin respuesta, en especial en lo referente a los impactos potenciales a largo plazo de los alimentos transgénicos sobre la salud humana y el medio ambiente”* y que *“las preocupaciones sobre la seguridad no pueden, como se ha hecho hasta ahora, dejarse de lado basándose en la información*



disponible". El informe afirma que la evidencia de beneficio real de los cultivos transgénicos aún no es lo suficientemente convincente, y pide además, que la investigación sobre los alimentos transgénicos se siga enfocando, especialmente, en los impactos potenciales para la salud humana (alergias, aspectos nutricionales, transferencia genética), el medio ambiente y el diseño de experimentos (PALT, 2014).

1.3 Técnicas biotecnológicas para la identificación de transgenes

Las técnicas de detección (cualitativa o cuantitativa) de los organismos genéticamente modificados se basan fundamentalmente, en la determinación de las modificaciones introducidas en el ADN, así como en la detección de las nuevas proteínas secretadas en el OGM y que son los productos de la transgénesis (Núñez, 2011).

Existe un tercer método que permite determinar la presencia de los OGM a partir del análisis de las variaciones fenotípicas de las especies en estudio, pero solo es aplicable si la transgénesis es evidente en el organismo transgénico, después de comparaciones con el fenotipo de la contraparte no modificada genéticamente (Núñez, 2011).

1.3.1 Técnicas basadas en el análisis de proteínas

Se encontraron dos técnicas basadas en el estudio de las proteínas: Western blot y ELISA, a continuación se describirá cada una.

WESTERN BLOT

Esta técnica se basa en la separación de proteínas mediante electroforesis en poliacrilamida y su posterior transferencia electroforética a una membrana de nitrocelulosa. La visualización de las respectivas bandas de proteínas se realiza con ayuda de ligandos específicos, es decir, anticuerpos marcados con enzimas que producen un precipitado de color cuando se le agrega el sustrato respectivo, o bien, mediante autoradiografía donde los anticuerpos se acoplan a un radioisótopo (Herrero *et al.*, 2004).

Este procedimiento se utiliza en todo el mundo, y ha demostrado tener una especificidad muy alta al compararlo con el método de ELISA que se utiliza como tamizaje por su alta sensibilidad (Herrero *et al.*, 2004).

Hoy en día, esta técnica se realiza con kits comerciales donde se le proporcionan al microbiólogo las proteínas virales ya transferidas y en presentación de tiras, por lo tanto, no es necesario el proceso inicial de electroforesis ni de transferencia. Sin embargo, es posible estandarizar en el laboratorio, una técnica de inmunoelectrotransferencia donde se realicen todos los pasos (Herrero *et al.*, 2004).



ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

La técnica ELISA consiste en un ensayo basado en el principio inmunológico del reconocimiento y unión de los anticuerpos a las moléculas que reconocen como extrañas (antígenos). Es un método inmunológico clásico, enormemente utilizado para una gran cantidad de aplicaciones, por ejemplo, en diagnóstico clínico, detección de virus, búsqueda de anticuerpos, etcétera (González *et al.*, 2007).

Las técnicas de ELISA empleadas en la industria alimentaria normalmente se presentan en formato tipo sándwich. En este diseño, un anticuerpo de captura, cuyo propósito es retener los antígenos presentes en la muestra, recubre la superficie de la placa. Los antígenos capturados son revelados posteriormente por un anticuerpo secundario (anticuerpo de detección) que está conjugado con una enzima que convierte el sustrato cromogénico en un producto detectable, manifestándose la presencia de las proteínas diana mediante una reacción colorimétrica (De la Cruz, 2016).

1.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido la principal herramienta diagnóstica que ha aprovechado las bondades de la biología molecular a tal punto de alcanzar gran valor y versatilidad como técnica de análisis debido en parte, a su adaptabilidad y aplicabilidad. Los inicios de la PCR se remontan a 1971, cuando un artículo publicado por Kleppe y colaboradores en el *Journal of Molecular Biology* describió por vez primera un método que usaba enzimas para replicar una secuencia pequeña de ADN *in vitro*. Sin embargo, este ensayo no recibió mucha atención y la autoría de la PCR fue atribuida 12 años después a Kary Mullis perteneciente a la *Cetus Corporation*, California SA. La puesta en escena de la PCR significó una valiosa alternativa para el estudio de los genes y a partir de entonces su uso se ha extendido a distintos laboratorios. De tal modo que al presente la PCR ha sido ensayada con buenos resultados en una amplia gama de campos que abarcan desde la detección de agentes etiológicos, hasta estudios de expresión del gen. La PCR continúa siendo un método revolucionario, constituyéndose en la mejor técnica desarrollada por biólogos moleculares cuyo impacto aún continúa haciéndose notar (Bolívar *et al.*, 2014).

Por lo que la Reacción en Cadena de la Polimerasa es considerada una técnica biotecnológica cuya finalidad es la amplificación o reproducción *in vitro* de un número de copias de una región específica de ADN, en este caso de un gen de interés, para su respectiva evaluación (Izzeddin *et al.*, 2010).

1.3.3 Fundamento y componentes de la PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción



aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en la célula. En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés) (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

COMPONENTES

Los siguientes componentes en la reacción son el templado o molde (ADN), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg +), una solución amortiguadora o buffer y agua libre de nucleasas (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Estos componentes se explicarán a continuación: (Figura 27)

✓ El templado o ADN molde (ADN o ADNc)

El templado son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

✓ La enzima Taq polimerasa

La enzima más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

✓ Los oligonucleótidos o primers

Los primers también llamados cebadores, son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

✓ Los desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP's: adenina, timina, citosina y guanina)

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 1.0mM (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

✓ El ión magnesio (Mg⁺)

El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa; regularmente su concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

✓ Solución amortiguadora o buffer

El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8) cuya concentración final de trabajo debe ser 1X (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

✓ Agua libre de nucleasa

El agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

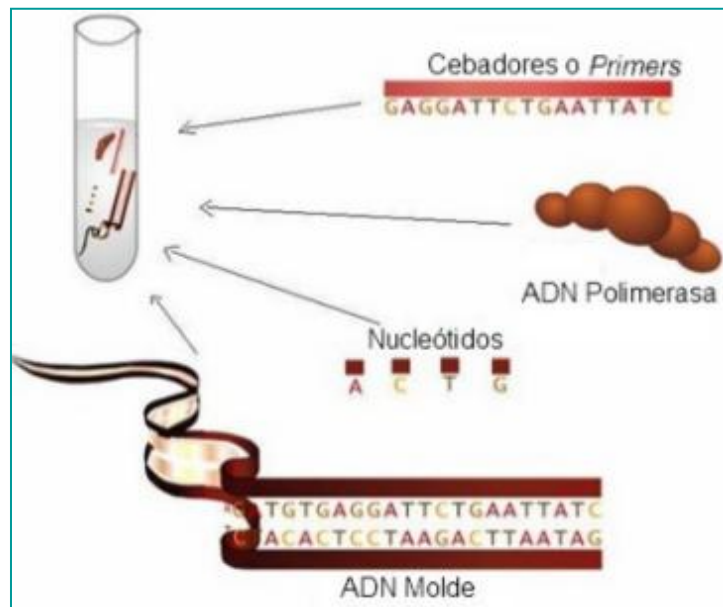


Figura 27. Componentes para realizar la técnica de PCR (Larios, 2013).

1.3.4 Etapas de la reacción

La técnica de PCR se compone de tres etapas principales:



➤ DESNATURALIZACIÓN

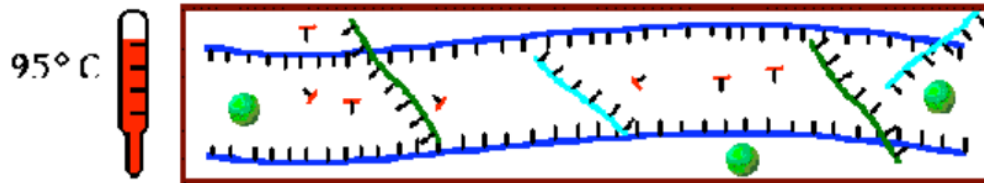


Figura 28. Desnaturalización de la cadena de ADN (Cortázar y Silva, 2004).

En la Figura 28 se muestra la primera reacción que consiste en la desnaturalización del ADN, separándose las dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno. Las condiciones típicas de desnaturalización son 95°C por 30 segundos, o 97°C por 15 segundos; sin embargo temperaturas más altas pueden ser apropiadas especialmente para templados ricos en G+C (Cortázar y Silva, 2004).

La desnaturalización incompleta permite el apareamiento de las hebras de ADN y por lo tanto se reduce el rendimiento el producto. En contraste, los pasos de desnaturalización a altas temperaturas o por mucho tiempo provocan pérdida de la actividad de la enzima (Cortázar y Silva, 2004).

➤ HIBRIDACIÓN

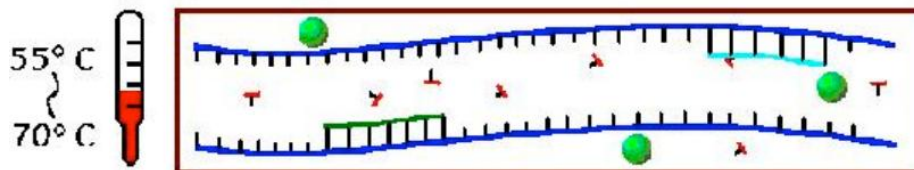


Figura 29. Hibridación de los primers (Cortázar y Silva, 2004).

En la Figura 29 se muestra la segunda reacción que consiste en la hibridación de los primers. Para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los primers a las cadenas. La temperatura y el tiempo requerido para el alineamiento de los primers depende de la composición, tamaño y concentración de los primers amplificadores (Cortázar y Silva, 2004).

Una temperatura de alineamiento óptima es 5°C por debajo de la Temperatura de hibridación (T_m) de los primers. Debido a que las ADN polimerasas son activas en un amplio rango de temperaturas, la extensión de los primers puede ocurrir a bajas temperaturas incluyendo el paso de alineamiento. El rango de actividad de las enzimas varía en dos órdenes de magnitud entre 20 y 85°C. Las temperaturas de alineamiento en el rango de 55 a 72°C generan buenos resultados (Cortázar y Silva, 2004).



➤ EXTENSIÓN

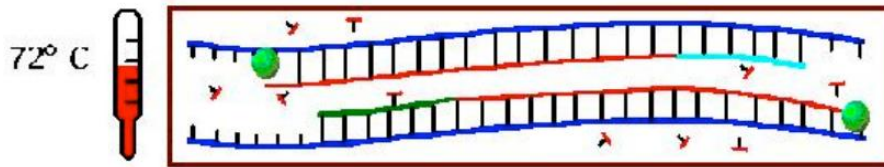


Figura 30. Extensión de los primers añadiendo nucleótidos (Cortázar y Silva, 2004).

En la Figura 30 se muestra la tercera reacción que se efectúa a 72° C, temperatura a la cual, la polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde. El tiempo de extensión depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco y de la temperatura. La extensión del primer se realiza tradicionalmente a 72°C. Las estimaciones para la tasa de incorporación de nucleótidos a 2°C varia de 35 a 100 nucleótidos por segundo dependiendo del buffer, pH, concentración de sales y la naturaleza del templado (Cortázar y Silva 2004).

Un tiempo de extensión de un minuto es considerado suficiente para productos de hasta 2 kilo bases (kb) de longitud. Sin embargo, tiempos mayores de extensión pueden ser útiles cuando la concentración del sustrato es muy pequeña o cuando la concentración del producto excede la concentración de la enzima (Cortázar y Silva, 2004).

En la Figura 31 volvemos a representa esquemáticamente los componentes básicos para llevar a cabo una PCR, fases de la PCR, y el resultado obtenido tras el primer ciclo de amplificación de la cadena recién formada, se representa de color más claro (Pérez, 2017).

1.3.5 Análisis del producto de la PCR

La idea ahora es poder analizar el o los fragmentos obtenidos de la PCR, y la electroforesis, ya sea en geles de agarosa o de acrilamida, permite separar estos fragmentos de acuerdo al tamaño de cada uno. Tanto la agarosa como la acrilamida forman una especie de red con agujeros de tamaños diferentes, por la cual obligamos a pasar los fragmentos de ADN, “jalándolos” a través de corriente eléctrica, hacia el polo positivo, ya que la carga de una molécula de ADN es negativa por la presencia de grupos fosfato (P⁻). Los fragmentos más pequeños pasarán primero a través de la red de agujeros, mientras que los más grandes se irán retrasando y atorando en los hoyos; de esta manera los fragmentos de tamaños similares migrarán a ritmos similares (Eguiarte *et al.*, 2007).

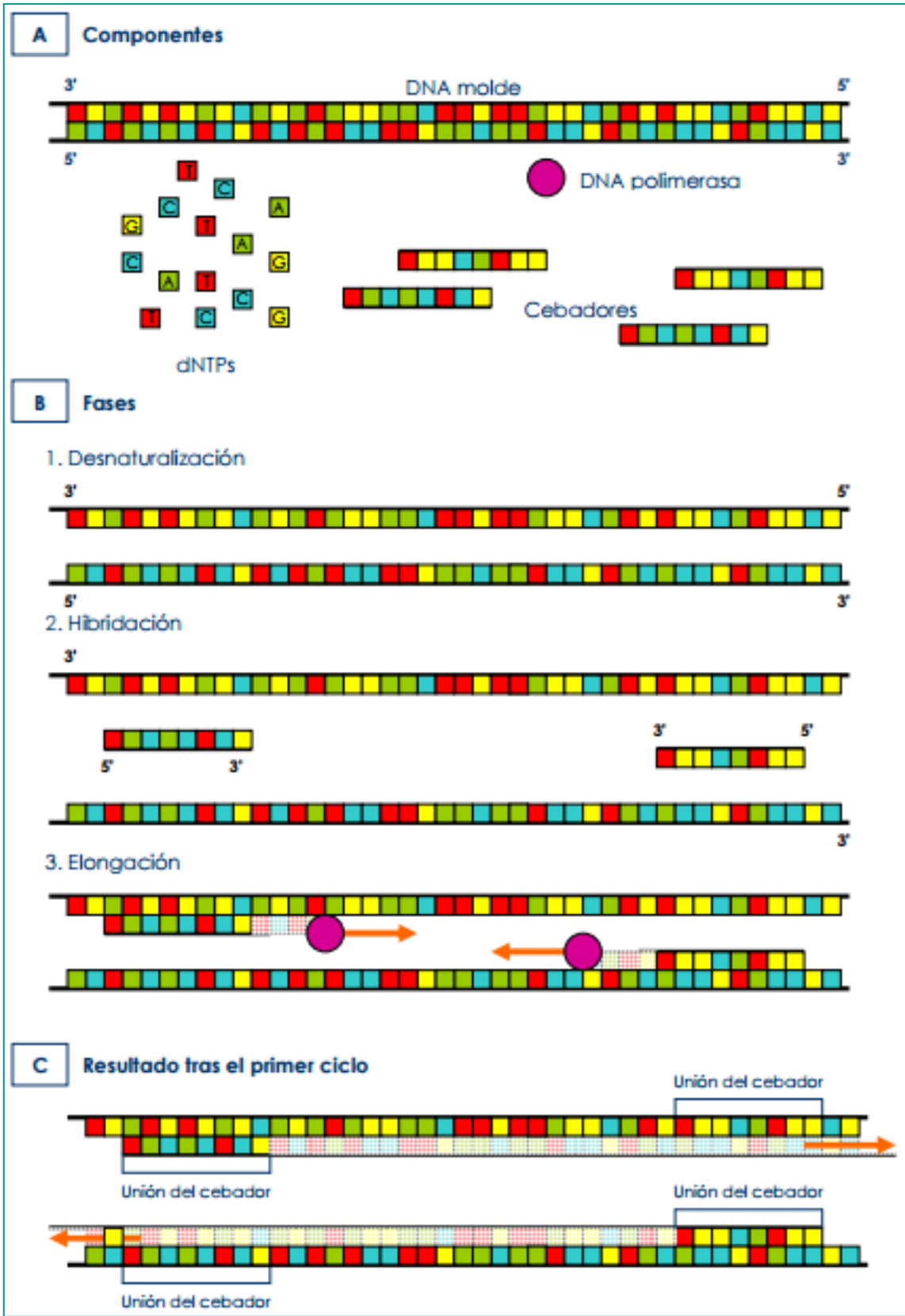


Figura 31. Representación esquemática de la técnica PCR (Pérez, 2017).



Es necesario tener en el laboratorio equipo que permita trabajar con los geles, como son: (Figura 32) una cámara de electroforesis, una fuente de poder, un transluminador de luz UV y equipo de fotografía (lo más sencillo: una cámara polaroid, un filtro para luz UV y un cono adaptado a la cámara, o también existen cámaras especiales y equipo de cómputo específico para ello) para guardar la imagen del gel (Eguiarte *et al.*, 2007).

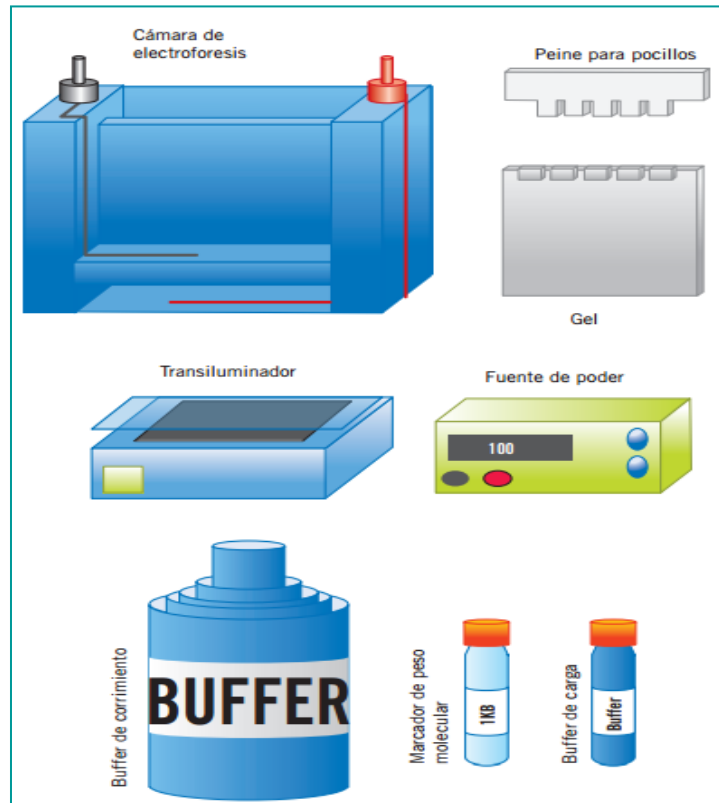


Figura 32. Elementos necesarios para una electroforesis (Salazar *et al.*, 2013).

✓ Cámara de electroforesis

La cámara de electroforesis es un dispositivo que permite la generación de un campo eléctrico alrededor de un gel en el que se depositan las muestras. La cámara cuenta con dos polos que se conectan a una fuente de energía; el polo positivo se identifica con color rojo y el negativo con negro (Figura 33) (Salazar *et al.*, 2013).

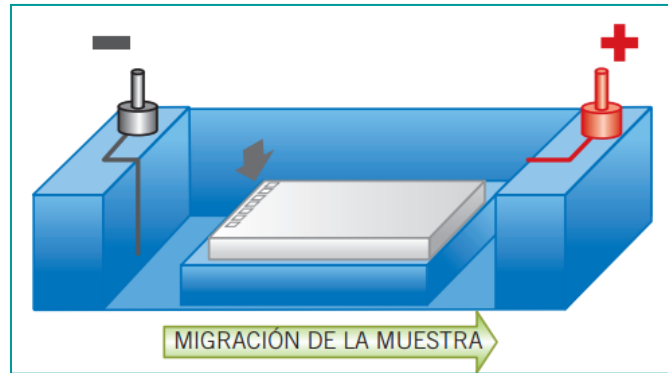


Figura 33. Electroforesis Horizontal, debe cuidarse que el ánodo se coloque hacia el extremo del gel donde corren las muestras para que no salgan del gel (Salazar *et al.*, 2013).

✓ Gel de agarosa

La agarosa es un polisacárido extraído de algas marinas que tiene la propiedad de mantenerse en estado sólido a temperatura ambiente, que se disuelve fácilmente en temperatura de 50 a 60°C, se torna líquida y se solidifica cuando se enfría formando un gel altamente poroso. Para elaborar el gel se pesa la cantidad de agarosa requerida, se disuelve en una solución amortiguadora adecuada de la misma composición y concentración que el *buffer* de corrimiento. Sin dejar enfriar se vacía inmediatamente sobre un molde en forma rectangular y en uno de los extremos se coloca un aditamento en forma de peine con la finalidad de generar los pocillos u orificios donde se colocarán las muestras. El gel se coloca de manera que los pocillos queden en el extremo donde se localiza el polo negativo de la cámara de electroforesis, para permitir que la muestra corra a lo largo del gel (Figura 34) (Salazar *et al.*, 2013).

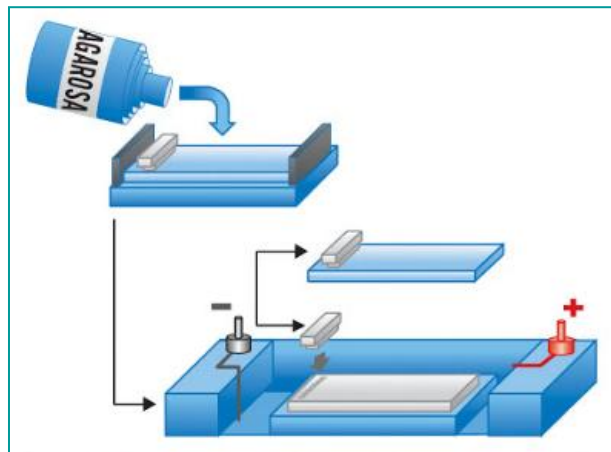


Figura 34. Preparación de un gel de agarosa (Salazar *et al.*, 2013).



✓ **Buffer de corrimiento**

El *buffer* de corrimiento es de la misma composición y pH que el *buffer* con el que se prepara el gel de resolución. Éste proporciona el medio para la transmisión de la corriente eléctrica y mantiene el pH sin variaciones mientras se realiza el corrimiento. En el caso de los ácidos nucleicos, pueden emplearse TBE o TAE como *buffer* de corrimiento. El *buffer* TBE contiene Tris base, ácido bórico y EDTA, y se maneja a un pH de 7.2. El *buffer* TAE contiene Tris base, ácido acético y EDTA, ajustado a pH de 8.5 (Salazar *et al.*, 2013).

✓ **Marcador de peso molecular**

Son moléculas de ADN o de proteínas de tamaño conocido que permiten determinar por comparación el tamaño de los fragmentos de ácidos nucleicos o proteínas contenidos en las muestras sometidas a electroforesis. En el caso de marcadores de peso molecular de ácidos nucleicos, éstos pueden ser fagos o plásmidos sometidos a corte con enzimas de restricción que generan fragmentos de tamaño; también puede tratarse de moléculas de ADN sintéticas denominadas *escaleras*, porque contienen fragmentos con incrementos de tamaño gradual (Figura 35) (Salazar *et al.*, 2013).

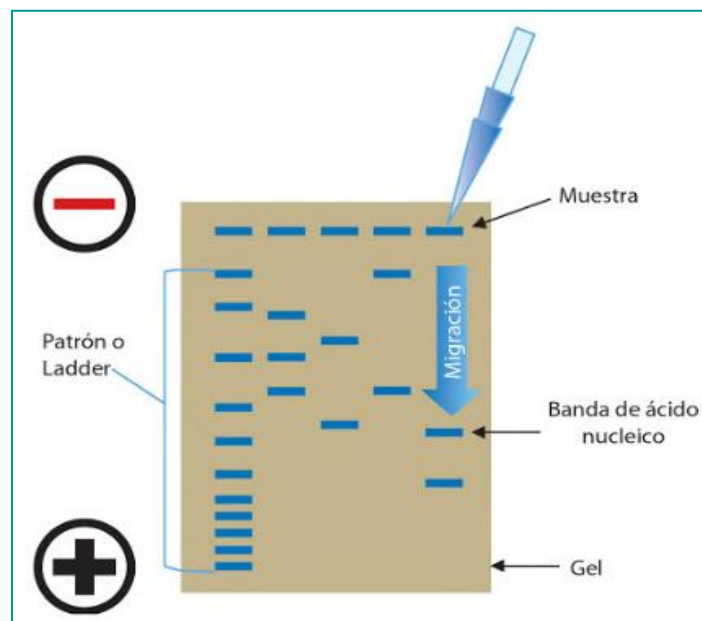


Figura 35. Electroforesis de ácidos nucleicos. Se representa un gel de agarosa en el cuál se visualiza un marcador de peso molecular junto a las muestras para ayudar en la determinación del peso molecular de los fragmentos (Salazar *et al.*, 2013).

✓ **Transluminador Ultravioleta**

Es un aparato que transmite luz del espectro ultravioleta a través de la muestra, lo cual excita la molécula cromogénica que emite energía fluorescente y permite visualizarla. En general emiten energía a una longitud de onda a 302nm (nanómetros), aunque también existen para 254 y 365nm; suelen contar con un botón para baja/alta



intensidades por si se requiere una menor exposición de la muestra a la luz ultravioleta (Salazar *et al.*, 2013).

1.3.6 Tipos de PCR

➤ PCR en Tiempo Real o PCR cuantitativa (qPCR)

Se utiliza para cuantificar ADN o ADNc, la determinación de genes o números de transcripción presentes en diferentes muestras (Rodríguez y Rodríguez, 2006).

Usa moléculas de un reportero fluorescente para monitorear la amplificación de productos durante cada ciclo de reacción. Esta técnica combina los pasos de amplificación de ADN y la detección en un único ensayo y evita tener que preparar geles de electroforesis para detectar los productos amplificados. Su confiabilidad en la instrumentación y protocolos mejorados, han hecho que qPCR una tecnología altamente competitiva para la detección de ADN y ARN (Rodríguez y Rodríguez, 2006).

Las pruebas de qPCR determinan el punto en el tiempo durante el proceso de ciclado cuando se detecta por primera vez la amplificación de un producto de PCR (Figura 36).

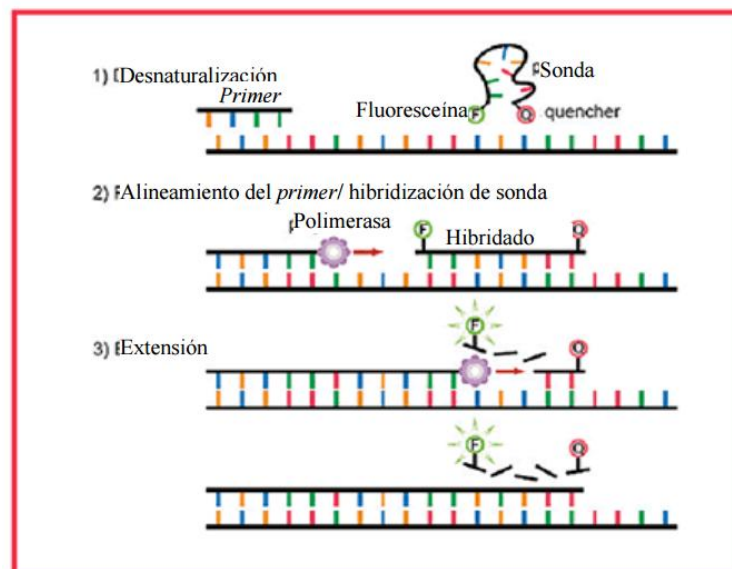


Figura 36. Representación de un ensayo de qPCR usando el método Taqman (Rodríguez y Rodríguez, 2006).

➤ PCR Multiplex

Es una adaptación de PCR que permite la amplificación simultánea de muchas secuencias. Esta técnica se utiliza para el diagnóstico de diferentes enfermedades en la misma muestra. También puede detectar diferentes patógenos en una sola muestra; se utiliza para identificar exones e intrones en secuencias en genes específicos. Determina la dosificación génica (Hernández y Gómez, 2012).



Esto se consigue cuando en un solo tubo se incluyen conjuntos de cebadores específicos para objetivos diferentes. En esta PCR es importante el diseño de primers porque deben ser caracterizados por adherencia a secuencias de ADN específicas en temperaturas similares. Sin embargo puede requerir varios ensayos para lograr la estandarización del procedimiento (Hernández y Gómez, 2012).

➤ **PCR anidada o Nested**

Esta PCR aumenta la sensibilidad debido a pequeñas cantidades de la diana, se detectan usando dos conjuntos de cebadores que implican un doble proceso de amplificación. El primer conjunto de primers permite una primera amplificación, el producto de esta PCR se somete a una segunda PCR utilizando el segundo conjunto de cebadores, estos cebadores utilizados en la segunda PCR son específicos de una secuencia amplificada interna en la primera PCR. Por lo tanto, la especificidad del primer producto de PCR es verificado con el segundo (Hernández y Gómez, 2012).

La desventaja de esta técnica es la probabilidad de contaminación durante la transferencia desde el primer producto amplificado al tubo en el que se realizará una segundo amplificación (Hernández y Gómez, 2012).

➤ **PCR transcriptasa reversa (RT-PCR)**

Esta PCR fue diseñada para amplificar las secuencias de ARN (especialmente ARNm) a través de la síntesis de ADNc por transcriptasa inversa (RT). Posteriormente, este ADNc se amplifica utilizando PCR. Este tipo de PCR ha sido útil para el diagnóstico de virus ARN, así como para la evaluación de terapia antimicrobiana. También se ha utilizado para estudiar la expresión génica in vitro, debido al ADNc obtenido retiene la secuencia de ARN original (Hernández y Gómez, 2012).

El principal reto de esta técnica es la muestra de ARNm, porque esto se considera difícil de manejar por bajo nivel y concentración de ARNm de interés y baja estabilidad a temperatura ambiente juntos con sensibilidad a la acción de ribonucleasas y cambio de pH (Hernández y Gómez, 2012).

➤ **PCR in situ**

La PCR in situ consiste en una reacción de PCR en secciones histológicas o células, donde los productos generados pueden visualizarse en el sitio de amplificación. Es realizada sobre preparaciones fijas en un portaobjetos. En la técnica de PCR in situ se realiza una primera amplificación de ADN blanco y luego detección mediante hibridación in situ convencional con sondas de ADN/ARN (Greif, 2017).

➤ **PCR-RFLP**

Este es un método de análisis que puede ser usado para el polimorfismo de conformación monocatenaria, los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados, entre otras (Winn *et al.*, 2008).



El análisis de RFLP del producto obtenido por PCR se realiza por lo común mediante ensayos dirigidos contra el ADNr. Cuando se analiza el ADNr, es importante usar como dianas áreas particulares, para lograr información específica de tipo. PCR-RFLP se ha usado para tipificar todos los tipos de microorganismos, incluidas bacterias como especies de *Campylobacter* y *Borrelia* y hongos atípicos, como *Pneumocystis jiroveci* (Winn *et al.*, 2008).

Este tipo de aplicación se basa en el uso de cebadores de PCR altamente específicos. Los genes no ribosómicos que se pueden usar para PCR-RFLP son los genes de mantenimiento (*housekeeping*), como *rpoB*, o algún gen que pueda contener información específica de especie para un grupo particular de microorganismos (Winn *et al.*, 2008).

➤ **PCR “larga”**

Denominada L-PCR (Long PCR), su objetivo es separar los límites de la PCR convencional para amplificar con fidelidad regiones diana de gran tamaño (entre 5 y 40Kb). El principal factor limitante es la ausencia de actividad correctora de pruebas en la polimerasa Taq, por lo que se añade una cantidad menor de otra enzima con capacidad de corrección de pruebas (por ejemplo la *Ptu*) para contrarrestar la carencia de esta actividad y al mismo tiempo seguir aprovechando la eficacia de elongación de la polimerasa principal (Taq o similar) (Luque y Herráez, 2006).

➤ **PCR con adaptadores**

También puede amplificarse una región de ADN de secuencia desconocida ligando a sus fragmentos de restricción unos adaptadores, oligonucleótidos sintéticos con extremos cohesivos compatibles con los generados en la muestra. A continuación, una vez desnaturalizados, se añaden cebadores específicos para las secuencias 3' de los adaptadores. Se amplifica así el conjunto de adaptadores y secuencia diana, pero debe señalarse que se amplifican por igual todos los fragmentos de restricción presentes, no uno sólo (Figura 37) (Luque y Herráez, 2006).

➤ **PCR asimétrica**

En este caso, se trata de generar copias de hebra sencilla de un ADN. En la variante más simple, se añaden cantidades muy diferentes de ambos cebadores, de modo que tras los primeros ciclos de PCR uno de ellos se agota y quedan disponibles ya suficientes copias de ADN diana, sólo una de sus hebras sigue amplificándose gracias al cebador más abundante (Luque y Herráez, 2006).

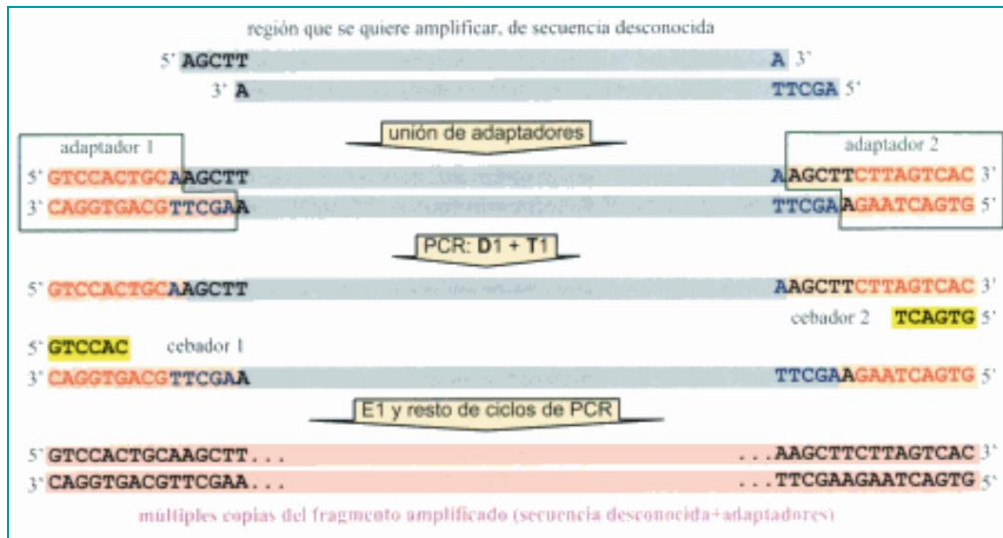


Figura 37. Ejemplo de un fragmento amplificado de PCR con adaptadores (Luque y Herráez, 2006).

1.3.7 Aplicaciones de la PCR

La puesta en escena de la PCR significó una valiosa alternativa para el estudio de los genes y a partir de entonces su uso se ha extendido a distintos laboratorios. De tal modo que al presente la PCR ha sido ensayada con buenos resultados en una amplia gama de campos como los que se muestran en la Figura 38 (Bolívar *et al.*, 2014).

La PCR continúa siendo un método revolucionario, constituyéndose en la mejor técnica desarrollada por biólogos moleculares cuyo impacto aún continúa haciéndose notar (Bolívar *et al.*, 2014).

1.3.8 Ventajas y Desventajas de la PCR

VENTAJAS

- La técnica de PCR ha demostrado ser muy útil en el diagnóstico de virus, parásitos y bacterias de difícil cultivo, porque ofrece un diagnóstico confiable, más rápido y menos laborioso que los cultivos normales de este tipo de microorganismos (Izzeddin *et al.*, 2010).
- La secuencia específica de interés no necesita estar aislada del resto de su genoma, pero una vez completada su reproducción, esta puede ser separada del resto del ADN por medio de electroforesis en geles de agarosa (Izzeddin *et al.*, 2010).



- La cantidad de material que hace falta para el inicio de la reacción es muy pequeña y solo es necesario la cantidad de ADN contenida en una sola célula, esto le ofrece una alta sensibilidad a la prueba (Izzeddin *et al.*, 2010).

DESVENTAJA

- La sensibilidad de la técnica de PCR es muy elevada, pero presenta algunos inconvenientes como el de obtener falsos positivos por contaminación, como es el caso de la presencia de ADN extraño, por lo que se hace imprescindible tener siempre un control negativo (sin ADN) que permita detectar esas contaminaciones (Mota *et al.*, 2016).

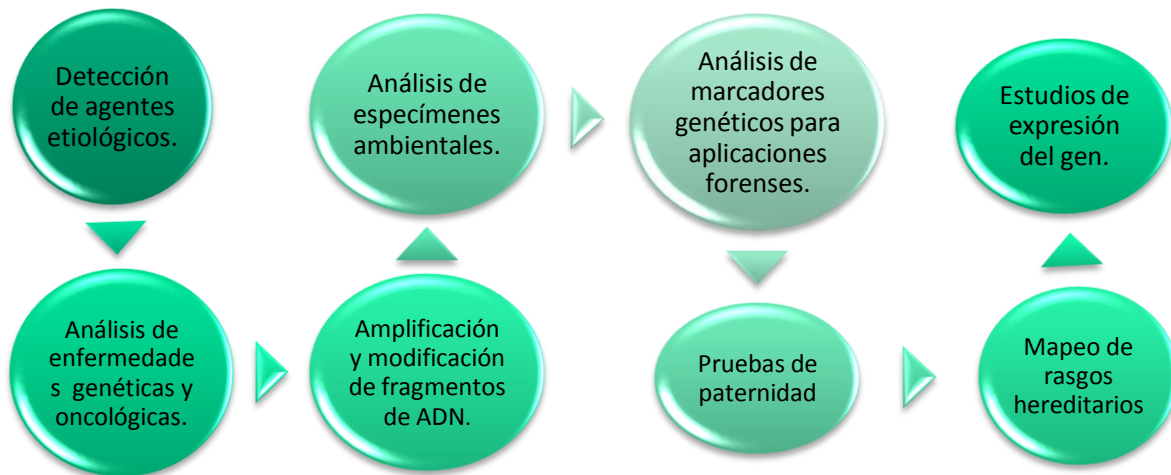


Figura 38. Aplicaciones de la PCR (Bolívar *et al.*, 2014).

1.3.9 Criterios a considerar para la selección adecuada de los primers

La selección de oligonucleótidos iniciadores es muy importante en la reacción en cadena de la polimerasa. De este paso depende el éxito en el laboratorio. En la Tabla 8 se muestran los criterios principales a considerar para la selección adecuada de los primers (Cortázar y Silva, 2004).



Tabla 8. Criterios principales para la selección de primers (Cortázar y Silva, 2004).

Tamaño	Tamaño ideal: 20-25 nucleótidos de longitud generalmente: 18-30 nucleótidos de longitud
Base en el extremo 3'	Debe ser una G o una C
Temperaturas de fusión (Tm)	50-65 °C
contenido GC	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

Otros criterios a considerar para los primers son los siguientes:

- ✓ Las concentraciones óptimas de los primers son generalmente entre 0.1 y 0.5 μM (Cortázar y Silva, 2004).
- ✓ Los primers pueden contener extensiones en el extremo 5' o "mismatches" para incorporar sitios de enzimas de restricción, un codón de inicio ATG, o secuencias promotoras en la secuencia blanco (Cortázar y Silva, 2004).

ESPECIFICIDAD

La especificidad de los primers es en parte dependiente de su longitud. Los primers deben ser elegidos de modo que tengan una secuencia única dentro del ADN que será amplificado (Cortázar y Silva, 2004).

SECUENCIAS COMPLEMENTARIAS DE PRIMERS

Los primers necesitan ser diseñados con menos de 3 pares de bases de homología entre ellos (Cortázar y Silva, 2004).

CONTENIDO DE G/C

La composición base de los primers debe estar entre el 45% y el 55% de G/C. La secuencia de los primers debe ser elegida de tal forma que no haya regiones de poliG o de poliC que pueden promover el reconocimiento no específico (Cortázar y Silva, 2004).

SECUENCIA DE LOS EXTREMOS 3'

La inclusión de un residuo de G o de C en el extremo 3' de los primers ayuda a asegurar el correcto enlace en el extremo terminal 3' debido al enlace de hidrógeno más fuerte de los residuos G/C (Cortázar y Silva, 2004).



CALCULO DE LA TEMPERATURA DE HIBRIDACIÓN (T_m)

Para secuencias de 20 pares de bases o menos, existe la siguiente aproximación:
(Cortázar y Silva, 2004).

$$T_m = ((G + C)4 + (A + T)2) - 5$$

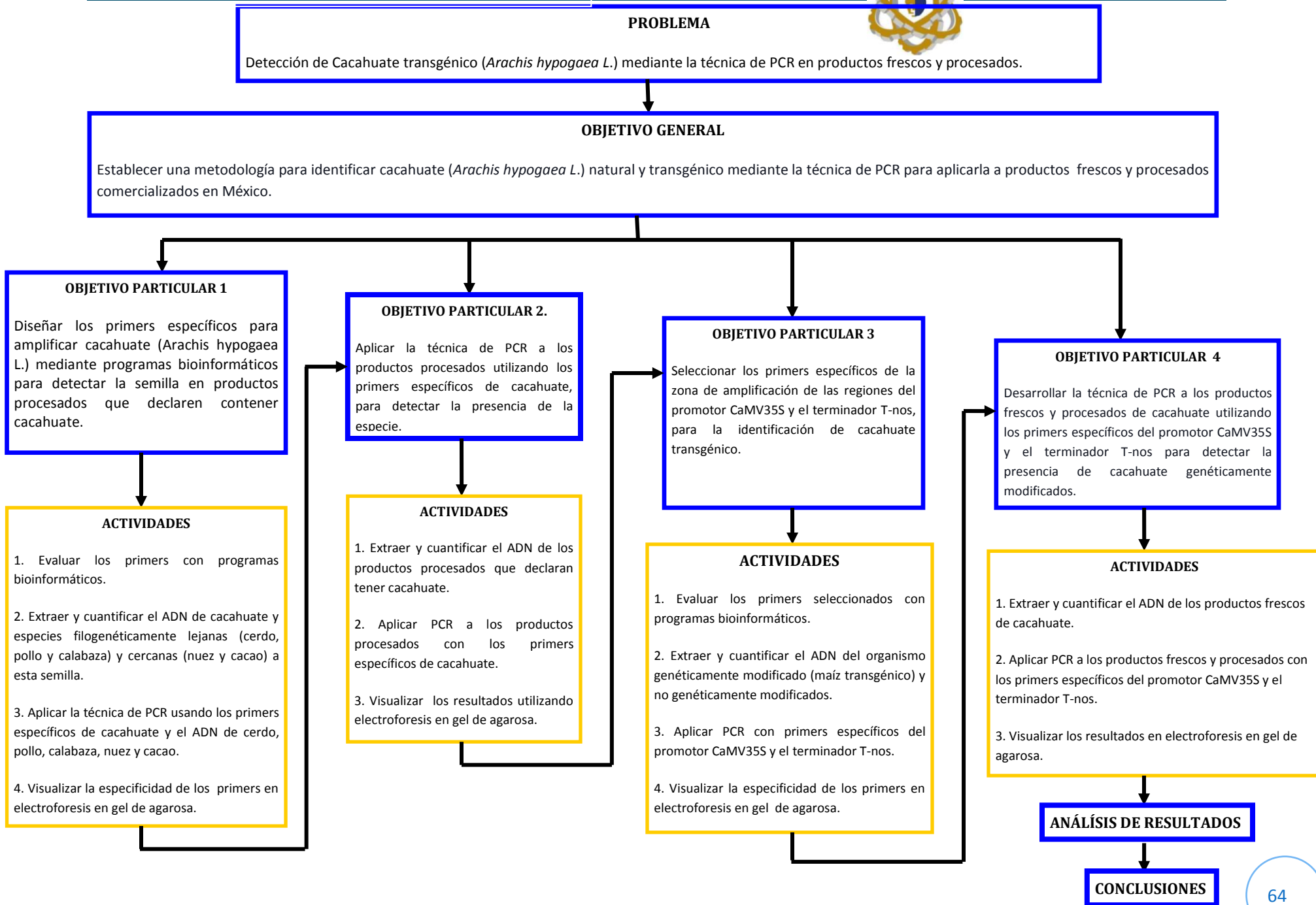
DONDE:

G= # de guaninas

C= # de citocinas

A= # de adeninas

T= # de timinas





2.1 Descripción del cuadro metodológico

La experimentación para este proyecto se compone de 4 objetivos particulares que se describen a continuación, cuyo fin es detectar la presencia de cacahuete transgénico (*Arachis hypogaea* L.) no reportado en el etiquetado de algunos productos que se consumen en México.

OBJETIVO GENERAL

Establecer una Metodología para identificar cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) natural y transgénico mediante la técnica de PCR para aplicarla a productos frescos y procesados comercializados en México.

OBJETIVO PARTICULAR 1

Diseñar los primers específicos para amplificar cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) mediante programas bioinformáticos para detectar la semilla en productos procesados que declaren contener cacahuete.

OBJETIVO PARTICULAR 2

Aplicar la técnica de PCR a los productos procesados utilizando los primers específicos de cacahuete, para detectar la presencia de la especie.

OBJETIVO PARTICULAR 3

Seleccionar los primers específicos de la zona de amplificación de las regiones del promotor CaMV35S y el terminador T-nos, para la identificación de cacahuete transgénico.

OBJETIVO PARTICULAR 4

Desarrollar la técnica de PCR a los productos frescos y procesados de cacahuete utilizando los primers específicos del promotor CaMV35S y el terminador T-nos para detectar la presencia de cacahuete genéticamente modificado.



2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Material biológico

- ❖ **Muestra fresca:** Las muestras de Cacahuate (*Arachis hypogaea L.*) fueron adquiridas en diferentes regiones del país y una proviene de otro país como se muestra en la Tabla 9:

Tabla 9. Muestras naturales para analizar

PRODUCTOS FRESCOS			
PRODUCTO	MUESTRA	PROCEDENCIA	COSTO por kilo (\$)
Cacahuate 1	C-1	Estado de México, Teoloyucan.	Donación
Cacahuate 2	C-2	Estados Unidos de América.	35
Cacahuate 3	C-3	Toluca	Donación
Cacahuate 4	C-4	Estado de Jalisco, Mezquitic de la Magdalena.	Donación
Cacahuate 5	C-5	Estado de Oaxaca, Oaxaca de Juárez.	Donación
Cacahuate 6	C-6	Estado de Monterrey, Apodaca.	Donación
Cacahuate 7	C-7	Ciudad de México (CDMX), Coyoacán	32
Cacahuate 8	C-8	Estado de México, Tlalnepantla.	30
Cacahuate 9	C-9	Estado de Guanajuato, Irapuato.	Donación
Cacahuate 10	H	Estado de Morelos, Coatetelco.	Donación

- ❖ **Muestras procesadas:** Los productos fueron adquiridos en diferentes centros comerciales y tiendas de abarrotes, seleccionando 12 productos de diferentes marcas que declaran contener cacahuate en su etiquetado (Tabla 10).

Tabla 10. Productos comerciales a analizar.

PRODUCTOS PROCESADOS						
PRODUCTO	MUESTRA	PROCEDENCIA	MARCA	COSTO (\$)	FECHA DE CADUCIDAD	LOTE
Crema de cacahuate	CR-A	*Sam's Club	Aladino	68	10-Nov-18	L1531501TM
Crema de maní	CR-J	*Walmart	Jif	59	3-Marzo-19	L7062425020630
Crema untable de cacahuate	CR-G	*Walmart	Great Value	55	4-Oct-18	52737102101613A
Cacahuate kacang	CHT-S	*Walmart	Sabritas	10	1-Oct-17	L1707307



Surtido especial salado	CHT-M	*Walmart	Mafer premium	12	17-Sep-17	L17060V
Cacahuete con nuez de la India	CHT-C	*Walmart	Cashita's	10	Nov-17	12348
Snickers	MK	*Walmart	Milke way	15	18-Abril	718G1MTML2
Botana surtida	CHT-G	*Walmart	Great Value	15	21-Dic-17	67198H
Dulce de palanqueta	D-Pa	Mercado de Chalma	Dulce tradicional	10	NE	NE
Mazapán	MZP	Tienda de Cuauti. Izcalli, C-1	De la rosa	5	25-Nov-18	329171
Cacahuete japonés	CJN	Tienda de Cuauti. Izcalli, C-1	Nishikawa	9	07-Agosto	02068
Cacahuete enchilado Golden Nuts	CHT-N	*Walmart	Barcel	10	11-Oct-17	LJK0139

*: Lugares ubicados en la plaza Lago de Guadalupe, Tlalnepantla Edo. México.

NE= No contaba con una etiqueta en su envoltura, por ser un producto artesanal.

2.2.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevo acabó con las muestras frescas y procesadas de cacahuete (*Arachis hypogaea L.*), que se muestran en la Tabla 9 y Tabla 10.

REACTIVOS

- ✓ Agua dionizada libre de nucleasas
- ✓ Solución de lisis (Tris base 50 nM, pH=8, EDTA 0.1 M, SDS 0.5%)
- ✓ Enzima proteinasa K
- ✓ Mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamilico, en proporción 12:24:1
- ✓ Etanol frío

MATERIAL BIOLÓGICO

- ✓ Semillas de cacahuete (*Arachis hypogaea L.*) y productos procesados de cacahuete.

MATERIAL Y EQUIPO

- ✓ Mortero
- ✓ Tubos eppendorff esterilizados
- ✓ Balanza analítica electrónica, *Cole parmer PR410 Equipar 500 mg*
- ✓ Termoblock



- ✓ Micropipetas *Rainin*
- ✓ Microcentrifuga, *minispin plus eppendorff 1400 rpm*

MÉTODO

Para las muestras frescas y procesadas se utilizó el protocolo de Sambrook, que consiste en la disolución de detergentes para desestabilizar la membrana celular, enzima proteinasa k, extracción de proteínas y polisacáridos con una disolución de fenol cloroformo y alcohol isomilico y por último etanol para la precipitación de ADN (Sambrook y Russell, 2001).

DISGREGACIÓN DEL TEJIDO

Antes de realizar la extracción de ADN de las muestras por separado, se homogenizaron y machacaron en un mortero con nitrógeno frío, esto fue para romper sus paredes celulares y obtener más ADN de las muestras.

1. Se molió la muestra con ayuda de un mortero.
2. Se pesó 104 mg de muestra en un tubo eppendorff esterilizado.
3. Se agregó 1250 μL de solución lisis.
4. Se agitó con el vortex en un tiempo mínimo para homogenizar bien la mezcla.
5. Se adicionó 7 μL de enzima proteinasa K. previamente concentrada a 20 mg/mL
6. Se incubaron los tubos a 50 °C en el termoblock por 2 horas.
7. Se elevó la temperatura del termoblock a 60 °C por 1 hora para desactivar la enzima.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y POLISACÁRIDOS DE ADN

8. Se agregó al tubo que contenía la muestra, 250 μL de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamilico.
9. Se mezcló el tubo varias veces suavemente.
10. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos.
11. Se separaron las fases, separando la fase acuosa superior que contiene el ADN. Esta es de importancia recuperarla.
12. Se trasladó la fase recuperada a un nuevo tubo eppendorrrff esterilizado.

PRECIPITACIÓN DE ADN

13. Se añadió 1500 μL de etanol frío a los tubos de la muestra.
14. Se mezcló con un movimiento suave.
15. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos.



16. Se decantó el etanol y se dejó secar el ADN en la incubadora a 37 °C, durante una hora. El ADN se visualizó pegado al tubo como una mancha blanca.
17. Posterior se adicionó 50 μL de agua desionizada para re-suspender el ADN, agitando suavemente el tubo hasta su completa disolución.
18. Por último se realizó la cuantificación de ADN por medio de absorbancia.

2.2.3 Cuantificación de ADN por medio de absorbancia

Para cuantificar la cantidad de ADN, las lecturas se tomaron a 260 nm y 280 nm. La lectura de 260 nm permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos y 280 nm permite el cálculo de la concentración de proteínas; la relación entre estas lecturas proporciona un estimado de la pureza de los ácido nucleicos. Preparaciones puras de ADN tienen valores de 1.8, mientras que valores de 2, muestran la existencia de preparaciones puras de ARN. Si existe contaminación significativa con fenol y proteínas, la relación 260/280 será menor de 1.8, por lo tanto no es posible utilizar el ADN presente en la solución (Sambrook y Russell, 2001).

REACTIVO:

- ✓ Agua libre de nucleasas.

MATERIAL BIOLÓGICO

- ✓ Muestras de ADN de diferentes especies (Cacahuete fresco y productos procesados).

MATERIAL Y EQUIPO:

- ✓ Nano espectrofotómetro, *Accesolab Nanodrop ND-1000*
- ✓ Micropipetas *Rainin*
- ✓ Puntas esterilizadas

MÉTODO:

1. Se calibró el equipo *Nanodrop* colocando 2 μL de agua libre de nucleasas, en el brazo del equipo.
2. Se abrió el programa "*Nanodrop*" en la computadora y se seleccionó la opción de ácidos nucleicos. Para iniciar el equipo se selección "ok".
3. Se colocó 2 μL de agua libre de nucleasas, la cual sirvió como blanco para la lectura.
4. Se corrió el programa.
5. Se colocó 2 μL de la muestra ADN a cuantificar y se corrió el programa, seleccionando la opción "measure".
6. Se registro la concentración de ADN proporcionada por el equipo, tomando en cuenta la relación 260/280 y los ng/ μL .



7. Se limpió adecuadamente el equipo, con un pañuelo.

2.2.4 Diseño de Primers

- ❖ Secuencias de primers utilizados en la técnica de PCR para la identificación de cacahuete (*Arachis hypogaea L.*).

Para la secuencia de primers seleccionados específicamente del cacahuete (*Arachis hypogaea L.*), se obtuvieron de la página NCBI del gen clone AHRES 1-5 resveratrol synthase del programa bioinformático “Primer Quest Tool”, que se utilizaron para llevar a cabo la PCR se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Secuencia de primers específicos para cacahuete (*Arachis hypogaea L.*).

Primer	Secuencia 5'→3'	No. De bases	Tamaño del Amplificado
Cacahuete Frontal	CGCAATGTTCAAAGAGCAGAAG	22	704pb
Cacahuete Reverso	GCTGGTGGTACAGAAGATCAAA	22	

FUENTE: NCBI, 2017

Se utilizó otra secuencia de primers específicos de cacahuete (*Arachis hypogaea L.*), detectando la presencia del alérgeno Ara h II, característico de esta semilla. Esta pareja de primers fue tomada de Stephan y Vieths (2004) con número de referencia L77197.1 (Tabla 12).

Tabla 12. Secuencia de primers específicos del alérgeno Ara h II de cacahuete (*Arachis hypogaea L.*).

Primer	Secuencia 5'→3'	No. De bases	Tamaño del Amplificado
Ara h II Frontal	TCGCCCTTTTCCTCCTCGCT	20	296pb
Ara h II Reverso	TGCCTCGCACATGCACCTTT	20	

- ❖ Secuencias de primers utilizados en la técnica de PCR para la identificación de transgénicos.

Para las secuencias del promotor y el terminador se utilizaron unos que anteriormente han sido probados en diversos trabajos y los cuales se encuentran reportados en Karamollaoglu *et al.* 2009. Para el promotor CaMV35S del virus mosaico de la coliflor, mientras que para el terminador T-nos de *Agrobacterium tumefaciens*. En la Tabla 13 se encuentran las secuencias de dichos primers.



Tabla 13. Secuencias de primers del promotor CaMV35S y el Terminador T-nos.

Primer	Secuencia 5'→3'	No. De bases	Tamaño del Amplificado
CaMV35S Frontal	GCTCCTACAAATGCCATCA	19	195pb
CaMV35S Reverso	GGATAGTGGGATTGTGCGTC	20	
T-nos Frontal	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	20	180pb
T-nos Reverso	TTATCCTAGTTTGC GCGCTA	20	

Todos los primers que se utilizaron en este trabajo tuvieron una concentración de 25 μL .

2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

REACTIVOS:

1. Agua libre de nucleasas
2. Componentes del kit *Master Mix*® para PCR punto final. La cantidad que se le agrega a cada muestra, se puede visualizar en la Tabla 14:

Tabla 14. Componentes del kit para PCR punto final por cada muestra.

COMPONENTES	PROPORCIÓN DE MUESTRAS
Master mix® (50 unidades de Taq polimerasa 400 μM de cada dNTP y 3Mm de MgCl_2)	12.5 μL
Primer F 25 μL	0.5 μL
Primer R 25 μL	0.5 μL
ADN muestra	1 μL
Agua libre de nucleasas	10.5 μL

3. También se utilizaron los componentes del Kit de "*Phire Plant Direct PCR*", PCR directa. Las cantidades que se le agrega a cada muestra se prepararon de acuerdo al protocolo de *Thermo Scientific*®, mostrado en la Tabla 15:



Tabla 15. Componentes del kit para PCR directa por cada muestra.

COMPONENTES	PROPORCIÓN DE MUESTRAS
2X Phire Plant PCR Buffer	10 μ L
Primer F 25 μ L	0.5 μ L
Primer R 25 μ L	0.5 μ L
ADN muestra	0.5 μ L
Phire® Hot Start II ADN Polymerase	0.4 μ L
Agua libre de nucleasas	8.1 μ L

MATERIAL BIOLÓGICO

- ✓ Muestras de ADN extraídas de cacahuete natural (*Arachis hypogaea L.*) y los productos procesados elaborados con cacahuete.

MATERIAL Y EQUIPO:

- ✓ Termociclador ATC 401, Apollo Instrumentation
- ✓ Micropipetas *Rainin*
- ✓ Tubos eppendorff esterilizados
- ✓ Microcentrifuga

MÉTODO:

1. Se preparó la reacción con los componentes y cantidades mostradas en la Tabla 15 y 16 y sus respectivas parejas de primers.
2. Se centrifugaron las muestras en la microcentrifuga durante 5 segundos aproximadamente.
3. Se colocaron los tubos en el Termociclador y se seleccionó el programa con las condiciones establecidas, según sea la temperatura de hibridación de cada primer utilizado para llevar a cabo el ciclo de la PCR.



2.3.1 Etapas y Ciclos de la reacción

2.3.1.1 Programa de la PCR para los primers diseñados específicos de cacahuete (*Arachis hypogaea L.*)

La programación del termociclador se realizó con las condiciones indicadas en la Figura 39. Este programa fue diseñado para la utilización de los primers específicos de cacahuete, con la temperatura de hibridación (T_m) calculada (anexo 2); las cuales están basadas en experimentos pilotos realizados anteriormente.

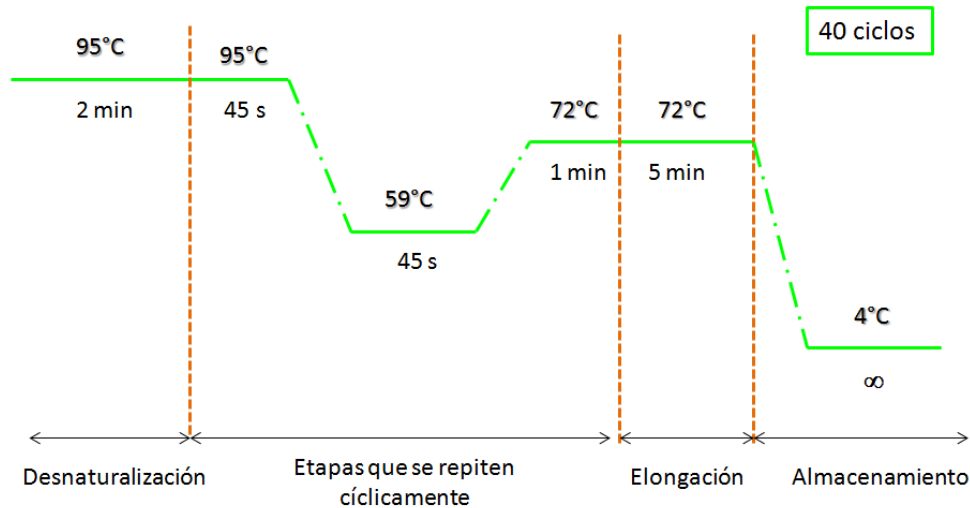


Figura 39. Programa de la PCR punto final para primers específicos de cacahuete.

2.3.1.2 Programa de la PCR para los primers específicos del alérgeno Ara h II de cacahuete (*Arachis hypogaea L.*)

Se realizó un programa para los primers específicos del alérgeno Ara h II de cacahuete para PCR directa, las condiciones de temperaturas se establecieron de acuerdo a lo propuesto en el kit, utilizando la T_m calculada (anexo 3) correspondiente a la pareja de primers. Este programa se muestra en la Figura 40.

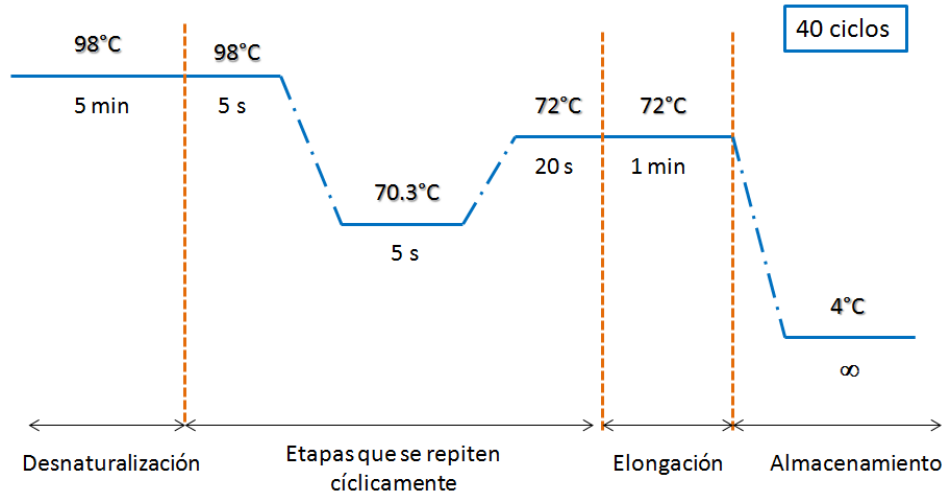


Figura 40. Programa de PCR directa para primers específicos del alérgeno Ara h II de cacahuete.

2.3.1.3 Programa de la PCR con los primers CaMV35S y T-nos para la detección de transgénicos

A continuación se muestra en la Figura 41 las condiciones del programa para el promotor CaMV35S y el terminador T-nos que se estableció de acuerdo a lo propuesto en el kit para PCR directa, utilizando la Tm calculada (anexo 4) correspondiente a las parejas de primers.

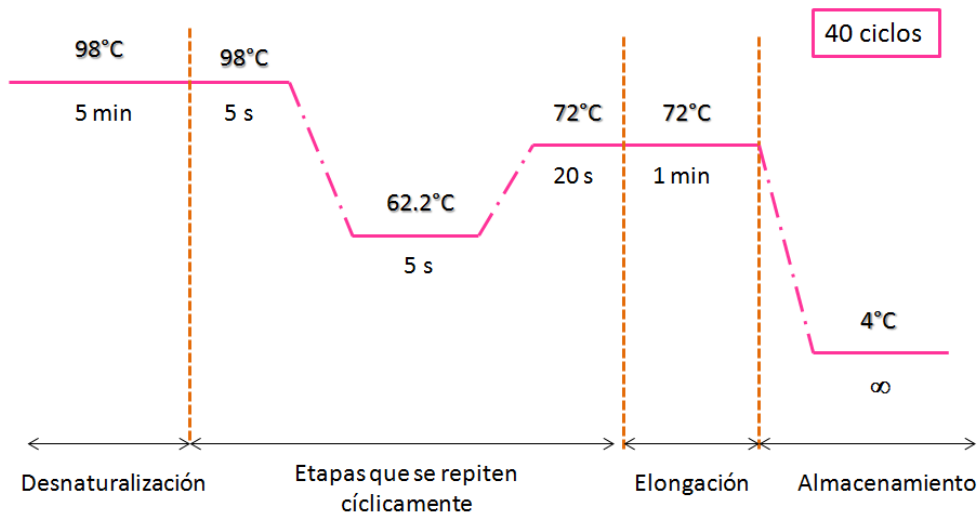


Figura 41. Programa de PCR directa para el promotor CaMV35S y el terminador T-nos.



2.3.2 Evaluación de los productos obtenidos de la PCR mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa

La electroforesis se lleva a cabo sobre geles de agarosa, en donde el gel sumergido actúa como un filtro que contiene una compleja red de poros, a través de los cuales las moléculas tienen que pasar hasta llegar al electrodo positivo (Sambrook y Russell, 2001).

Las moléculas de ácidos nucleicos poseen cargas negativas en sus grupos fosfatos, en un campo eléctrico viajan hacia el electrodo positivo. La electroforesis en gel separa una mezcla de moléculas de ADN en bandas, cada una forma moléculas de ADN de diferente longitud (Sambrook y Russell, 2001).

REACTIVOS:

- ✓ Agarosa
- ✓ Agua libre de nucleasas.
- ✓ TAE 1X
- ✓ BRET (Bromuro de Etidio)
- ✓ Colorante blue/orange

MATERIAL BIOLÓGICO

- ✓ Muestras de ADN resultantes de la PCR.

MATERIAL Y EQUIPO:

- ✓ Horno de microondas
- ✓ Micropipetas *Rainin*
- ✓ Cámara de electroforesis
- ✓ Transluminador de luz UV Bio-Imaging Systems UVP
- ✓ Foto-documentador
- ✓ Balanza analítica electrónica, *Cole parmer PR410 Equipar 500 mg*
- ✓ Matraz erlenmeyer de 200 mL
- ✓ TAE 1X (50mL de Tris acetato y EDTA) como solución buffer pH=8



MÉTODO:

Una vez concluido la técnica de PCR se procedió a realizar la visualización de las muestras de cacahuete fresco y de los productos procesados en geles de agarosa, con concentraciones variadas.

Para la identificación de cacahuete fresco y para el promotor CaMV35S, se utilizó una concentración de agarosa al 2.5%. Se peso 1.25 g de agarosa en 50mL de TAE 1X para la disolución.

Mientras que para la identificación del terminador T-nos para la detección de transgénicos, se utilizó una concentración de agarosa al 3%. Se peso 1.5 g de agarosa en 50 mL de TAE 1X para la disolución.

1. Se calentó la disolución en horno de microondas aproximadamente 1 min por espacios de 20 s.
2. Se añadió una gota de BRET y se mezcló.
3. Se cerraron las aperturas laterales del soporte del gel y se colocó el peine.
4. Se vertió la mezcla en el soporte cuidando que no se formen burbujas y se colocó los peines.
5. Se espero a que la solución gelifique.
6. Una vez gelificado, se retiró el peine y posterior se colocó el soporte con el gel en la cámara de electroforesis.
7. Se agregó TAE 1X a la cámara.

CARGA Y CORRIDA DEL GEL

8. Se colocó en un trozo de parafilm 3 μ L de BRET, 3 μ L de colorante blue/orange y 5 μ L de la muestra resultante de la PCR. Para el marcador de peso molecular se colocó 3 μ L en el primer carril; se utilizaron marcadores de 100 pb y de 50pb.
9. Se mezclaron estas 3 sustancias, por cada muestra, con ayuda de una micropipeta.
10. Se cerró la cámara de electroforesis y se activó el campo eléctrico a 60 v.
11. La corrida duró aproximadamente 1 hora y media hasta que el colorante se visualizó cerca del extremo opuesto.



2.3.3 Visualización de fragmentos

Una vez finalizado el traslado del ADN al otro extremo del campo eléctrico del gel, se prosigue a visualizar los resultados del fragmento amplificado con respecto al marcador de peso molecular, siguiendo los siguientes pasos:

12. Se retiró el gel de la cámara de electroforesis para colocarlo dentro del transluminador de luz UV Bio-Imaging Systems UVP.
13. Se centró el gel dentro del foto-documentador y posterior se encendió el transluminador de luz UV.
14. Se encendió la cámara y con ayuda del filtro se fotografió el gel.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Objetivo Particular 1

Diseñar los primers específicos para amplificar cacahuate (*Arachis hypogaea L.*) mediante programas bioinformáticos para detectar la semilla en productos procesados que declaren contener cacahuate.

3.1.1 Primers específicos para la detección de cacahuate (*Arachis hypogaea L.*)

Se diseñaron los primers específicos de cacahuate (*Arachis hypogaea L.*) en el programa bioinformático NCBI “PrimerQuest Tool” (anexo 1), la secuencia de dichos primers se muestra en la Tabla 11.

3.1.2 Extracción y Cuantificación de ADN de las muestras

Una vez que los primers fueron diseñados fue necesario probarlos mediante la técnica de PCR, por lo que primero se tuvo que extraer del ADN de algunas muestras de semilla de cacahuate por el método de Sambrook, para buscar la amplificación de este por PCR (control positivo), y se determinó su concentración por medio de la cuantificación. A continuación se reportan los datos obtenidos en la Tabla 16.

Tabla 16. Cuantificación y purezas de ADN de las muestras de semilla de cacahuate (*Arachis hypogaea L.*).

PRODUCTO	MUESTRA	ADN [] [ng/μL]	PUREZA 260/280	ADN diluido [ng/μL]	PUREZA 260/280
Semillas de cacahuate	C-3	195.4	0.07	79.2	1.41
	C-7	2136.7	1.27	66.3	1.70
	C-8	1999.4	0.82	94.1	1.48
Planta de cacahuate	H	ND	ND	—	—

ND= No detectada por el Nanodrop.

La alta concentración de ADN puede afectar a la PCR e inhibirla al momento de la replicación e hibridación de los primers, por lo que se tuvo que realizar diluciones a aquellas muestras con alta concentración. Estas diluciones se realizaron con agua libre de nucleasas hasta alcanzar una concentración ideal entre 50-100ng/μL. De igual manera se buscó una relación 260/280 de valores cercanos a 1.8, lo que indica una pureza óptima para que la *Taq* polimerasa funcione correctamente (Tabla 16).



3.1.3 Identificación de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) como control positivo

Se realizó la PCR punto final con el Master mix®, utilizando las muestras de ADN diluidas, con la pareja de primers diseñados de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) a una T_m de 59°C utilizando las condiciones del programa de la Figura 39. Los resultados se muestran en la Figura 42.

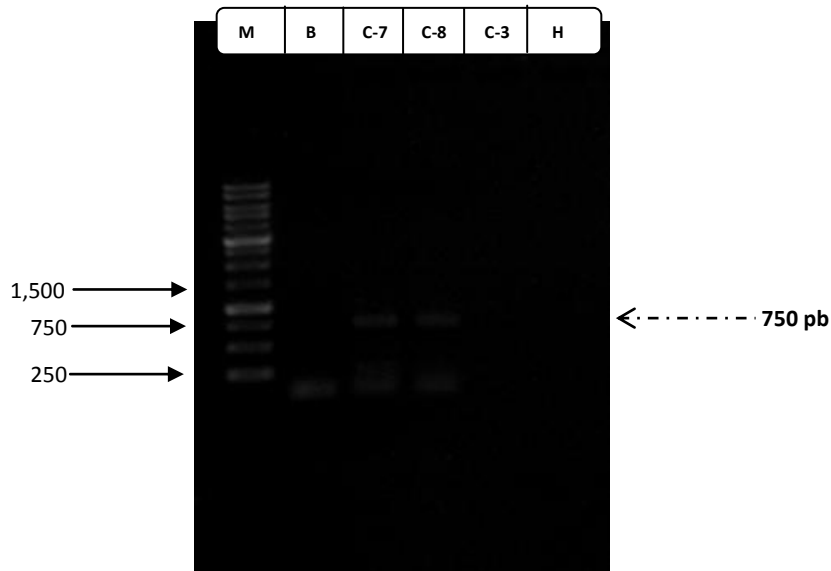


Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 90V para la identificación de la especie *Arachis hypogaea* L. (control positivo); (M) marcador de peso molecular de 1 Kb; (B) blanco; (C-7) cacahuate de Coyoacán; (C-8) cacahuate de Tlalnepantla; (C-3) cacahuate de Toluca; (H) planta de cacahuate de Morelos.

Se probó inicialmente la temperatura de hibridación ($T_m=62^\circ\text{C}$) que nos proporcionó el programa bioinformático donde se diseñó la pareja de primers en experimentos pilotos realizados anteriormente, pero no se obtuvieron resultados favorables por lo que se decidió hacer el intento con la T_m calculada (anexo 2), la cual nos dio un valor de $T_m=59^\circ\text{C}$ de manera que la pareja de primers diseñadas amplificó en las muestras C-7 (cacahuate de Coyoacán) y C-8 (cacahuate de Tlalnepantla), lo que permitió la identificación de la especie *Arachis hypogaea* L. La muestra C-7 fue utilizada como control positivo en las siguientes experimentaciones debido a que su relación 260/280 fue más pura comparada con la muestra C-8. Mientras que las muestras C-3 y H no se logro observar algún amplificado, por lo que se volvió a extraer ADN de dichas muestras (Figura 42).

Cabe mencionar que el amplificado que nos marca el programa bioinformático de la pareja de primers diseñados es de 704 pb, por lo que se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb para corroborar que después de varios experimentos preliminares,



el amplificado correcto de este par de primers diseñados es de 750 pb como se observa en la Figura 42.

3.1.4 Prueba de especificidad de los primers diseñados para cacahuete (*Arachis hypogaea L.*)

Después de haber obtenido el amplificado del ADN de cacahuete que fue utilizado como control positivo, se realizó la prueba de especificidad de la pareja de primers para afirmar que no hibridarán para otras especies filogenéticamente cercanas y lejanas, y que fueran específicos para cacahuete. Para dicha prueba se extrajeron las muestras por el método de Sambrook y se cuantificó el ADN de las muestras. Se observan en la Tabla 17 los resultados.

Tabla 17. Cuantificación y purezas de ADN de las muestras filogenéticamente cercanas y lejanas al cacahuete.

PRODUCTO	MUESTRA	ADN [] [ng/μL]	PUREZA 260/280	ADN diluido [ng/μL]	PUREZA 260/280
Pollo	P	1403.0	2.19	52.3	1.60
Cerdo	Cd	2213.9	1.50	59.9	1.62
Calabaza	Ca	2051.1	2.23	68.7	1.72
Nuez	N	3366.1	1.90	69.1	1.59
Cacao	Co	769.5	1.64	51.1	1.30

Se utilizaron todas las muestras de ADN diluido, ya que cuentan con una concentración y pureza adecuada para realizar la PCR punto final con el Master mix®, utilizando las condiciones de la Tabla 14, con la pareja de primers diseñados de cacahuete (*Arachis hypogaea L.*) y el programa de la Figura 39. Posteriormente se realizó la electroforesis y los resultados que se obtuvieron se muestran en la Figura 43.

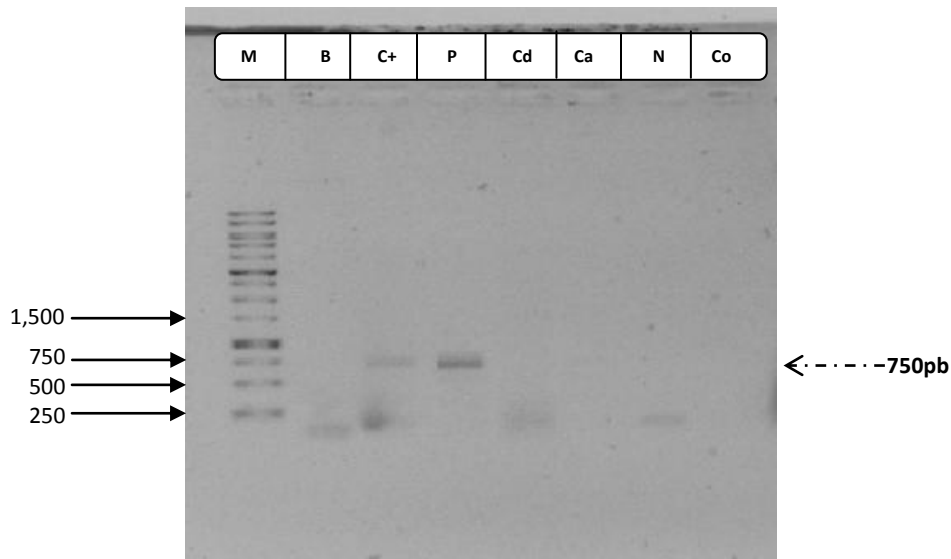


Figura 43. Electroforesis con gel de agarosa al 0.8% a 90V para la prueba de especificidad de los primers diseñados para cacahuate (*Arachis hypogaea* L.); (M) marcador de peso molecular de 1 kb; (B) blanco; (C+) control positivo muestra C-7 cacahuate de Coyoacán; (P) pollo; (Cd) cerdo; (Ca) calabaza; (N) nuez; (Co) cacao.

Los primers diseñados a partir del gen *Arachis hypogaea* clone AHRES 1-5 resveratrol synthase, resultaron no ser específicos para la identificación de esta especie, ya que en la Figura 43 se observó otro amplificado de 750 pb que corresponde a la muestra de Pollo (carril P), mientras que para las muestras de cerdo (carril Cd), de calabaza (carril Ca), de nuez (carril N) y de cacao (carril Co) no hubo ningún amplificado.

Lo que nos indicó que estos primers a pesar de no ser específicos de esta especie, se podían seguir utilizando para el estudio, ya que amplificaron para una especie filogenéticamente lejana a la del cacahuate, y los productos procesados que se estudiaron en este trabajo no contienen pollo, por lo que no hubo ningún problema para identificar la leguminosa.

3.1.5 Amplificación de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) en semillas y hojas de las plantas

Una vez realizada la prueba de especificidad de la pareja de los primers diseñados y ya encontrado un programa para PCR punto final con la T_m adecuada para su hibridación, se evaluaron las muestras frescas de cacahuate con dichos primers. Para ello se elaboró la extracción y cuantificación de ADN de algunas muestras por el método de Sambrook. Los resultados que se obtuvieron en la cuantificación de ADN se expresan en la Tabla 18.



Tabla 18. Cuantificación y perezas de ADN de algunas muestras de semillas y plantas de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.).

PRODUCTO	MUESTRA	ADN [] [ng/μL]	PUREZA 260/280	ADN diluido [ng/μL]	PUREZA 260/280
Semilla de cacahuate	C-3	1803.1	1.89	204.2	1.91
	C-4	4499.2	1.82	103.0	1.98
	C-5	5120.2	1.54	135.5	1.88
	C-6	5070.0	1.33	48.1	1.92
	C-8	4883.1	1.66	91.8	1.88
	C-9	3434.1	1.84	65.7	1.80
Planta de cacahuate	H	ND	ND	156.7	1.48

ND= No detectadas por el Nanodrop.

Las muestras de semillas y plantas de cacahuate de la Tabla 18 tenían altas concentraciones, debido a esto se diluyeron para llevar a cabo la PCR punto final, a pesar de que las muestras diluidas C-3, C-4, C-6 y H marcaron valores mayor a 1.8, con presencia de ARN, estas fueron utilizadas porque mostraban una concentración considerable para la técnica. Con ayuda de la pareja de primers diseñados para identificar cacahuate y las condiciones del programa de la Figura 39, se hizo la PCR punto final y los resultados se muestran en la Figura 44.

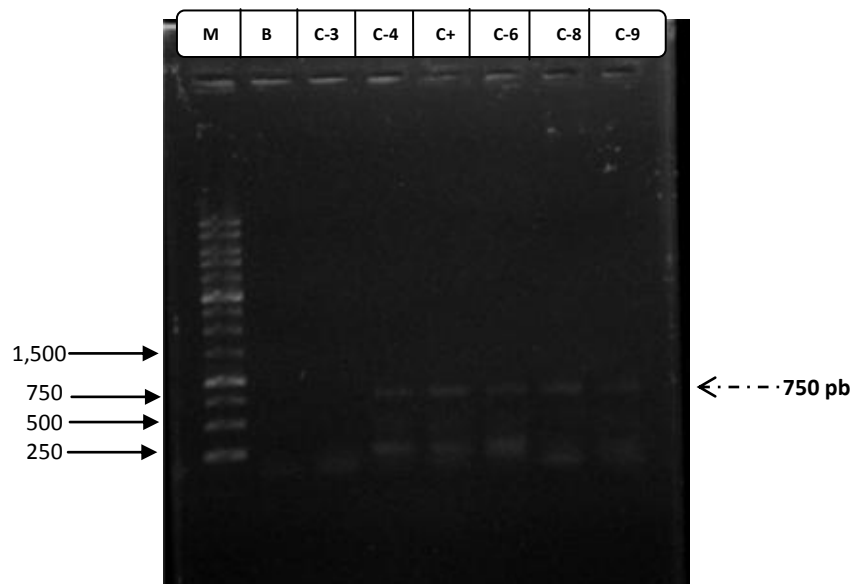


Figura 44. Electroforesis con gel de agarosa al 0.8% a 90V para la identificación de la especie *Arachis hypogaea* L. en semillas de cacahuate; (M) marcador de peso molecular de 1 Kb; (B) blanco; (C-3) cacahuate de Toluca; (C-4) cáhuate de Jalisco; (C+) control positivo muestra de Coyoacán C-7; (C-6) cacahuate de Monterrey; (C-8) cacahuate de Tlalnepantla; (C-9) cacahuate de Guanajuato.



En la Figura 44 se observaron resultados favorables del amplificado esperado de 750 pb con los primers específicos de la especie *Arachis hypogaea L.* para las muestras de cacahuete provenientes de Jalisco (carril C-4), Monterrey (carril C-6), Tlalnepantla (carril C-8) y Guanajuato (carril C-9), excepto para la muestra del carril C-3 (cacahuete proveniente de Toluca); esto fue porque el ADN que se extrajo de la muestra no era puro; al realizar la cuantificación de la dilución se identificó que su concentración de ADN era muy alta y su pureza estaba cercana a 2, es decir, con presencia de ARN, tal vez estos factores interfirieron con la Taq polimerasa termoestable, ya sea mediante el bloqueo directo total o parcial de su actividad catalítica o mediante la unión directa al ADN de doble cadena lo que logra inhibir la técnica de PCR punto final (Microbial, 2009).

De la misma manera ocurrió con la muestra de la planta de cacahuete proveniente de Morelos (H) (Figura 45); al realizar la extracción por Sambrook se hicieron dos lavados con fenol-cloroformo y fue diluida colocando 10 μL de muestra en 10 μL de agua libre de nucleasas en un tubo estéril, a pesar de que se diluyó la muestra para realizar la PCR y se encontraron resultados cuantificables en el nanodrop, no se observó ninguna banda al momento de elaborar la electroforesis, la pureza de la muestra estaba por debajo de 1.8 lo que nos indica contaminación por proteínas y otras sustancias características de la planta como pigmentos.

Los pigmentos de las plantas son compuestos que absorben la luz en ciertas regiones del espectro visible. Las longitudes de onda que no son absorbidas son reflejadas, por ello, la clorofila al absorber la luz en el espectro rojo y azul refleja el verde, lo que da este color a las plantas (SAGARPA-INIFAP, 2006). Existen compuestos inorgánicos y orgánicos naturales que inhiben a los ácidos nucleicos utilizados para la amplificación de genomas diana (transcriptasa inversa y Taq polimerasa). Varias proteínas, carbohidratos y otros compuestos orgánicos pueden unirse a los iones de magnesio y a los nucleótidos requeridos por los ácidos nucleicos, haciéndolos no disponibles para la polimerasa al momento de desarrollar la PCR (Schwab *et al.*, 1995). Debido a esto se buscó otra forma de extraer el ADN de la planta.

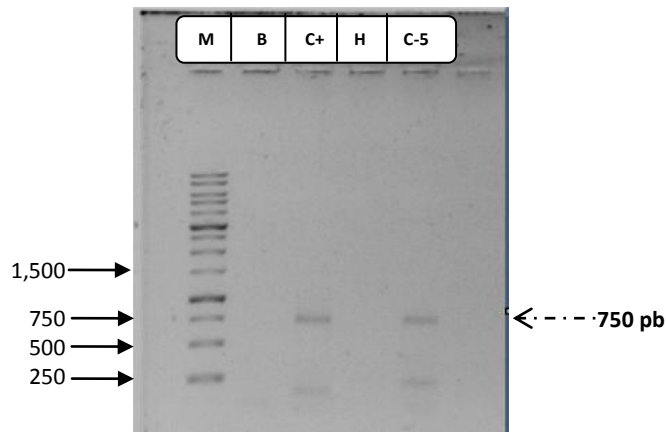


Figura 45. Electroforesis con gel de agarosa al 0.8% a 90V para la identificación de la especie *Arachis hypogaea L.* en cacahuete; (M) marcador de peso molecular de 1 Kb; (B) blanco; (C+) control positivo muestra de Coyoacán C-7; (H) planta de cacahuete de Morelos; (C-5) cacahuete de Oaxaca.

3.1.6 Identificación de *Arachis hypogaea L.* con primers del alérgeno Ara h II de cacahuete

Se investigaron varias alternativas para lograr el amplificado de los primers para la planta de cacahuete proveniente de Morelos, haciendo diversas pruebas hasta que se obtuvo un amplificado por medio del Kit *Phire Plant Direct PCR*.

Posteriormente hubo un problema con los primers diseñados para detectar cacahuete, estos fueron contaminados en el transcurso de la experimentación, por lo que se tuvo que usar otra secuencia de primers para continuar con el trabajo propuesto, esta secuencia detecta el alérgeno Ara h II del cacahuete.

Se utilizó el kit *Phire Plant Direct PCR* para PCR directa de la marca *Thermo Scientific®*, para continuar con la experimentación.

3.1.7 Control positivo para la detección de *Arachis hypogaea L.* en PCR directa

Se utilizó la muestra de cacahuete proveniente de Coyoacán (C-7) que anteriormente era el control positivo con los primers diseñados específicos de la especie *Arachis hypogaea L.*, y la muestra de la planta de cacahuete proveniente de Morelos (H), estas se sometieron al kit *Phire Plant Direct PCR* con las condiciones de la Tabla 15 y el programa para la PCR directa con los primers para detectar el alérgeno Ara h II del cacahuete ya diseñado en la Figura 40 con una $T_m=70.3$, se prosiguió a hacer una prueba de PCR directa y los resultados que se obtuvieron se observan en la Figura 46.

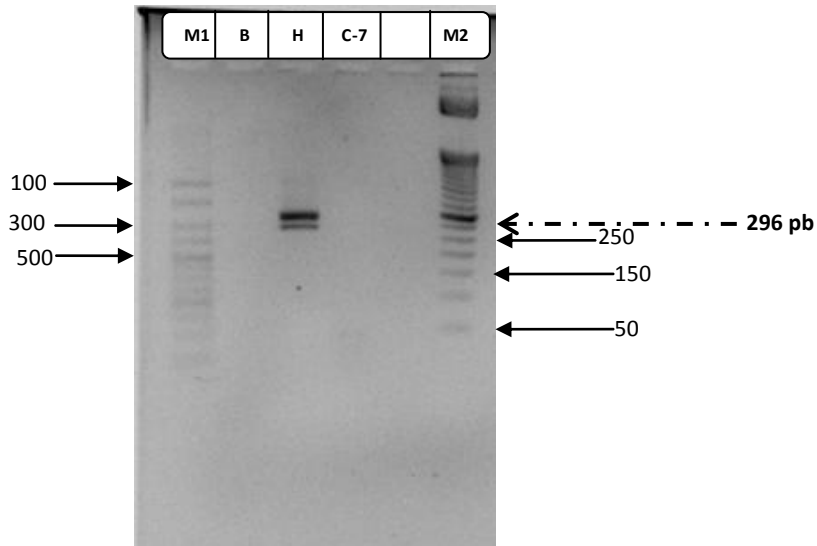


Figura 46. Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del alérgeno Ara h II del cacahuate con PCR directa; (M1) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (H) planta de cacahuate de Morelos; (C-7) semilla de cacahuate proveniente de Coyoacán; (M2) marcador de peso molecular de 50 pb.

Como se muestra en la Figura 46 la técnica de la PCR directa tuvo resultados satisfactorios con la muestra de la planta de cacahuate proveniente de Morelos, lo que nos indica que sirvió el kit *Phire Plant Direct PCR*, mientras que para la muestra de semilla proveniente de Coyoacán (carril C-7) no hubo tal éxito, por lo que se deberá extraer todas las muestras de grano de cacahuate por el protocolo de Sambrook 2001, para poder realizar dicha técnica.

Cabe mencionar que en el amplificado se observan dos bandas, la banda del amplificado 296pb pertenece al alérgeno Ara h II y el de la banda superior a está pertenece a Ara h 2.02 el cual es un isoalérgeno del alérgeno Ara h II.

Una vez realizada la extracción de los productos frescos de cacahuate por Sambrook se prosiguió a cuantificar las muestras y a hacer las diluciones. Los resultados se muestran en la Tabla 19.



Tabla 19. Cuantificación y pureza del ADN de las semillas de cacahuete.

PRODUCTO	MUESTRA	ADN [] [ng/μL]	PUREZA 260/280	ADN diluido [ng/μL]	PUREZA 260/280
Semilla de cacahuete	C-1	3680.0	1.88	~~	~~
	C-2	2789.8	1.74	~~	~~
	C-3	4609.2	1.75	2867.8	1.79
	C-4	4737.1	1.71	2762.2	1.75
	C-5	3897.1	1.85	~~	~~
	C-6	5123.3	1.42	3590.6	1.96
	C-7	4969.8	1.53	3093.4	1.98
	C-8	5011.7	1.53	3226.2	1.95
	C-9	3696.2	1.78	~~	~~

~~: No se realizaron diluciones.

Posteriormente se realizó la PCR directa con las condiciones de la Tabla 15, con los primers específicos del alérgeno Ara h II del cacahuete y con el programa de la Figura 40. Se utilizaron las muestras concentradas de ADN de cacahuete C-1, C-2, C-5 y C-9, como se puede observar en la Tabla 19 dichas muestras tuvieron valores cercanos a 1.8 con una concentración por debajo de 4000 ng/μL, ya que a esta concentración se visualizó un mejor amplificado. Las muestras de cacahuete C-3, C-4, C-6, C-7 y C-8 fueron diluidas porque en su relación 260/280 de las muestras concentradas mostraron contaminación por proteínas y esto podría inhibir la PCR, sin embargo estas muestras fueron utilizadas, a pesar de que su pureza no haya quedado en los parámetros de 1.8, tenían una concentración adecuada para realizar la PCR directa.

Se prosiguió a realizar la electroforesis con los resultados de la PCR directa de las muestras frescas de cacahuete, los resultados se pueden observar en la Figura 47 y 48. En ambas Figuras se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pb, una muestra blanco (carril B) y una muestra de planta de cacahuete proveniente de Morelos como control positivo (carril C+).

En la Figura 47 se visualizaron los amplificados de 296 pb de las muestras de cacahuates provenientes de Teoloyucán (carril C-1), de Estados Unidos (carril C-2), de Toluca (carril C-3), de Jalisco (carril C-4) y de Oaxaca (carril C-5), lo que nos señaló la presencia de la especie *Arachis hypogaea L.* en dichas muestras.

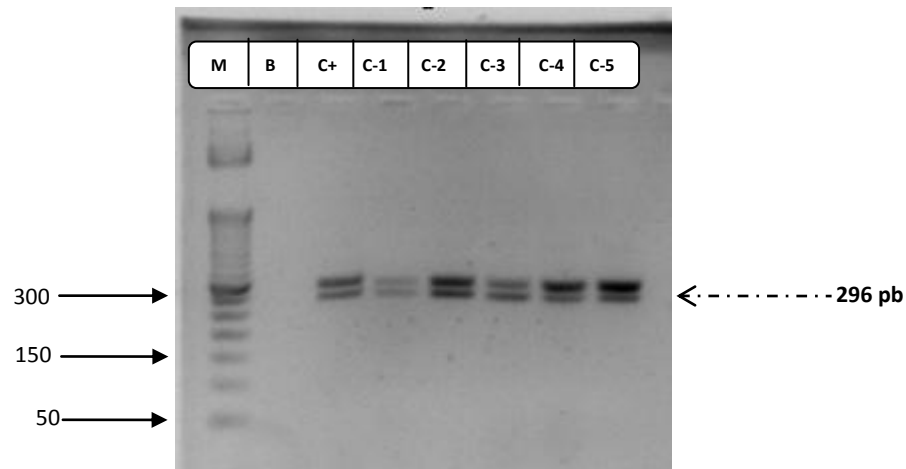


Figura 47. Electroforesis con gel de agarosa al 3% a 60V para la identificación del alérgeno Ara h II de las semillas de cacahuete con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 50 pb; (B) blanco; (C+) control positivo planta de Morelos H; (C-1) cacahuete de Teoloyucán; (C-2) cacahuete de E.U.; (C-3) cacahuete de Toluca; (C-4) cacahuete de Jalisco; (C-5) cacahuete de Oaxaca.

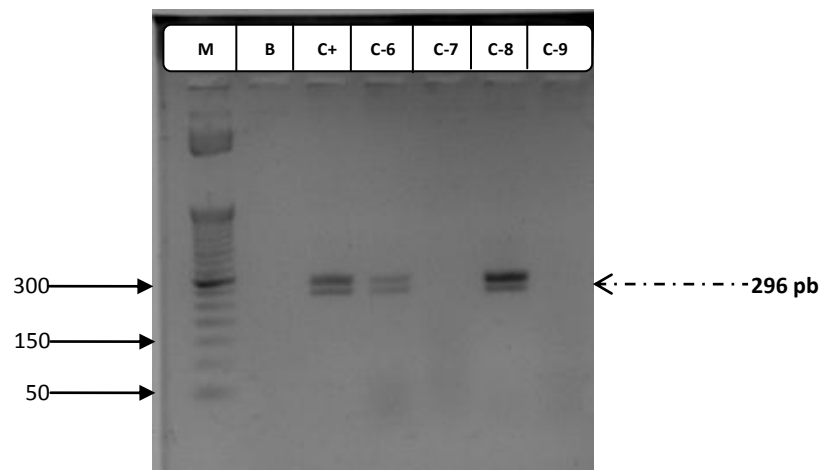


Figura 48. Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del alérgeno Ara h II de las semillas de cacahuete con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 50 pb; (B) blanco; (C+) control positivo planta de Morelos H; (C-6) cacahuete de Monterrey; (C-7) cacahuete de Coyoacán CDMX; (C-8) cacahuete de Tlalnepantla; (C-9) cacahuete de Guanajuato.

De igual manera se observó en la Figura 48 que se obtuvieron resultados favorables con los primers específicos de cacahuete que detectaron el alérgeno Ara h II de este, obteniendo amplificadas visibles de 296 pb en las muestras de cacahuates provenientes de Monterrey (carril C-6) y de Tlalnepantla (carril C-8), excepto para las muestras del carril C-7 (cacahuete de Coyoacán CDMX) y del carril C-9 (cacahuete de Guanajuato), sin embargo, con la PCR punto final utilizando Master Mix® y los primer



específicos diseñados de cacahuete se obtuvieron resultados positivos con estas muestras, recordando que la muestra C-7 fue el control positivo para los primers diseñados (Figura 44). Por consiguiente estos resultados nos indicaron la presencia de *Arachis hypogaea* L. en los 10 productos frescos que se propusieron para este trabajo.

3.2 Objetivo Particular 2

Aplicar la técnica de PCR a los productos procesados utilizando los primers específicos de cacahuete, para detectar la presencia de la especie.

3.2.1 Extracción y Cuantificación de los productos procesados

Para desarrollar este objetivo se tuvo que realizar la extracción del ADN de los 12 productos procesados que se indican en la Tabla 10, para dicha extracción se utilizó el protocolo de Sambrook. Una vez elaborada la extracción se prosiguió a realizar la cuantificación de las muestras, y los resultados que se obtuvieron se presentan en la Tabla 20.

Tabla 20. Cuantificación y purezas del ADN de los productos procesados de cacahuete.

PRODUCTO	MUESTRA	ADN [] [ng/μL]	PUREZA 260/280	ADN diluido [ng/μL]	PUREZA 260/280
Crema de cacahuete	CR-A	3358.1	1.64	1786.1	1.61
Crema de maní	CR-J	2652.1	1.47	1420.1	1.46
Crema untable de cacahuete	CR-G	3261.8	1.59	1741.7	1.58
Cacahuete salado	CHT-S	2784.7	1.87	~~	~~
Botana de cacahuete	CHT-M	3548.0	1.94	1882.5	1.93
Cacahuete surtido	CHT-G	3034.9	1.89	1564.8	1.78
Cacahuete enchilado	CHT-N	3535.2	1.94	2411.8	1.88
Mazapán	MZP	2280.7	1.84	46.0	1.82
Chocolate con cacahuete	MK	2152.9	1.81	50.9	1.76
Palanqueta	D-Pa	2651.0	1.9	51.9	1.84
Cacahuete con nuez de la india	CHT-C	3487.9	1.89	43.5	1.79
Cacahuete japonés	CJN	4417.9	1.87	69.7	1.92

~~: No se realizaron diluciones.

Para llevar a cabo la PCR directa se realizaron diluciones a todas las muestras de ADN, debido a que no contaban con una concentración para realizar la PCR, a excepción de la muestra CHT-S, ya que está contaba con una concentración y pureza apropiada para realizar la técnica. Se elaboraron las diluciones como se muestran en la Tabla 20 con el



fin de alcanzar concentraciones bajas, es decir, que no rebasen los 4000ng/μL y purezas cercanas a 1.8 para que la PCR no se inhiba y la Taq polimerasa funcione correctamente.

Las 3 muestras diluidas de crema de maní tienen una pureza por debajo de 1.8, lo que significa que hubo contaminación con proteínas del mismo alimento, recordando que el contenido de proteínas en el cacahuete es de 27%; cuando se trata de productos procesados, estos se encuentran mezclados con otros componentes para su procesamiento, lo que no se logra limpiar bien la muestra, por lo que se hizo un segundo lavado con fenol cloroformo al momento de realizar la extracción de ADN y esté no se logro eliminar del todo, lo que señala otro factor para tener una pureza por debajo de 1.8.

Sin embargo en las demás muestras diluidas se tienen valores de pureza cercanos a 1.8, por lo que el ADN extraído pudo ser utilizado para realizar la técnica de PCR.

Se realizó la PCR directa con las condiciones de la Tabla 15, con los primers específicos del alérgeno Ara h II del cacahuete y con el programa para el termociclador de la Figura 40. Es importante mencionar que como control positivo para estas pruebas se siguió utilizando la muestra de planta de cacahuete, proveniente de Morelos (H), lo que nos indicará la existencia de la especie *Arachis hypogaea L.* en los diferentes productos comerciales.

Se realizó la electroforesis con geles de agarosa y los resultados que se obtuvieron se observan en las Figuras 49, 50, 51 y 52.

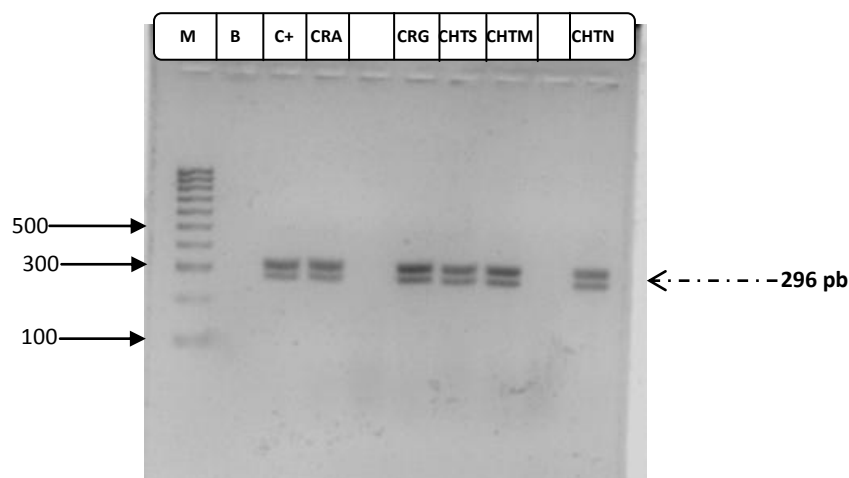


Figura 49. Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del alérgeno Ara h II de la especie *Arachis hypogaea L.* en productos procesados con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo planta de Morelos H; (CRA) crema de cacahuete; (CRG) crema untable de cacahuete; (CHTS) cacahuete salado; (CHTM) botana de cacahuete; (CHTN) cacahuete enchilado.



En la Figura 49 se pudo observar el amplificado de 296 pb con ayuda de un marcador de peso molecular de 100 pb de 4 productos procesados que en su etiqueta declaran estar hechos con cacahuete, como lo son 2 cremas de maní de la marca “Aladino” (carril CRA) y “Great Value” (carril CRG) provenientes de Estados Unidos, y algunas botanas de cacahuete que se comercializan en México como lo son: cacahuete salado de la marca “Sabritas” (carril CHTS), botana de cacahuete de la marca “Mafer” (carril CHTM) y cacahuete enchilado de la marca “Barcel” (carril CHTN).

Estos resultados nos indican la presencia de la especie *Arachis hypogaea L.* en los productos que se muestran en las imágenes anteriores.

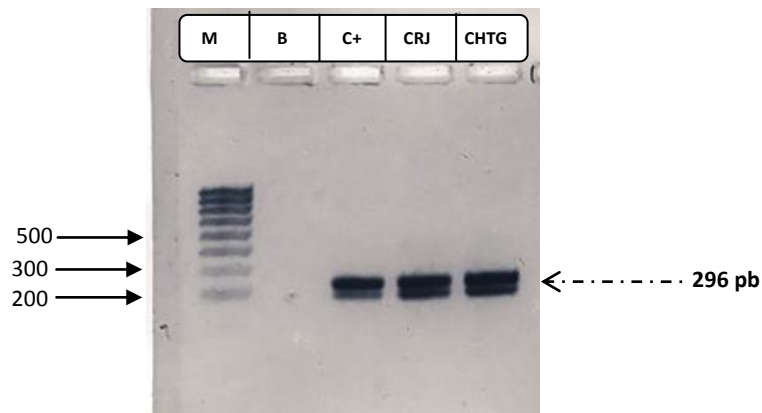


Figura 50. Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del alérgeno Ara h II de la especie *Arachis hypogaea L.* en productos procesados con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo planta de Morelos H; (CRJ) crema de maní; (CHTG) botana surtida de cacahuete.

También se lograron visualizar resultados positivos con amplificaciones de 296 pb como se muestra en la Figura 50, de la muestra de crema de maní de la marca “Jif” (carril CRJ) que también es un producto elaborado en Estados Unidos y la muestra botana surtida de cacahuates de la marca comercial “Great Value” (carril CHTG), estos amplificados corroboraron la presencia de la especie *Arachis hypogaea L.* en dichos productos como lo declara su etiquetado.

En la Figura 51 se observan amplificados de 296 pb de las muestras de cacahuete con nuez de la India de la marca “Cashita’s” (carril CHTC), la muestra de cacahuete japonés de la marca “Nishikawa” (carril CJN), chocolate con trozos de cacahuete de la marca “Milke way” (carril MK) y la muestra de dulce de mazapán de la marca “De la Rosa” (carril MZP). A pesar de que estas muestras no solo contenían cacahuete, si no también grasas, azúcares, chocolate, saborizantes artificiales entre otros aditivos, no fueron factores que afectaran a la PCR.

Por lo que los resultados declaran la presencia de la especie *Arachis hypogaea L.* en los productos comerciales como lo mencionan sus etiquetas.

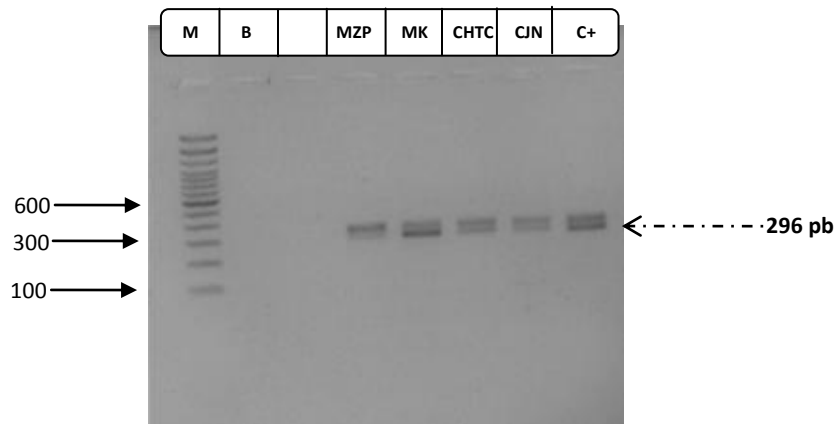


Figura 51. Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del alérgeno Ara h II de la especie *Arachis hypogaea L.* en productos procesados con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (MZP) dulce de mazapán; (MK) chocolate snickers; (CHTC) cacahuete con nuez de la india; (CJN) cacahuete japonés; (C+) control positivo planta de Morelos H.

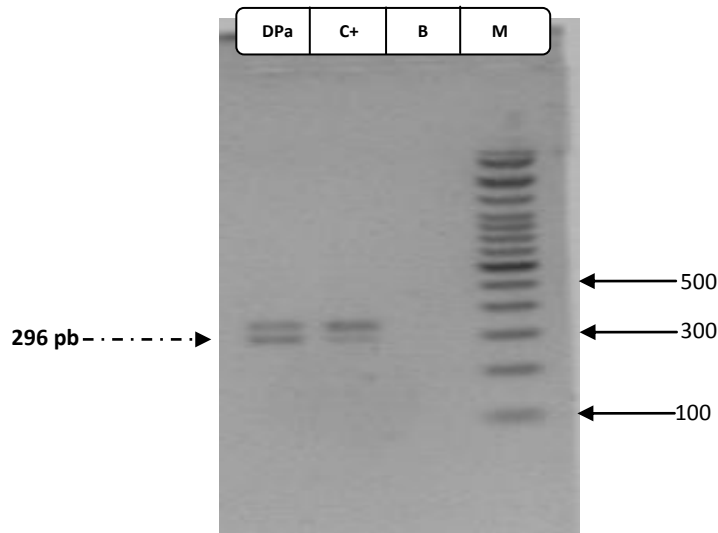


Figura 52. Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del alérgeno Ara h II de la especie *Arachis hypogaea L.* en producto procesado con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo planta de Morelos H; (DPa) palanqueta de cacahuete.

De la misma manera en la Figura 52 se muestran amplificadas de 296 pb, del control positivo de la planta de Morelos (carril C+), y la muestra de palanqueta de cacahuete artesanal (carril DPa), lo que nos indica que los primers específicos del alérgeno Ara h II de cacahuete detectaron la presencia de la especie *Arachis hypogaea L.* Por lo tanto, de los 12 productos evaluados para este trabajo amplificaron los 12 productos que en su etiquetado declaran estar elaborados con semilla de cacahuete.



3.3 Objetivo Particular 3

Seleccionar los primers específicos de la zona de amplificación de las regiones del promotor CaMV35S y el terminador T-nos, para la identificación de cacahuete transgénico.

La mayoría de los cultivos transgénicos aprobados y comercializados utilizan el promotor CaMV35S proveniente del virus del mosaico de la coliflor y el terminador T-nos de *agrobacterium tumefaciens* para detectar modificaciones genéticas en los cultivos, por lo que las secuencias de estos primers se utilizaron para localizar la presencia de transgénicos en las muestras de cacahuete de este trabajo.

Dichas secuencias de primer se tomaron del artículo de Karamollaoglu *et al.* 2009 porque resultaron ser eficientes para encontrar OGM.

3.3.1 Amplificación de maíz transgénico como control positivo para la identificación del promotor CaMV35S

Para la detección de organismos genéticamente modificados se utilizó como control positivo maíz transgénico con el que se contaba en el laboratorio.

Se realizó la PCR directa con el kit *Phire Plant Direct PCR* con las condiciones de la Tabla 15 y el programa de la Figura 41, para la amplificación de los primers del promotor CaMV35S utilizando la muestra de maíz transgénico. Los resultados se visualizaron en la Figura 53.

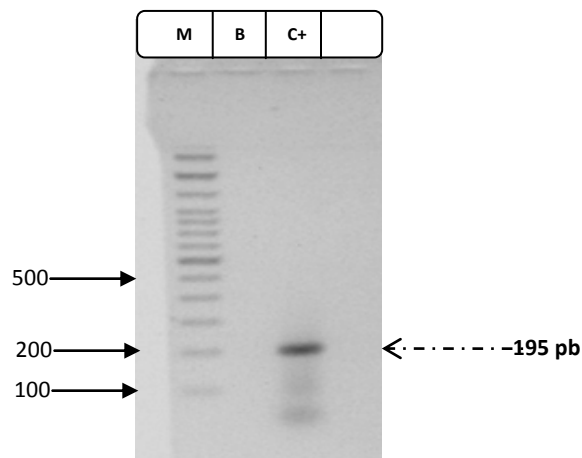


Figura 53. Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del promotor CaMV35S como control positivo con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico.

Se observó en el gel el marcador de peso molecular de 100 pb (carril M), (Figura 53) el amplificado de 195 pb de la muestra de maíz transgénico (carril C+) con los primers del promotor CaMV35S. Mientras que en el carril B (muestra blanco) no hubo ningún



amplificado, lo que nos garantizó que la PCR directa se realizó correctamente y no ocurrió contaminación alguna. Estos resultados fueron satisfactorios, lo que nos indica que esta muestra de maíz transgénico será el control positivo para las pruebas que se realizaron más adelante.

3.3.2 Amplificación de maíz transgénico como control positivo para la identificación del terminador T-nos

De igual manera se llevo a cabo la PCR directa para la amplificación de los primers del terminador T-nos usando la misma muestra de maíz transgénico, las condiciones de la Tabla 15 y el programa de la Figura 41.

Analizando los resultados de la Figura 54, de igual manera se utilizo un marcador de peso molecular de 100 pb (carril M), hubo un amplificado de 180 pb de la muestra de maíz transgénico (carril C+) lo que nos indico resultados favorables, del mismo modo la muestra maíz transgénico sirvió como control positivo para la detección del terminador T-nos en las siguientes pruebas.

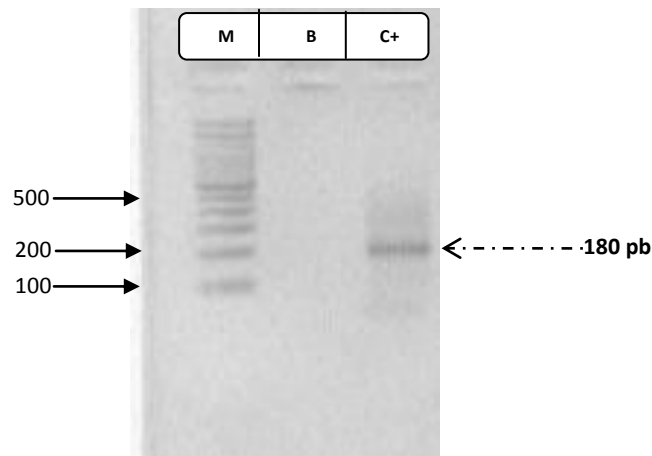


Figura 54. Electroforesis con gel de agarosa al 3% a 60V para la identificación del terminador T-nos como control positivo con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico.

3.4 Objetivo Particular 4

Desarrollar la técnica de PCR a los productos frescos y procesados de cacahuate utilizando los primers específicos del promotor CaMV35S y el terminador T-nos para detectar la presencia de cacahuate genéticamente modificado.

En este último objetivo se identificó cacahuate transgénico en las muestras frescas y procesadas con las que se han trabajado anteriormente en este proyecto.



3.4.1 Detección del promotor CaMV35S en productos frescos de cacahuate

Se tomó el ADN de las 8 muestras frescas de cacahuate de la Tabla 19 y el ADN de las muestras de cacahuate de Coyoacán (C-7) y la muestra de cacahuate de Guanajuato (C-9) se tomó de la Tabla 18, siguiendo las condiciones del programa de la Figura 41, se realizó la PCR directa con los primers del promotor CaMV35S. Se obtuvieron los siguientes resultados:

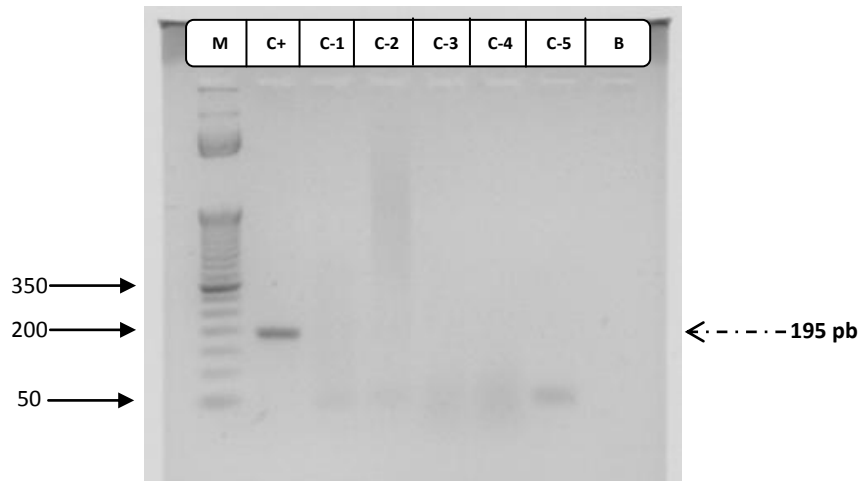


Figura 55. Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del promotor CaMV35S en productos frescos de cacahuate con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 50 pb; (C+) control positivo maíz transgénico; (C-1) cacahuate de Teoloyucán; (C-2) cacahuate de E.U.; (C-3) cacahuate de Toluca; (C-4) cacahuate de Jalisco; (C-5) cacahuate de Oaxaca; (B) blanco.

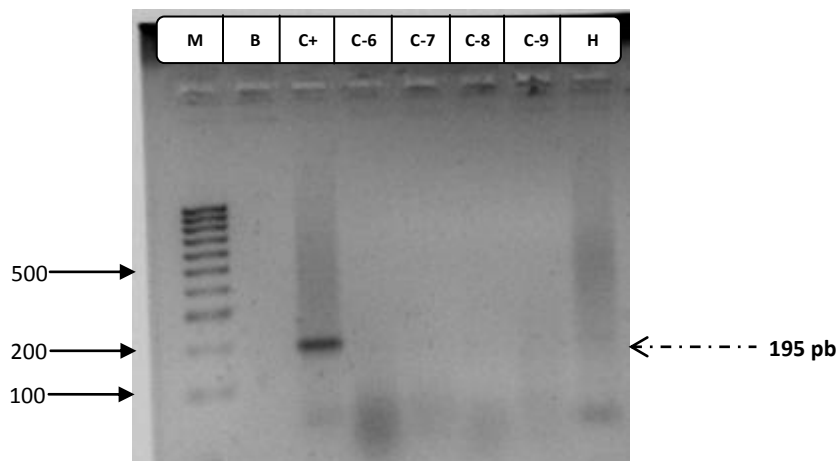


Figura 56. Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del promotor CaMV35S en productos frescos de cacahuate con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100pb ; (B) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico; (C-6) cacahuate de Monterrey; (C-7) cacahuate de Coyoacán CDMX; (C-8) cacahuate de Tlalnepantla; (C-9) cacahuate de Guanajuato; (H) planta de cacahuate de Morelos.



En la Figura 55 y en la Figura 56 solo se observó el amplificado de 195 pb del control positivo maíz transgénico (carril C+), lo que nos indica que la PCR si se realizó adecuadamente. En los dos geles no se presenta ningún amplificado de las muestras de cacahuate provenientes de Teoloyucán (carril C-1), de Estados Unidos (carril C-2), de Toluca (carril C-3), de Jalisco (carril C-4), de Oaxaca (carril C-5), de Monterrey (carril C-6), de Coyoacán (carril C-7), de Tlalnepantla (carril C-8), de Guanajuato (carril C-9) y de Morelos (carril H), lo que nos señaló que no hubo presencia del promotor CaMV35S en las 9 semillas de cacahuate y en la planta de cacahuate provenientes de diferentes estados de la república que se evaluaron en este trabajo.

3.4.2 Detección del promotor CaMV35S en productos elaborados con cacahuate

Para esta prueba se utilizó el ADN de los productos comerciales de la Tabla 20, se realizó la PCR directa con el programa de la Figura 41 y los primers de CaMV35S. Los productos de la PCR se sometieron a una electroforesis y se lograron visualizar los siguientes resultados:

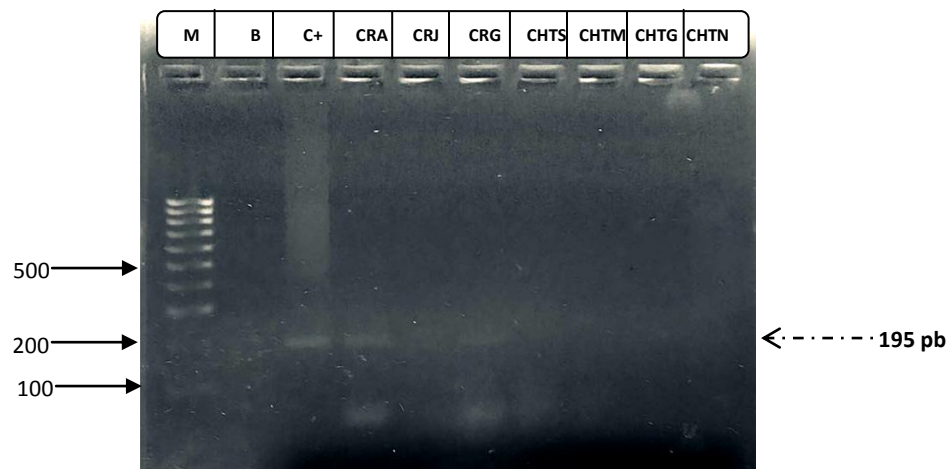


Figura 57. Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del promotor CaMV35S en productos procesados de cacahuate con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico; (CRA) crema de cacahuate; (CRJ) crema de maní; (CRG) crema untable de cacahuate; (CHTS) cacahuate salado; (CHTM) botana de cacahuate; (CHTG) botana surtida de cacahuate; (CHTN) cacahuate enchilado.

En la Figura 57 no se visualizaron amplificados con la PCR directa para las muestras de crema de maní de la marca “Jif” (carril CRJ), cacahuate salado de la marca “Sabritas” (carril CHTS), botana de cacahuate de la marca “Mafer” (carril CHTM), botana surtida de cacahuate de la marca “Great Value” (carril CHTG) y cacahuate enchilado de la marca “Barcel” (carril CHTN). Sin embargo, se observaron amplificados de 195 pb detectando la presencia del promotor CaMV35S en 2 muestras de cremas de



cacahuate de la marca “Aladino” (carril CRA) y la crema untable de cacahuate de la marca “Great Value” (carril CRG), estos productos son importados de Estados Unidos, por lo que era probable encontrar este gen en dichos productos; como recordaremos Estados Unidos es el principal país que siembra cultivos transgénicos, sin embargo, cabe mencionar que en sus etiquetas no declaran estar elaborados con OGM, pero si dicen estar fabricados con otros ingredientes aparte del cacahuate, como son: aceite vegetal, soya, canola y/o algodón. Por estudios realizados por varias instituciones del mundo que se encargan de analizar la Bioseguridad de OGM en cada país, se sabe que la soya, canola y algodón son alimentos que en la mayoría del mundo están modificando genéticamente.

Por consiguiente no se puede asegurar que el cacahuate que contiene estos productos sea transgénico, debido a los otros ingredientes vegetales que pueden ser tal vez transgénicos.

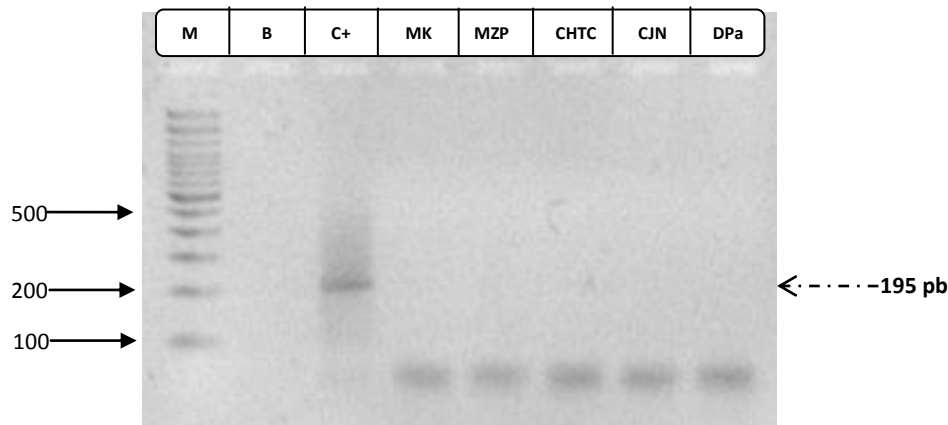


Figura 58. Electroforesis con gel de agarosa al 2.5% a 60V para la identificación del promotor CaMV35S en productos procesados de cacahuate con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico; (MK) chocolate snickers; (MZP) dulce de mazapán; (CHTC) cacahuate con nuez de la india; (CJN) cacahuate japonés; (DPa) palanqueta de cacahuate.

En la Figura 58 solo se obtuvo el amplificado de 195 pb del control positivo de la muestra de maíz transgénico (carril C+), mientras que para las muestras de chocolate snickers de la marca “Milke way” (carril MK), dulce de mazapán de la marca “De la Rosa” (carril MZP), cacahuate con nuez de la India de la marca “Cashita’s” (carril CHTC), cacahuate japonés de la marca “Nishikawa” (carril CJN) y dulce de palanqueta de cacahuate artesanal (carril DPa), no se encontró la presencia del promotor CaMV35S en los 5 productos que se analizaron en este gel.



3.4.3 Detección del terminador T-nos en productos frescos de cacahuete

Al término de haber analizado todas las muestras de cacahuete con el promotor CaMV35S se prosiguió a realizar lo mismo para la detección del terminador T-nos, para ello se elaboró la técnica de PCR directa con los primers del gen T-nos y las condiciones para programa del termociclador de la Figura 41, utilizando así todas las muestras frescas de cacahuete. Los resultados que se recibieron fueron los siguientes:

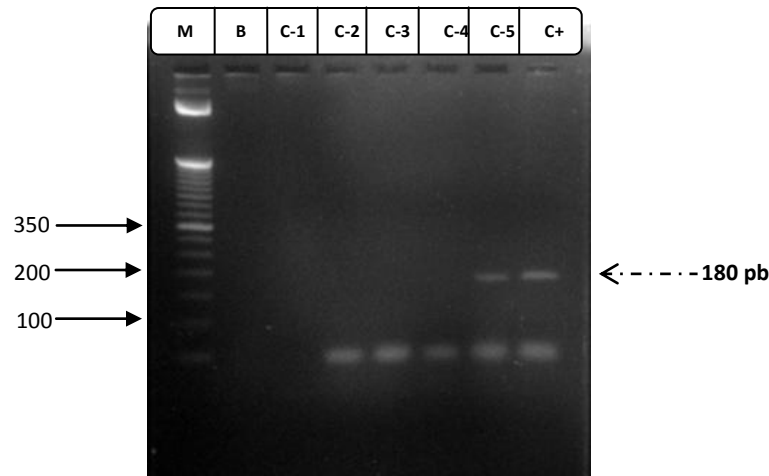


Figura 59. Electroforesis con gel de agarosa al 3% a 60V para la identificación del terminador T-nos en productos frescos de cacahuete con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 50 pb; (B) blanco; (C-1) cacahuete de Teoloyucán; (C-2) cacahuete de E.U.; (C-3) cacahuete de Toluca; (C-4) cacahuete de Jalisco; (C-5) cacahuete de Oaxaca; (C+) control positivo maíz transgénico.

En la Figura 59 como en la Figura 60 se observa el amplificado del control positivo del carril C+ (maíz transgénico) y también se muestran otros 4 amplificados de 180pb de las muestras de cacahuete provenientes de Oaxaca (carril C-5), de Monterrey (carril C-6), de Tlalnepantla (carril C-8) y de Morelos (carril H), lo que nos indicó la presencia del terminador T-nos en dichas muestras. Mientras que para las muestras de cacahuete provenientes de Teoloyucán (carril C-1), de Estados Unidos (carril C-2), de Toluca (carril C-3), de Jalisco (carril C-4), de Coyoacán (carril C-7) y de Guanajuato (carril C-9) no hubo existencia de dicho terminador.

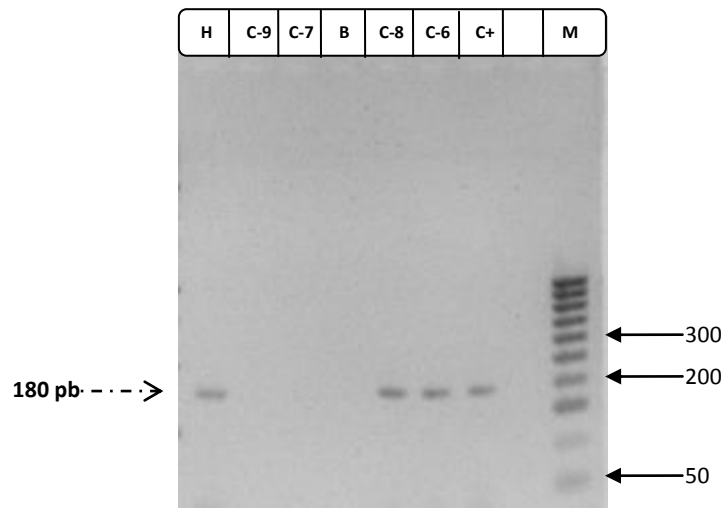


Figura 60. Electroforesis con gel de agarosa al 3% a 60V para la identificación del terminador T-nos en productos frescos de cacahuete con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 50 pb; (B) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico; (C-6) cacahuete de Monterrey; (C-7) cacahuete de Coyoacán CDMX; (C-8) cacahuete de Tlalnepantla; (C-9) cacahuete de Guanajuato; (H) planta de cacahuete de Morelos.

La siembra de cacahuete en nuestro país no es suficiente para la demanda que exigen los consumidores Mexicanos, por lo que se tiene que importar esta semilla de países como China e India ya que ellos son los principales productores de este cultivo. Se han encontrado diversos estudios provenientes de estos países utilizando ingeniería genética para la modificación de esta semilla, favoreciendo el uso de *Agrobacterium tumefaciens* para generar plantas transgénicas resistentes a las enfermedades como son: necrosis en el tallo de la planta de cacahuete causado por el virus *raya de tabaco* (Mehta *et al.*, 2013), el tikka causado por *Cercospora arachidicola* y *Cercosporidium personatum* (Rohini y Sankara, 2000) entre otros. Debido a esto se descubrieron resultados positivos con el terminador T-nos, advirtiéndonos que estos cultivos modificados genéticamente están en el país sin ser etiquetados con la leyenda “semillas genéticamente modificadas”.

3.4.5 Detección del terminador T-nos en productos elaborados con cacahuete

Por último se analizaron las muestras de los productos procesados (Tabla 20) con PCR directa, los resultados que se consiguieron son los siguientes:

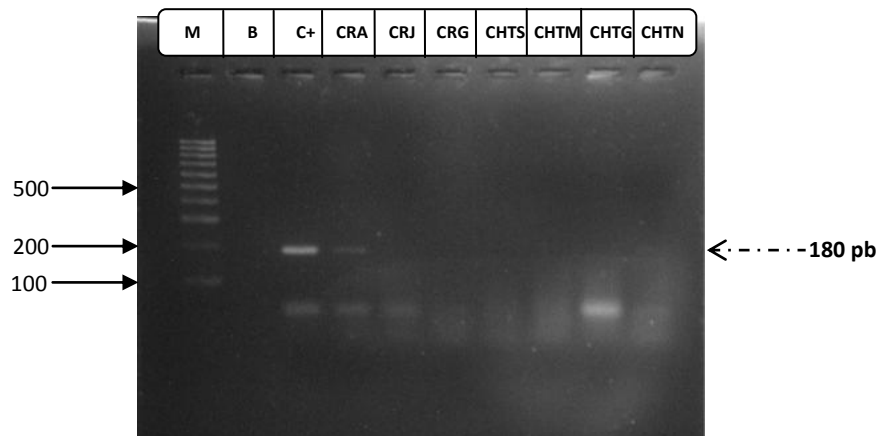


Figura 61. Electroforesis con gel de agarosa al 3% a 60V para la identificación del terminador T-nos en productos procesados de cacahuete con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico; (CRA) crema de cacahuete; (CRJ) crema de maní; (CRG) crema untable de cacahuete; (CHTS) cacahuete salado; (CHTM) botana de cacahuete; (CHTG) botana surtida de cacahuete; (CHTN) cacahuete enchilado.

En la Figura 61 se observaron dos amplificados de 180 pb, siendo el control positivo de la muestra de maíz transgénico (carril C+) y la muestra de crema de cacahuete de la marca “Aladino” (carril CRA), indicando la presencia del terminador T-nos en dicho producto. Cabe destacar que esta misma muestra marcó resultados positivos para el promotor CaMV35S. En las muestras de crema de maní de la marca “Jif” (carril CRJ), crema untable de cacahuete de la marca “Great Value” (carril CRG), cacahuete salado de la marca “Sabritas” (carril CHTS), botana de cacahuete de la marca “Mafer” (carril CHTM), botana surtida de cacahuete de la marca “Great Value” (carril CHTG) y cacahuete enchilado de la marca “Barcel” (carril CHTN) no hubo existencia del terminador T-nos en su genoma.

En la muestra botana surtida de cacahuete (carril CHTG) se percibe un amplificado de menor peso molecular diferente al esperado, esto pudo deberse que el ADN de la muestra estaba fragmentado, lo que hizo que la enzima reconociera una pequeña banda. Esta es una de las desventajas de utilizar el kit *Phire Plant Direct PCR* porque en algunas ocasiones dan amplificados inesperados.

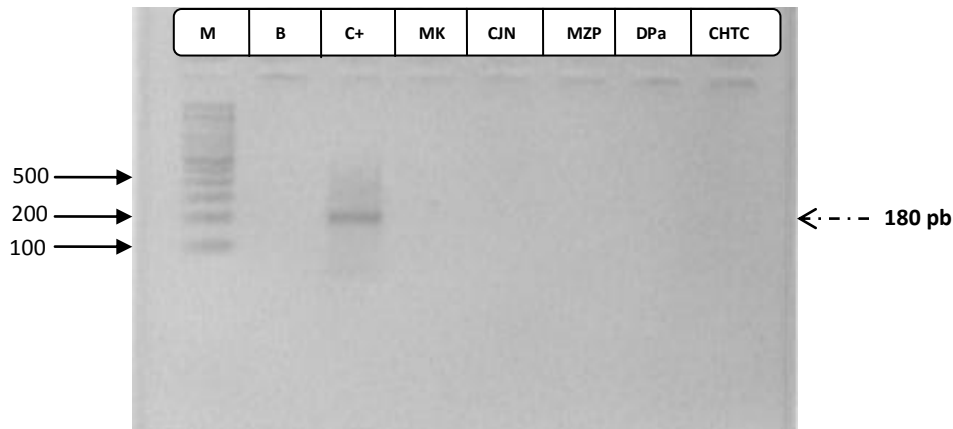


Figura 62. Electroforesis con gel de agarosa al 3% a 60V para la identificación del terminador T-nos en productos elaborados con cacahuete con PCR directa; (M) marcador de peso molecular de 100 pb; (B) blanco; (C+) control positivo maíz transgénico; (MK) chocolate snickers; (CJN) cacahuete japonés; (MZP) dulce de mazapán; (DPa) palanqueta de cacahuete; (CHTC) cacahuete con nuez de la India.

En la Figura 62 se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (carril M), únicamente se percibió el amplificado de 180 pb del control positivo de la muestra de maíz transgénico (carril C+), mientras que en las muestras de chocolate snickers de la marca “Milke way” (carril MK), cacahuete japonés de la marca “Nishikawa” (carril CJN), dulce de mazapán de la marca “De la Rosa” (carril MZP), palanqueta de cacahuete artesanal (carril DPa) y cacahuete con nuez de la India de la marca “Cashita’s” (carril CHTC) no hubo ningún amplificado, por lo que no se encontró la presencia del terminador T-nos en estas últimas muestras comerciales procesadas con cacahuete que fueron examinadas.

Sin duda esto ha sido una polémica en el tema de transgénicos ya que existen opiniones diferentes entre consumidores si esto sea bueno o malo para la salud, sin embargo las empresas de alimentos no se arriesgan a exponer si sus productos contienen OGM porque temen a que haya pérdidas comerciales en sus producciones y el prestigio de ser “100 % natural”.

En la Tabla 21 y en la Tabla 22 se sintetizaron los resultados de las 22 muestras evaluadas para este proyecto con el promotor CaMV35S y para el terminador T-nos.



Tabla 21. Resumen de resultados de transgénicos en semillas y plantas de cacahuete.

NOMENCLATURA	MUESTRAS DE CACAHUATE	CaMV35S	T-nos
C-1	Cacahuete de Teoloyucán	×	×
C-2	Cacahuete de Estados Unidos	×	×
C-3	Cacahuete de Toluca	×	×
C-4	Cacahuete de Jalisco	×	×
C-5	Cacahuete de Oaxaca	×	✓
C-6	Cacahuete de Monterrey	×	✓
C-7	Cacahuete de Coyoacán CDMX	×	×
C-8	Cacahuete de Tlalnepantla	×	✓
C-9	Cacahuete de Guanajuato	×	×
H	Planta de cacahuete de Morelos	×	✓

Tabla 22. Resumen de resultados de transgénicos en productos procesados que contienen cacahuete.

NOMENCLATURA	MUESTRAS COMERCIALES	CaMV35S	T-nos
CRA	Crema de cacahuete "Aladino"	✓	✓
CRJ	Crema de maní "Jif"	×	×
CRG	Crema untable de cacahuete "Great Value"	✓	×
CHTS	Cacahuete salado "Sabritas"	×	×
CHTM	Botana de cacahuete "Mafer Premium"	×	×
CHTC	Cacahuete con nuez de la India "Cashita's"	×	×
MK	Chocolate con cacahuete "Milke way"	×	×
CHTG	Botana surtida de cacahuete "Great Value"	×	×
DPa	Dulce de Palanqueta	×	×
MZP	Mazapán "De la Rosa"	×	×
CJN	Cacahuete Japonés "Nishikawa"	×	×
CHTN	Cacahuete enchilado "Barcel"	×	×



CONCLUSIONES

Los primers diseñados del gen clone AHRES 1-5 resveratrol synthase para detectar cacahuete pudieron ser utilizados para identificar la especie *Arachis hypogaea L.*, pero no fueron específicos porque amplificaron para la especie *Gallus gallus domesticus*.

Los primers del alérgeno Ara h II del cacahuete fueron específicos para detectar la especie *Arachis hypogaea L.*

Se obtuvieron amplificadores en la identificación de *Arachis hypogaea L.* de los primers del gen clone AHRES 1-5 resveratrol synthase en las semillas y plantas de cacahuete de 750 pb.

Se obtuvieron amplificadores de 196 pb en las muestras de semillas y plantas para detectar el alérgeno Ara h II en el cacahuete.

Se logró detectar la presencia de *Arachis hypogaea L.* en los productos procesados elaborados con cacahuete, con los primers del alérgeno Ara h II de cacahuete.

Se consiguieron amplificadores positivos con la técnica de PCR punto final con el Master Mix® y con PCR directa del kit *Phire Plant Direct PCR*.

Los primers seleccionados del promotor CaMV35S y el terminador T-nos para la identificación de Organismos Genéticamente Modificados sirvieron para realizar este trabajo porque amplificaron con la muestra de maíz transgénico que fue el control positivo, detectando la presencia de transgénicos en 3 semillas de cacahuete provenientes de Oaxaca, Monterrey y Tlalnepantla, una planta de cacahuete proveniente de Morelos y 2 productos comerciales (cremas de maní) de la marca "Aladino" y "Great Value". De las 22 muestras evaluadas en este trabajo para la detección de transgénicos, el 27% de los productos mostraron amplificadores.

México cuenta con la 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. También cuenta con la NOM-001-SAG/BIO-2014 Donde establece las características del etiquetado de organismos genéticamente modificados que sean semillas destinados a siembra o cultivo. A pesar de poseer estas normas hoy en día siguen existiendo productos transgénicos en el mercado que no declaran en su etiqueta las especificaciones que demanda el consumidor y la ley, ya que las empresas no cumplen dichas normas.



RECOMENDACIONES

Los primers diseñados para *Arachis hypogaea* L. se pueden utilizar para otros trabajos, a pesar de que no se ocuparon para todas las pruebas, se evaluaron a condiciones para PCR punto final a nivel laboratorio y de igual manera, se puede detectar algún tipo de ave en diversos trabajos.

El kit *Phire Plant Direct PCR* trabaja con una enzima llamada “Hot Start”, esta enzima es eficiente, ya que aumenta la especificidad de la reacción, fue útil para la amplificación de la muestra de la planta de cacahuate, por lo que es recomendable usarla para este tipo de alimentos.

Además para obtener un ADN más puro y eliminar compuestos orgánicos que pueda contener la muestra, es importante sugerir que se realice dos lavados con fenol-cloroformo al momento de realizar la extracción, ya que se puede eliminar gran parte de las impurezas que contenga, sin embargo, es importante tener cuidado al momento de recuperar la fase acuosa donde contiene el ADN, ya que si llega a tener fenol-cloroformo la muestra, está podría inhibir la PCR.

Se encontraron más OGM con el terminador T-nos que con el promotor CaMV35S en los productos que se analizaron en este trabajo, se podría proponer otro promotor para identificar transgénicos en leguminosas.

Finalmente si hubo resultados positivos en la detección de cacahuate transgénico en semillas de este cultivo que se seleccionaron de diferentes estados del país, sería importante estudiar el gen que se le está introduciendo para su modificación genética, esto con el fin de encontrar si este gen lo hace resistente a enfermedades, cambios climáticos o a plagas de insectos.



BIBLIOGRAFÍAS

1. Agropecuaria, (2011). *Cacahuete, cultivo tradicional y rentable*. Recuperado de <http://imagenagropecuaria.com/2011/cacahuete-cultivo-tradicional-y-rentable/>
2. American Peanut council México, (2014). *Productos con valor agregado*. American Peanut council™. Recuperado de <http://www.cacahuatesusa.com/para-la-industria/produccion-y-procesamiento/productos-con-valor-agregado>
3. Andrés, I. (2017). *Síntesis y maduración del RNA*. Dpto. Biología Molecular. Recuperado de https://ocw.unican.es/pluginfile.php/1327/course/section/1638/Tema13_transcripcion.pdf
4. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana, (2009). *Cacahuete Arachis hypogaea L. Leguminosae*. UNAM. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Recuperado de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Cacahuete&id=7300>
5. Baltá, A. A., Baró B. J. y Blanco S. V. (2013). *Alimentos transgénicos: La realidad no siempre supera a la ficción*. Universitat Autònoma de Barcelona. Recuperado de <https://ddd.uab.cat/pub/estudis/2012/103201/transgenicos.pdf>
6. Band I. (1887). *Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, dánica, helvética, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America*: Verlag von Fr. Eugen Köhler
7. Blengino, C. (2015). *Maní: Informe Sectorial N° 2*. Dirección de agroalimentos. Recuperado de http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/otros/mani/informes/2015_10Nov.pdf
8. Bolivar, A. M., Rojas, A. y García, L. P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, 3(1):25-33
9. Centro de Comercio Internacional CCI (2012). *Exportación de cacahuates*. Forum de Comercio Internacional. Recuperado de <http://www.tradeforum.org/Exportacion-de-cacahuetes/?langtype=1034>
10. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios COFEPRIS (2013). *¿Qué es un organismo genéticamente modificado?*. Secretaría de Salud.



Recuperado de <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/OGMS/Que-son-ogms.aspx>

11. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad CONABIO (2015). *Cacahuete. Biodiversidad Mexicana*. Recuperado de <http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/alimentacion/cacahuete.html>
12. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (2014). *Desde hace varios años se autorizó la siembra de organismos genéticamente modificados en el campo mexicano, ¿Qué efecto se ha observado en los cultivos no genéticamente modificados?*. México. gob.mx. Recuperado de <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/preguntas-frecuentes>
13. Cortázar, M. A. y Silva, R. E. P. (2004). *Métodos físico-químicos en biotecnología*. Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. Recuperado de <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
14. Cruz, B.D. (2017). *Transcripción del DNA y modificaciones postranscripcionales*. Facultad de Biología. Recuperado de <http://fbio.uh.cu/sites/genmol/confs/conf2/>
15. De la Cruz, A. S. (2016). *Desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas con anticuerpos recombinantes y de técnicas de PCR en tiempo real para la detección de almendra y nuez de Brasil de alimentos* (Tesis Doctoral) Recuperado de <http://eprints.ucm.es/42866/1/T38828.pdf>
16. Diario Oficial de la Federación DOF (2014). *PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-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*. Secretaría de Gobernación SEGOB. Recuperado de http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5346453&fecha=28/05/2014
17. Eguiarte, L. E., Souza, V., Aguirre, X. y Espinosa, A. L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre. (1^{ra} Ed.), *Ecología molecular* (pp. 532). Delegación Coyoacán, Ciudad de México: Instituto Nacional de Ecología SEMARNAT
18. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura FIRA (2014). *Cacahuete Morelos*. Recuperado de <https://www.fira.gob.mx/OportunidadNeg/DetalleOportunida.jsp?Detalle=25>
19. Galdisa, (2014). *Productos amplia variedad*. CDMX. Recuperado de <http://www.galdisa.com.mx/productos.html>



20. Gillier, P. y Silvestre, P. (1970). *El cacahuete o Maní*. (pp. 13-27 y 158-161). Barcelona: Blume.
21. Golden Peanut Specialty Products (2015). *Harina de cacahuete tostada y pastas de nueces*. FMX. Recuperado de <http://fxm.com.mx/portfolio-item/golden-peanut/>
22. González, J. M., García, E., Fernández, J. L., Gago, L. y Benito, J. (2007). *Técnicas analíticas para la detección de gluten en alimentos*. Recuperado de https://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/VT/VT9_deteccion_gluten_alimentos.pdf
23. Greif, G. (2017). *PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa*. Recuperado de http://www.chlaep.org.uy/descargas/curso_tb_mico_bacterias/reaccion_en_cadena_polimerasa.pdf
24. Hernández, A. K. (2015). *Modificación genética de plantas mediante cisgénesis e intragénesis. ¿Un reto regulatorio?* (Seminario de titulación). Recuperado de <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/Fomento-investigacion/Tesis/Ana-Karen-Hernandez-modificacion-genetica-plantas.pdf>
25. Hernández, R. P. y Gómez, R. A. (2012). *Polymerase Chain Reaction: Types, Utilities and Limitations*. Recuperado de <file:///C:/Users/Cristina/Downloads/types-pcr.pdf>
26. Herrero, U. L., Ávila, A. R., Corrales, A. E. y Hun, O. L. (2004). *Procedimientos en virología médica*. (pp. 151). Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica
27. Izzeddin, R., Toro, R. e Izzeddin, R. (2010). Técnica de PCR Como Estrategia Biotecnológica Para Detección de *Helicobacter pylori* en Placa Dental. *Biotecnología*, 14:25-36
28. Karamollaoglu, I., Oktem, H. A. y Mutlu, M. (2009). QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs). *Biochemical Engineering Journal*, 44:142-150. doi:10.1016/j.bej.2008.11.011.
29. Keshavareddy G., Rohini S., Ramu S.V., Sundaresha S., Kumar A.R.V., Ananda Kumar P. and Udayakumar M. (2013). Transgenics in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) expressing *cryAcF* gene for resistance to *Spodoptera litura* (F). *Physiol Mol Biol Plants*, 19(3):343-352. doi:10.1007/s12298-013-0182-6
30. Larios, A. B. R. (2013). *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*. Recuperado de <https://es.slideshare.net/Byralaal/reaccin-en-cadena-de-la-polimerasa-pcr>



31. Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (2005). *Decreto Artículo único*. Recuperado de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/ley180305.html>
32. Luque, J. y Herráez, Á. (2006). *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*. España: Harcourt
33. Mehta R., Radhakrishnan T., Kumar A., Yadav R., Doharia J.R., Thirumalaisamy P.P., Jain R.K. and Chigurupati P. (2013). Coat protein-mediated transgenic resistance of peanut (*Arachis hypogaea* L.) to peanut stem necrosis disease through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Springer Indian J. Virol*, 24(2):205-213. doi:10.1007/s13337-013-0157-9
34. Microbial (2009). La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR. Mitos y realidades. *Newsletter*, 3:1-2. Recuperado de <http://studylib.es/doc/5190924/la-extracci%C3%B3n-y-purificaci%C3%B3n-del-adn-para-el-an%C3%A1lisis-por>
35. Mota, C. M., Cuenca, P. J. B. y Sipán, S. M. C. (2016). *Biología molecular y citogenética*. Madrid, España: Paraninfo
36. Mulder, P. (2012). *Chicharritas de la vid (Grape leafhoppers)*. Universidad del estado de Oklahoma. Extension. Recuperado de <http://articles.extension.org/pages/31623/chicharritas-de-la-vid-grape-leafhoppers>
37. 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*. Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/226095/NOM-001-SAG_BIO-2014_301214.pdf
38. Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010. *Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados- Información comercial y sanitaria*. Recuperado de http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5356328&fecha=14/08/2014
39. 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*. Recuperado de



https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/133737/15.-_NORMA_OFICIAL_MEXICANA_NOM-164-SEMARNAT-SAGARPA-2013.pdf

40. Nuñez, C. L. (2011). Detección y ensayo de los Organismos Genéticamente Modificados. *Rev Cubana Aliment Nutr*, 21(2):293-302
41. Orendain, C. (2012). *Beneficios del cacahuete para la mujer*. Cristina Orendain®. Recuperado de <https://www.cristinaorendain.com/?s=cacahuete+beneficio>
42. Pengue, W. A. (2000). *Cultivos transgénicos*. (pp. 140, 60-64, 170-174). Argentina: Unesco.
43. Pérez, C. A. M. (2017). *Reacción en Cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Universidad Politécnica de Valencia. Recuperado de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>
44. Plataforma Andalucía Libre de Transgénicos PALT (2014). *Impactos de los cultivos y alimentos transgénicos sobre la salud*. Recuperado de http://redandaluzadesemillas.org/IMG/pdf/141230_informe_omg_y_salud_palt.pdf
45. Primo, Y. E. (1987). *Química Agrícola III Alimentos*. Madrid: Alhambra S.A.
46. Riechmann, J. (2002). *Que son los alimentos transgénicos*. (pp. 110, 20-26, 33-36, 40-42). Barcelona: Integral.
47. Reforma, (2012). *Comen mexicanos cacahuete importado*. Recuperado de <http://www.sintesiscaarem.org.mx/COM/SPRENSA.NSF/a25ec43480b5f6a786256c46005cc205/23649e350359db22862579ed0050bd7f?OpenDocument>
48. Robles, S. R. (1991). *Producción de Oleaginosas y Textiles*. (pp. 262). Monterrey, México: Limusa, Grupo Noriega.
49. Rodríguez, G. M. y Rodríguez, L. W. (2006). *PCR en Tiempo Real*. IBT-UNAM. Recuperado de http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime_pcr.pdf
50. Rohini, V. K. y Sankara, R. K. (2000). Transformation of peanut (*Arachis hypogaea L.*): a nontissue culture based approach for generating transgenic plants. *Plant Science*, 150:41-49. doi:10.1016/S0168-9452(99)00160-0
51. Salazar, M. A. M., Sandoval, R. A. S., Armendáriz, B. J. S. y López, M. D. A., Sandoval, R. A. S. (2013). Electroforesis. En A. M. Salazar, A. S. Sandoval, J. S.



- Armendáriz. (1^{ra} Ed.), *Biología Molecular Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. (pp. 110-113). México: Mc Graw Hill Education.
52. Sambrook, J. F. y Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3^{ra} Ed.) Estados Unidos de América: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
53. Sánchez, D. S. (1992). *Taxonomía, origen y dispersión del cacahuete*. (pp. 9). Texcoco, México: Universidad Autonoma de Chapingo
54. Sánchez, G. J. L. (2010). *Transcripción y traducción de la información genética*. Recuperado de <http://www.iespando.com/web/departamentos/biogeo/web/departamento/2BCH/PDFs/16Traduccion.pdf>
55. Sarkar T., Thankappan R., Kumar A., Mishra G.P. and Dobaría J. R. (2016). Stress Inducible Expression of *AtDREB1A* Transcription Factor in Transgenic Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Conferred Tolerance to Soil-Moisture Deficit Stress. *Frontiers in Plant Science*, 7:1-15. doi:10.3389/fpls.2016.00935
56. Schwab, K. J., De León, R. y Sobsey, M. D. (1995). Concentration and Purification of Beef Extract Mock Eluates from Water Samples for the Detection of Enteroviruses, Hepatitis A. Virus, and Norwalk Virus by Reverse Transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2):531-537
57. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA e Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP (2002). *Producción del cultivo de cacahuete en el estado de Morelos*. Recuperado de <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/2936/Cacahuete.pdf?sequence=1>
58. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA e Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP (2006). *Clasificación y uso de los herbicidas por su modo de acción*. Recuperado de <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/686/34.pdf?sequence=1>
59. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA (2009). *Oportunidades de Mercado para Morelos 2009*. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/ONMorelos.pdf>



60. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA e Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP (2010). *Criterios para el control de plagas y enfermedades*. Recuperado de <https://es.slideshare.net/jcesarqcervantes84/35-criterios-para-el-control-de-plagas-y-enfermedades>
61. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA y Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados CIBIOGEM (2011). *La Biotecnología Moderna en México*. Recuperado de http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/documents/seminario/6_labiotecnologia moderna en mexico.pdf
62. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA (2014). *Relaciones Comerciales del Sector Agroalimentario y Pesquero en 2014*. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/asuntosinternacionales/cooperacioninternacional/Documents/Febrero%202014/Expectativas%20de%20las%20Negociaciones%20Comerciales%20Internacionales.pdf>
63. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA e Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP (2015a). *Agenda Técnica Agrícola Guanajuato*. Recuperado de file:///C:/Users/Cristina/Downloads/11_Guanajuato_2015_SIN.pdf
64. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA e Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP (2015b). *Agenda Técnica Agrícola Sinaloa*. Recuperado de file:///C:/Users/Cristina/Downloads/25_Sinaloa_2015_SIN.pdf
65. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA e Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP (2015c). *Agenda Técnica Agrícola de San Luis Potosí*. Recuperado de file:///C:/Users/Cristina/Downloads/24_SLP_2015_SIN.pdf
66. Secretaría de Desarrollo Agropecuario (2016). *Hidalgo crece contigo*. Recuperado de <http://sedagro.hidalgo.gob.mx/?p=6899>
67. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria SENASICA (2017). *Documentos de Normas vigentes*. Recuperado de <https://www.gob.mx/senasica/documentos/nom-001-sag-bio-2014>



68. Shan S., Zhang T., Li C., Yang C. and Wan S. (2011). Cloning and analysis of a NBS-LRR disease resistance gene candidate *PnAG1* from peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Electronic Journal of Biotechnology* 14: 0717-3458. doi: 10.2225/vol14-issue6-fulltext-3
69. Stephan, O. y Vieths, S. (2004). Development of Real- Time PCR and a Sandwich ELISA for Detection of Potentially Allergenic Trace Amounts of Peanut (*Arachis hypogaea*) in Processed Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(12): 3754-3760
70. Sundaresha S., Rohini S., Appanna V.K., Arthikala M., Shanmugam N.B., Shashibhushan N.S., Hari Kishore C.M., Pannersevam R., Kirti P.B. and Udayakumar M. (2016). Co-overexpression of Brassica juncea NPR1 (BjNPR1) and Trigonella foenum-graecum defensin (Tfgd) in transgenic peanut provides comprehensive but varied protection against *Aspergillus flavus* and *Cercospora arachidicola*. *Plant Cell Rep* 35: 1189-1203. doi: 10.1007/s00299-016-1945-7
71. Swerdloff A. (2016). *Este cacahuete transgénico podría liberar al mundo de las alergias.* Munchies. Recuperado de <https://munchies.vice.com/es/article/mgkxey/este-es-el-cacahuete-transgenico-que-podria-librar-al-mundo-de-las-alergias-a-los-frutos-secos>
72. Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* 2:70-78
73. The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications ISAAA (2016). *Situación Mundial de los Cultivos Biotecnológicos/GM Comercializados: 2016. Resumen ejecutivo.* Recuperado de <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/52/executivesummary/pdf/B52-ExecSum-Spanish.pdf>
74. Verdú, J.M. et al. (2009). *Tabla de composición de Alimentos.* (pp. 165). España: Universidad de Granada.
75. Wines and Olives (1990). *Empresa de Productos alimenticios.* Argentina. Recuperado de <http://www.winesandolives.com/#productos>
76. Winn h., W. C., Koneman, E. W., Allen, S. D., Procop, G. W., Janda, W. M., Schreckenberger P. C. y Woods, G. L. (6^{ta} Ed.) (2008). *Koneman Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas en color* (pp. 153) Argentina: Medica Panamericana



ANEXOS

1) METODOLOGIA PARA DISEÑO DE “PRIMERS”

1. Dentro de la página NCBI se selecciono en la base de datos la opción de NUCLEOTIDE.

The screenshot shows the NCBI homepage. A dropdown menu titled 'All Databases' is open, listing various databases. The 'Nucleotide' option is highlighted with a red arrow. The main content area features a 'Welcome to NCBI' message and three main actions: 'Submit', 'Download', and 'Learn'. A search bar is visible at the top right.

2. Se ingresó el nombre científico de la especie (*Arachis hypogaea* L.) y se selecciona la opción SEARCH.

The screenshot shows the search bar on the NCBI website. The text 'Arachis hypogaea L.' is entered into the search field, and the 'Search' button is highlighted with a red box and a red arrow. The dropdown menu is set to 'Nucleotide'.

3. Se seleccionó el GI del gen del ADN lineal que se encuentra en la página.

The screenshot shows the search results for 'Arachis hypogaea L. (762249)'. The first result is highlighted with a red box and a red arrow. The result is: '5. 1,499 bp linear DNA'. The accession number is HM130569.1 and the GI is 299150966. The result is titled 'Arachis hypogaea clone AHRES 1-5 resveratrol synthase gene, partial cds'.



- Se abrió la página “PrimerQuest Tool” en el buscador y se selecciona la opción **DOWNLOAD SEQUENCE(S) USING GENBANK OR ACCESSION ID.**

Intelligence DNA Technologies, Inc. (US) | <https://www.intelligence.com/PrimerQuestTool/en/EN>

PrimerQuest Tool

Assay Design / Results / Help / About

Sequence Entry

▼ Enter sequence(s) manually

Paste sequence(s) here...

Sequence Name

▼ Download sequence(s) using Genbank or Accession ID

▶ Upload sequences in an Excel file

Hints

- Paste your sequence into the Textbox
- Add up to 50 sequences in **FASTA** format
- Sequence length must be greater than 80 bases
- PrimerQuest accepts only nucleic acid bases

- Se pegó el GI del gen obtenido de la página de NCBI, en el número ID y se selecciona la opción **GET SEQUENCE.**

Sequence Entry

▶ Enter sequence(s) manually

▼ Download sequence(s) using Genbank or Accession ID

NCBI ID#

>GI# 299150966
 CTGGAGATGGTGTCTGTGAGTGGGATCCGCAATGTTCAAGAGCAGAAGGCCCTGCAACGTATTGGCAA
 TTGGCACAGCAAATCCATCAAAATGTGTTGATCAGAGTACATATGCTGATTACTATTTACAGAGTAACTAATAG
 CGAGCACATGACTGATCTCAAGAAGAAATTCAGCGCATTGATGATTTTTTATTAACGTGTTTAGCTTTATT
 TTATTTAATATTTATAAAAAAATATCATTTCATTTTATATTAAATGAAAAATTAACATATTATACAAACATA
 GCATATTCACCATTTGATATTAATAGTAATAACTACTTAATAATAACATTACTTTTATAATTACAAATTTAGCATGC
 AACATTTATTTCAAATGACTTAAAGATTAAAGTTACTATGAAACCAGCTCAAGAATAACATTATTGCTATATA
 TTTTCATTTTCAAACTTTATCAAAGGTAATAATGGATGTGAATTCGCATTATTATTTACAGGTGAAGAACACA

Sequence Name

▶ Upload sequences in an Excel file

Hints

- Enter Genbank or Accession ID
- **NM_001111** or **301601652**
- Comma Separated for Batch
- **NM_001234, 301601652**
- Sequence length must be greater than 80 bases
- PrimerQuest accepts only nucleic acid bases

Choose Your Design

PCR
2 Primers

qPCR
2 Primers + Probe

qPCR
2 Primers
Intercalating Dyes

Show Custom Design Parameters

- Se selecciona la opción **PCR 2 PRIMERS.**



>Gi# 299150966
 CTGGAGATGGTGTCTGTGAGTGGGATCCGCAATGTTCAAAGAGCAGAAGGCCCTGCAACTGTATTGGCAA
 TTGGCAGCAAAATCCATCAAAATGTTGTTGATCAGAGTACATATGCTGATTACTATTTCAGAGTAACTAATAGC
 GAGCACATGACTGATCCTCAAGAAAGAAATTCAGCCGATTGTATGATTTTAACTGTTTTAGCTTTATTTT
 ATTTAATATTATTAATAAATATCATTCTTCTTATATAATTAATAATGTTAAATTAACATATTATACAACATAGCA
 TATTCACCATTGATATTAAAGTAATAACTACTTAATAATAACTACTTTTATAATACAAATTAGCATGCAACT
 ATTTATTTCAAATAGTACTTAAAGATTAAAGTACTATGAACCAGCTCAAGAAATAACATTATGCTATATTTCA
 TTTCTAAACTTATCAAAGGTAATAATGGATGTGAATTGCGCATTATTTCAGGTGAAGAACACAGATCA

Sequence Name Clear Sequence Entry

► Upload sequences in an Excel file Running...

Choose Your Design

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

- NM_001111 or 301601652
- Comma Separated for Batch
- NM_001234, 301601652
- Sequence length must be greater than 80 bases
- PrimerQuest accepts only nucleic acid bases

7. Se escogió una opción de segmentos de ADN que cumpla con las características considerables para el diseño de los primers (su %GC debe estar entre 40-60%, que la Tm este entre 55-62°C y que la longitud de la secuencia debe estar entre 18-25pb), una vez encontrado se busca la opción VIEW ASSAY DETAILS.

Amplicon Length: 704
[View Assay Details](#)

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	28	50	22	62	45.5
Reverse	710	732	22	62	45.5

8. Se analizó que la secuencia de los primers Frontal y Reverso se encontraran en el genoma de *Arachis hypogaea L.*, al igual que los primers no tuvieran polyG ni polyC, junto con sus características principales.

Parameter Set: General PCR (Primers only)
 Sequence Name: Gi# 299150966
 Amplicon Length: 704

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	28	50	22	62	45.5
Reverse	710	732	22	62	45.5

Base	Sequence
1	CTGGAGATGGTGTCTGTGAGTGGGATC CGCAATGTTCAAAGAGCAGAG GCCTGCAACTGTATTGGCAATTGGCACAGCAAAATCCATCAAATGTTGTTG
101	ATCAGAGTACATATGCTGATTACTATTTTCAGAGTAACTAATAGCAGACACATGACTGATCTCAAGAAGAAATTCAGCGCATTTGTATGATTTTTATTA
201	ACTGTTTTAGCTTTATTTTATTTAATATTTATTAATAAATATCATTCTTACTTTTATATAATTAATAATGTTAAATTAACATATTATACAACATAGCAT
301	ATTCACCATTGATATAATAGTAACTACTTAAATAAATAACTACTTTTATAATACTACTTTTATAATACAAATTTAGCATGCAACTATTATTTCAAATAGTACTTAA
401	GATTTAAGTTACTATGAAACCAGCTCAAGATAAACATTTATGCTATATATTTTCACTTTCTAAACTTTATCAAGGTAATAATGGATGTGAATTGCGCATT
501	ATTATTTAGGTGAAAGAACACAGATCAAGAAATAGACATATGTACTTAAACAGAGAGATCTGAAGAAGAAATCCTAACATGTGTGCATACAAAGGCCCAT
601	CGTTGGATGCAAGGGAAGATCTGATGATTAGGGAGGTACCAAGGTTGGGAAAGAGCTGCAACCAAGGCCATCAAGAATGGGGACAACCAATGTCTAA
701	AATCACACA TTTGATCTCTGTACCACCAGC GGTGTTCGTTGCCTGGCGTTGATTACGAAGTCACTCGTACTCTTAGGGCTCGAATGATGCTGCGTCAAGAGG
801	TACATGATGTACCACCAAGGCTGCTTCGCTGGCGCACTGTTCTTCGTTTAGCTAAGGACTTGGCTGAAACAAACAAGGATGCTCGTGTCTTATCGTTT
901	GTCTGAGAAATACCGCAGTCACTTTCGCTGGTCTTGTAGTGGAGACAGATATGGATAGCCTTGTAGGACAAGCATTTGTCAGATGGAGCTGCTGCGATTAT
1001	CATTGGTTCTGATCCTGTGCCAGATGTTGAGAAGCCTATCTTTGAGATTGTTTCGACCGATCAAAAACCTCGTCCCTGGCAGCCATGGAGCTATCGGTGCT
1101	CTCCTTCGTGAAGTTGGGCTTACATTTCTATCTTAACAAGAGTGTTCCTGATATTATTCGCAAAATATCAATGACGCGCTTAGTAAAGCTTTTGATCCAT
1201	TGGGTATATTTGATATACTCAATATTTGGATGACACACCCCTGGTGGACGTGCAATTTGGACCCAGGTGAACAGAAAGTGAACCTGAAACCCAGAAA
1301	AATGAAGCTACTAGAGATGTACTTAGCAATTTATGGTAATATGTCAAGTGCATGTGTGTTCTTCATCATGGATTTGATGAGGAAGAAATCTCTTGAAGAA
1401	GGACTTAAATCTACCGCTCAGGACCTGATTTGCGCTGACTTTTGGCTTTGGCTTCTGCTCCACATGCAAACTGTTGCTTCTCAGTATAGCCATA

9. Se regreso a la página de “Primers Quest Tool” donde se encuentran los primers, y se selecciono la opción HAIRPIN, tanto del primer Frontal como el primer Reverso.



Set 3 GI# 299150966

Amplicon Length: 704
[View Assay Details](#)

		Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	Hairpin Blast	28	50	22	62	45.5
Reverse		710	732	22	62	45.5

10. Se abrió una nueva pantalla donde te da la información de la temperatura de hibridación, a la cual se pueden formar orquídeas, y al pasar esto se pueden reconocer entre ellas.

Tm primer Frontal

General Information # Bases 22
 Run Date: 5/12/2017 12:08:00 AM

CGCAATGTTCAAGAGCAGAAG

Nucleotide Type: DNA Sequence Type: linear

Temperature: 25 °C Max Foldings: 20

Na Concentration: 50 mM Start Position:

Mg Concentration: 0 mM Stop Position:

Suboptimality: 50 %

Structures

Structure Name	Image	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	T_M (°C)	ΔH (kcal.mole ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ mole ⁻¹)	Output
1		-0.12	26.6	-22.5	-75.07	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>

*Note dNTP Concentration is not taken into account.

Tm primer Reverso

GI# 299150966

General Information # Bases 22
 Run Date: 5/12/2017 6:46:35 PM

GCTGGTGGTACAGAAGATCAAA

Nucleotide Type: DNA Sequence Type: linear

Temperature: 25 °C Max Foldings: 20

Na Concentration: 50 mM Start Position:

Mg Concentration: 0 mM Stop Position:

Suboptimality: 50 %

Structures

Structure Name	Image	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	T_M (°C)	ΔH (kcal.mole ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ mole ⁻¹)	Output
1		-1.4	40.9	-27.5	-87.55	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>



11. Se buscaron los BLAST de los primers Frontal y Reverso para corroborar la amplificación específica del genoma *Arachis hypogaea L.* al 100%, y no a especies que se encuentren en el etiquetado de los productos que se evaluaron.

Primer Frontal

Set 3 GI# 299150966

Amplicon Length: 704
[View Assay Details](#)

		Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	Hairpin Blast	28	50	22	62	45.5
Reverse		710	732	22	62	45.5

Distribution of the top 114 Blast Hits on 100 subject sequences

Mouse over to see the title, click to show alignments





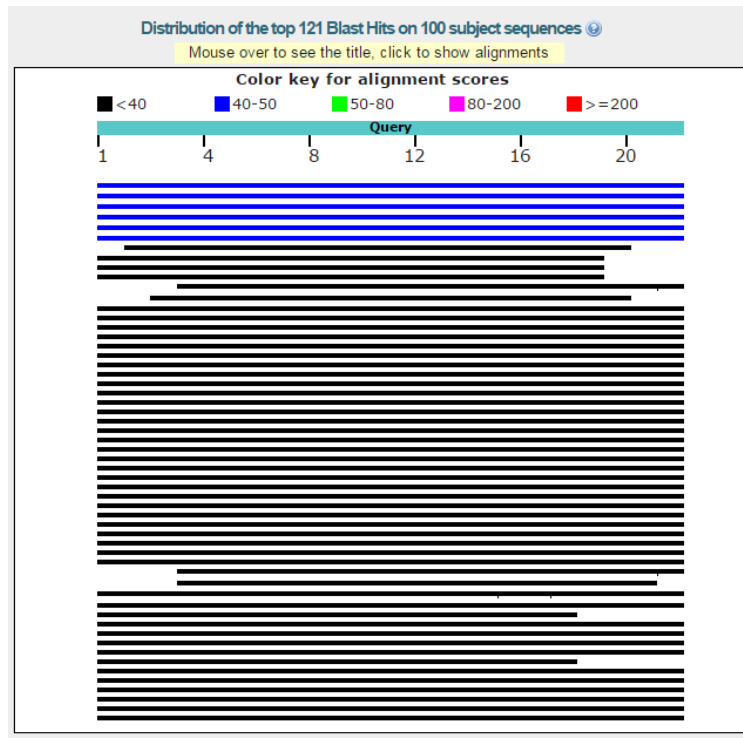
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis duranensis stilbene synthase 3-like (LOC107492389). mRNA	44.1	44.1	100%	0.023	100%	gi 1012104688 XM_016102846.1
<input type="checkbox"/> Arachis hypogaea clone AHRES 2-1 resveratrol synthase gene, partial cds	44.1	44.1	100%	0.023	100%	gi 299150968 HM130570.1
<input type="checkbox"/> Arachis hypogaea clone AHRES 1-5 resveratrol synthase gene, partial cds	44.1	44.1	100%	0.023	100%	gi 299150966 HM130569.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis ipaensis stilbene synthase 3-like (LOC107605371). transcript variant X2, mRNA	40.1	40.1	90%	0.36	100%	gi 1021531532 XM_016307236.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis ipaensis stilbene synthase 3-like (LOC107605371). transcript variant X1, mRNA	40.1	40.1	90%	0.36	100%	gi 1021531530 XM_016307235.1
<input type="checkbox"/> Cladophialophora bantiana CBS 173.52 hypothetical protein partial mRNA	38.2	38.2	86%	1.4	100%	gi 1027055278 XM_016769838.1
<input type="checkbox"/> Clostridium scatologenes strain ATCC 25775, complete genome	38.2	38.2	86%	1.4	100%	gi 800894941 CP009933.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Paralichthys olivaceus TGF-beta receptor type-1-like (LOC109638437). mRNA	36.2	36.2	81%	5.6	100%	gi 1143405356 XM_020101418.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Oryctolagus cuniculus nucleotide binding oligomerization domain containing 2 (NOD2), transcript variant X5, mRNA	36.2	36.2	81%	5.6	100%	gi 11040117338 XM_017350886.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Oryctolagus cuniculus nucleotide binding oligomerization domain containing 2 (NOD2), transcript variant X4, misc. RNA	36.2	36.2	81%	5.6	100%	gi 1040117337 XR_001795775.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Oryctolagus cuniculus nucleotide binding oligomerization domain containing 2 (NOD2), transcript variant X3, mRNA	36.2	36.2	81%	5.6	100%	gi 1040117334 XM_017350884.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Oryctolagus cuniculus nucleotide binding oligomerization domain containing 2 (NOD2), transcript variant X2, mRNA	36.2	36.2	81%	5.6	100%	gi 1040117331 XM_008275044.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Oryctolagus cuniculus nucleotide binding oligomerization domain containing 2 (NOD2), transcript variant X1, mRNA	36.2	36.2	81%	5.6	100%	gi 1040117329 XM_008275042.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Pteropus alecto nucleotide binding oligomerization domain containing 2 (NOD2), transcript variant X3, mRNA	36.2	36.2	81%	5.6	100%	gi 989918747 XM_015586971.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Pteropus alecto nucleotide binding oligomerization domain containing 2 (NOD2), transcript variant X2, mRNA	36.2	36.2	81%	5.6	100%	gi 989918745 XM_015586970.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Pteropus alecto nucleotide binding oligomerization domain containing 2 (NOD2), transcript variant X1, mRNA	36.2	36.2	81%	5.6	100%	gi 989918744 XM_006908750.2
<input type="checkbox"/> Apteryx australis mantelli genome assembly AptMant0, scaffold scaffold303	36.2	66.4	81%	5.6	100%	gi 841904808 ILK064875.1
<input type="checkbox"/> Cyprinus carpio genome assembly common carp genome, scaffold 00006994	36.2	36.2	81%	5.6	100%	gi 885051091 ILN599603.1
<input type="checkbox"/> Xenopus tropicalis clone ISB1-168Q21, complete sequence	36.2	36.2	81%	5.6	100%	gi 88448554 AC160825.3
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Ananas comosus probable serine/threonine-protein kinase PBL25 (LOC109709387). mRNA	36.2	36.2	81%	5.6	100%	gi 1147567176 XM_020231596.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Elaeis quineensis uncharacterized LOC105047193 (LOC105047193), transcript variant X3, mRNA	36.2	36.2	81%	5.6	100%	gi 1130665315 XM_010926011.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Elaeis quineensis uncharacterized LOC105047193 (LOC105047193), transcript variant X2, mRNA	36.2	36.2	81%	5.6	100%	gi 1130665313 XM_019851390.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Elaeis quineensis uncharacterized LOC105047193 (LOC105047193), transcript variant X1, mRNA	36.2	36.2	81%	5.6	100%	gi 1130665312 XM_010926010.2

Primer Reverso

Set 3 GI# 299150966

Amplicon Length: 704
[View Assay Details](#)

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	28	50	22	62	45.5
Reverse	710	732	22	62	45.5





Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Ac
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis ipaensis stilbene synthase 3-like (LOC107605370). mRNA	44.1	44.1	100%	0.023	100%	gij102153152i
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis duranensis stilbene synthase 3-like (LOC107483341). mRNA	44.1	44.1	100%	0.023	100%	gij101210888i
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis duranensis stilbene synthase 3-like (LOC107483289). mRNA	44.1	44.1	100%	0.023	100%	gij101210868i
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis duranensis stilbene synthase 3-like (LOC107483283). mRNA	44.1	44.1	100%	0.023	100%	gij101210866i
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis duranensis stilbene synthase 3-like (LOC107483282). mRNA	44.1	44.1	100%	0.023	100%	gij101210866i
<input type="checkbox"/> Arachis hypogaea clone AHRES 1-5 resveratrol synthase gene, partial cds	44.1	44.1	100%	0.023	100%	gij299150996i
<input type="checkbox"/> Vibrio mimicus strain SCCF01 chromosome 1, complete sequence	38.2	68.4	86%	1.4	100%	gij108231043i
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Rhagoletis zephyria uncharacterized LOC108355647 (LOC108355647). partial mRNA	38.2	38.2	86%	1.4	100%	gij104805792i
<input type="checkbox"/> Wallemia sebi CBS:633.66 hypothetical protein (WALSSEDRAFT_33035). mRNA	38.2	38.2	86%	1.4	100%	gij588259844i
<input type="checkbox"/> Wallemia sebi CBS:633.66 hypothetical protein (WALSSEDRAFT_60716). mRNA	38.2	38.2	86%	1.4	100%	gij588259842i
<input type="checkbox"/> Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 1 sequence	36.2	100	86%	5.6	100%	gij118941911f
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Lates calcarifer transport and golgi organization 6 homolog (tangq6). mRNA	36.2	36.2	81%	5.6	100%	gij107977908i
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis ipaensis stilbene synthase 3-like (LOC107605371). transcript variant X2. mRNA	36.2	36.2	100%	5.6	95%	gij102153153i
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis ipaensis stilbene synthase 3-like (LOC107605371). transcript variant X1. mRNA	36.2	36.2	100%	5.6	95%	gij102153153i
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis ipaensis stilbene synthase 3-like (LOC107638923). mRNA	36.2	36.2	100%	5.6	95%	gij102150890i
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis ipaensis stilbene synthase 3-like (LOC107638922). mRNA	36.2	36.2	100%	5.6	95%	gij102150890i
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis ipaensis stilbene synthase 3 (LOC107638918). mRNA	36.2	36.2	100%	5.6	95%	gij102150889i
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis ipaensis putative stilbene synthase 2 (LOC107638909). mRNA	36.2	36.2	100%	5.6	95%	gij102150888i
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis ipaensis stilbene synthase 1-like (LOC107638908). transcript variant X2. mRNA	36.2	36.2	100%	5.6	95%	gij102150888i
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis ipaensis putative stilbene synthase 2 (LOC107638906). mRNA	36.2	36.2	100%	5.6	95%	gij102150887i
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis ipaensis stilbene synthase 1 (LOC107638902). mRNA	36.2	36.2	100%	5.6	95%	gij102150887i
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis ipaensis stilbene synthase 3-like (LOC107638898). mRNA	36.2	36.2	100%	5.6	95%	gij102150886i
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis ipaensis stilbene synthase 3-like (LOC107638897). mRNA	36.2	36.2	100%	5.6	95%	gij102150886i

2) CALCULO DE LA TEMPERATURA DE HIBRIDACIÓN (Tm) PARA LOS PRIMERS DISEÑADOS ESPECIFICOS DE CACAHUATE

Para realizar este cálculo se ocupo la siguiente fórmula:

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

Calculo de la Tm para los primers específicos del cacahuate (*Arachis hypogaea L.*).

❖ Para primer Frontal → CGCAATGTTCAAAGAGCAGAAG

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

❖ Para primer Reverso → GCTGGTGGTACAGAAGATCAAA

$$Tm = ((7 + 3)4 + (8 + 4)2) - 5 = \underline{59^{\circ}\text{C}}$$

3) CALCULO DE LA TEMPERATURA DE HIBRIDACIÓN (Tm) PARA LA PAREJA DE PRIMERS ESPECIFICOS DEL ALERGENO DE CACAHUATE PARA PCR DIRECTO

1. Se ingresa a la página web: thermoscientific.com/pcrwebtools, y se selecciona la opción "Tm Calculator".



<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource->

ThermoFisher SCIENTIFIC Search All Search Contacto Iniciar sesión Orden Rápida

Popular Aplicaciones y técnicas Comprar todos los productos Servicio y Soporte About Us Cloud

Home > Marcas > Thermo Scientific > Molecular Biology > Molecular Biology Resource Library > Molecular Biology Resource Library > Thermo Scientific Web Tools

Thermo Scientific Web Tools

◀ Molecular Biology Resource Library

Online tools for analyzing primers, setting up reactions, and performing biochemical conversions & calculations.

Thermo Scientific Web Tools

- Tm Calculator
- PCR Reaction Setup for Phusion
- Reaction Setup with DyNAmo qPCR Kits
- OD Conversion
- qPCR Efficiency Calculator
- DNA Copy Number Calculator
- PCR Fidelity Calculator
- Multiple Primer Analyzer
- REviewer - tools for sequence analysis
- Basic Principles of RT-qPCR
- Thermo Scientific Cloning Workflow

Primer design and analysis

Tm Calculator



Analyzes the Tm, MW and extinction coefficient of a primer, and gives dilution instructions.

Multiple primer analyzer



Analyzes different features of multiple primers simultaneously, e.g. Tm, GC content, dimer formation etc.

Restriction digestion tools

DoubleDigest



Performs double digestion with Thermo Scientific restriction enzymes.

REsearch



Finds restriction enzymes either by name or recognition sequence.

2. Se contestan las preguntas y se colocan la secuencia de los primers específicos de alérgeno de cacahuate para obtener la Tm calculada para PCR directo.

[//www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-res-](https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-res-)

ThermoFisher SCIENTIFIC Search All Search Contacto Iniciar sesión Orden Rápida

Tm Calculator

This application calculates the Tm of primers and estimates an appropriate annealing temperature when using different DNA polymerases. [How to use this calculator](#)

Important note

If the PCR primer contains desired mismatches, e.g., for creating a mutation or a restriction site, make sure to calculate the Tm only for the correctly matched sequence.

1. Select your DNA polymerase

Platinum SuperFI DNA polymerase
(Also select this option if using the SuperScript IV One-Step RT-PCR Kit)

Phusion or Phire DNA polymerase

Taq-based DNA polymerase

2. Select input method

Single pair

Batch

3. Type or paste your sequence

Primer#1: 5'- 20 nt: A=3.0 T=6.0 C=8.0 G=3.0 CG=55.00%

Primer#2: 5'- 20 nt: A=0.0 T=8.0 C=10.0 G=2.0 CG=60.00%



4. PCR Conditions

Primer conc. μM

Phusion or Phire DNA polymerase

ID #1	Sequence #1	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol·cm)	Tm °C	ID #2	Sequence #2	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol·cm)	Tm °C	Annealing Temperature °C
Primer#1	TGCCTGCACATG CACCTTT	6003.9	172300.0	70.3	Primer#2	TCGCTCCTCCTTT TCCCGCT	5921.9	156400.0	70.4	70.3

A 2-step protocol (combined annealing/extension) is recommended when primer Tm values are higher than 69°C, using 72°C for annealing step.

4) CALCULO DE LA TEMPERATURA DE HIBRIDACIÓN (Tm) PARA EL PROMOTOR CaMV35S Y EL TERMINADOR T-nos PARA PCR DIRECTO

Se realizó un solo programa para el termociclador para el promotor CaMV35S y el terminador T-nos, para ello se calculo la temperatura de hibridación (Tm) de ambas secuencias y se realizo un promedio de temperaturas de hibridación y con ella se trabajo para llevar a cabo la PCR directo.

1. Se ingresa a la página web: [thermoscientific.com/pcrwebtools](https://www.thermoscientific.com/pcrwebtools), y se selecciona la opción “Tm Calculator”.

<https://www.thermoscientific.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource->

ThermoFisher Scientific Search All Search Contacto Iniciar sesión Orden Rápida

Popular Aplicaciones y técnicas Comprar todos los productos Servicio y Soporte About Us Cloud

Home > Marcas > Thermo Scientific > Molecular Biology > Molecular Biology Resource Library > Molecular Biology Resource Library > Thermo Scientific Web Tools

Thermo Scientific Web Tools

◀ Molecular Biology Resource Library Online tools for analyzing primers, setting up reactions, and performing biochemical conversions & calculations.


Thermo Scientific Web Tools

- Tm Calculator
- PCR Reaction Setup for Phusion
- Reaction Setup with DyNAmo qPCR Kits
- OD Conversion
- qPCR Efficiency Calculator
- DNA Copy Number Calculator
- PCR Fidelity Calculator
- Multiple Primer Analyzer
- REviewer - tools for sequence analysis

Basic Principles of RT-qPCR
Thermo Scientific Cloning Workflow


Primer design and analysis

Tm Calculator



Analyzes the Tm, MW and extinction coefficient of a primer, and gives dilution instructions.


Multiple primer analyzer



Analyzes different features of multiple primers simultaneously, e.g. Tm, GC content, dimer formation etc.


Restriction digestion tools

DoubleDigest



Performs double digestion with Thermo Scientific restriction enzymes.

REsearch



Finds restriction enzymes either by name or recognition sequence.



- Se contestan las preguntas y se colocan la secuencia de los primers del promotor **CaMV35S** para obtener la T_m calculada para PCR directo.

<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-lib>

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Search All

Search



Contacto

Iniciar sesión

Orden Rápida



Tm Calculator

This application calculates the T_m of primers and estimates an appropriate annealing temperature when using different DNA polymerases. [How to use this calculator](#)

Important note

If the PCR primer contains desired mismatches, e.g., for creating a mutation or a restriction site, make sure to calculate the T_m only for the correctly matched sequence.

1. Select your DNA polymerase

- Platinum SuperFi DNA polymerase
(Also select this option if using the SuperScript IV One-Step RT-PCR Kit)
- Phusion or Phire DNA polymerase
- Taq-based DNA polymerase

2. Select input method

- Single pair
- Batch

3. Type or paste your sequence

Primer#1: 5'- GCTCCTACAAATGCCATCA 19 nt: A=6.0 T=4.0 C=7.0 G=2.0 CG=47.37%

Primer#2: 5'- GGATAGTGGGATTGTGCGTC 20 nt: A=3.0 T=6.0 C=2.0 G=9.0 CG=55.00%

Clear

4. PCR Conditions

Primer conc. 0.5 μ M

Phusion or Phire DNA polymerase

Export table data into Excel

ID #1	Sequence #1	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol·cm)	T_m °C	ID #2	Sequence #2	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol·cm)	T_m °C	Annealing Temperature °C
Primer#1	GCTCCTACAAATGCCATCA	5716.8	179700.0	61.8	Primer#2	GGATAGTGGGATTGTGCGTC	6244.1	197000.0	64.7	61.8

- Se contestan las preguntas y se colocan la secuencia de los primers del terminador **T-nos** para obtener la T_m calculada para PCR directo.



<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-lib>

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Search All

Search



Contacto

Iniciar sesión

Orden Rápida



Tm Calculator

This application calculates the Tm of primers and estimates an appropriate annealing temperature when using different DNA polymerases. [How to use this calculator](#)

Important note

If the PCR primer contains desired mismatches, e.g., for creating a mutation or a restriction site, make sure to calculate the Tm only for the correctly matched sequence.

1. Select your DNA polymerase

- Platinum SuperFi DNA polymerase
(Also select this option if using the SuperScript IV One-Step RT-PCR Kit)
- Phusion or Phire DNA polymerase
- Taq-based DNA polymerase

2. Select input method

- Single pair
- Batch

3. Type or paste your sequence

Primer#1: 5'- GAATCCTGTTGCCGGTCTTG 20 nt: A=2.0 T=7.0 C=5.0 G=6.0 CG=55.00%

Primer#2: 5'- TTATCCTAGTTTGCGCGCTA 20 nt: A=3.0 T=8.0 C=5.0 G=4.0 CG=45.00%

Clear

4. PCR Conditions

Primer conc. μM

Phusion or Phire DNA polymerase

Export table data into Excel

ID #1	Sequence #1	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol·cm)	Tm °C	ID #2	Sequence #2	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol·cm)	Tm °C	Annealing Temperature °C
Primer#1	GAATCCTGTTGCC GGTCTTG	6115.0	180500.0	67.1	Primer#2	TTATCCTAGTTTGC GCGCTA	6074.0	182700.0	62.7	62.7

La Tm para CaMV35S es de 61.8°C + Tm para T-nos es de 62.7°C = 124.5°C / 2 = **62.2°C**



