



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

**“Detección de *Theobroma cacao L.* transgénico en plantas  
originarias de México y productos comercializados en el país por  
la técnica de PCR”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**INGENIERA EN ALIMENTOS**

P R E S E N T A:

**YECCENI AYALA HUERTA**

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

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

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 *Theobroma cacao* L. transgénico en plantas originarias de México y productos comercializados en el país por la técnica de PCR.

Que presenta la pasante: Yeceni Ayala Huerta  
Con número de cuenta: 413111335 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 07 de Agosto de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

|               | NOMBRE                                 | FIRMA |
|---------------|--|-------|
| PRESIDENTE    | Dr. José Francisco Montiel Sosa        |       |
| VOCAL         | I.A. María Guadalupe López Franco      |       |
| SECRETARIO    | Dra. María del Carmen Valderrama Bravo |       |
| 1er. SUPLENTE | I.A. Miriam Álvarez Velasco            |       |
| 2do. SUPLENTE | M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza     |       |

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

LMCF/cga\*



## **DEDICATORIAS**

A Dios por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por su gran amor y cuidados, por rodearme de personas hermosas y recordarme que no estoy sola.

“No temas, porque yo estoy contigo; no desmayes, porque yo soy tu Dios que te esfuerzo; siempre te ayudaré, siempre te sustentaré con la diestra de mi justicia”. Isaías 41:10

A mis padres Miguel y Elida, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias por los valores y principios inculcados, pues me han hecho una mejor persona, gracias por la confianza depositada en mí. Es un orgullo ser su hija, los amo.

A Ángel por ser mi apoyo incondicional, gracias por tu amor, por motivarme a continuar y no dejare caer, por ayudarme en cualquier cosa que necesitara, por creer en mi cuando yo no lo hacía, por estar siempre ahí para mí teniendo una sonrisa para alegrar mis días, gracias por cada momento que hemos compartido, te amo.



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. José Francisco Montiel Sosa, por el apoyo brindado para la realización de este trabajo de tesis.

A la M. en M. Josefina Moreno Lara, por ser parte importante en este proyecto, por la dedicación y el tiempo invertido durante la fase experimental y revisión de esta tesis, así como por los conocimientos impartidos, gracias por su paciencia y ayuda.

Al M. en C. Ernesto Marín Flamand, por la ayuda brindada durante la fase experimental, por su tiempo y por los conocimientos transmitidos.

A mis sinodales, por el tiempo y la disposición invertidos y en la revisión de este trabajo de tesis, por sus asesorías y recomendaciones.

A Cristina, Karla L, Karla V, gracias por la amistad sincera que me han brindado, por los hermosos momentos que pasamos juntas, por guiarme, apoyarme y cuidarme, gracias por tantas sonrisas, más que unas amigas, encontré en ustedes a unas hermanas, las quiero mucho.

A la UNAM, especialmente a la FES-Cuautitlán, por todos los conocimientos y valores que me ha permitido adquirir para mi formación profesional, por ser el lugar de donde tengo hermosos recuerdos. Es un orgullo ser egresada de la máxima casa de estudios.

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍITU”**



## ÍNDICE

|   |      |
|---|------|
| INDICE DE FIGURAS .....   | VIII |
| INDICE DE CUADROS .....   | XI   |
| RESUMEN .....   | 1    |
| INTRODUCCIÓN .....  | 2    |
| JUSTIFICACIÓN .....   | 3    |
| CAPITULO 1. GENERALIDADES .....   | 3    |
| 1.1    Cacao ( <i>Theobroma cacao L.</i> ) .....                        | 3    |
| 1.1.1    Origen de la especie .....                                     | 4    |
| 1.1.2    Clasificación taxonómica .....                                 | 4    |
| 1.1.3    Descripción morfológica ( <i>Theobroma cacao L.</i> ).....     | 4    |
| 1.1.4    Composición química del cacao .....                            | 9    |
| 1.1.5    Producción Mundial de cacao .....                              | 11   |
| 1.1.6    Producción de cacao en México.....                             | 12   |
| 1.1.7    Importación y Exportación del cacao .....                      | 16   |
| 1.1.8    Enfermedades que atacan al cultivo .....                       | 18   |
| 1.1.9    Productos derivados.....                                       | 20   |
| 1.1.10    Normatividad aplicada en cacao .....                          | 20   |
| 1.2    Organismos genéticamente modificados (OGM).....                  | 21   |
| 1.2.1    Definición de Organismos Genéticamente modificados.....        | 22   |
| 1.2.2    Alimentos genéticamente modificados .....                      | 22   |
| 1.2.3    Cacao transgénico .....  | 23   |
| 1.2.4    Promotores y Terminadores .....                                | 24   |
| 1.2.5    Transgenes de importancia agronómica .....                     | 26   |
| 1.2.6    Resistencia a enfermedades bacterianas.....                    | 27   |
| 1.2.7    Tolerancia a factores abióticos.....                           | 27   |
| 1.2.8    Otras aplicaciones .....                                       | 28   |
| 1.2.9    Situación actual de Organismos Genéticamente Modificados ..... | 29   |
| 1.2.10    Legislación en México .....                                   | 34   |
| 1.2.11    Legislación Mundial.....                                      | 40   |



|  |  |    |
|--|--|----|
| 1.3  | Técnicas biotecnológicas para la identificación de transgenes .....                  | 41 |
| 1.3.1                                      | Técnicas basadas en el análisis de proteínas .....                                   | 41 |
| 1.3.2                                      | Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....                                      | 42 |
| 1.3.3                                      | Componentes de la PCR .....  | 42 |
| 1.3.4                                      | Etapas de la reacción.....   | 45 |
| 1.3.5                                      | Análisis del producto de la PCR.....   | 48 |
| 1.3.6                                      | Tipos de PCR.....  | 51 |
| 1.3.7                                      | Aplicaciones de la PCR.....  | 54 |
| 1.3.8                                      | Ventajas y Desventajas de la PCR.....  | 54 |
| 1.3.9                                      | Criterios a considerar para la selección adecuada de los primers .....               | 55 |
| CAPITULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL ..... |  | 57 |
| 2.1  | Descripción del cuadro metodológico.....   | 58 |
| 2.1.1                                      | Problema .....   | 58 |
| 2.1.2                                      | Objetivo general .....   | 58 |
| 2.1.3                                      | Objetivo Particular 1.....   | 58 |
| 2.1.4                                      | Objetivo Particular 2.....   | 59 |
| 2.1.5                                      | Objetivo Particular 3.....   | 59 |
| 2.1.6                                      | Objetivo Particular 4.....   | 59 |
| 2.1.7                                      | Objetivo Particular 5.....   | 60 |
| 2.2  | Materiales y métodos .....   | 60 |
| 2.2.1                                      | Material biológico .....   | 60 |
| 2.2.2                                      | Extracción de ADN.....   | 63 |
| 2.2.3                                      | Cuantificación de ADN por medio de absorbancia .....                                 | 64 |
| 2.3  | Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR .....  | 67 |
| 2.3.1                                      | Etapas y ciclos de la reacción .....   | 68 |
| 2.3.2                                      | Evaluación de los productos obtenidos de la PCR mediante electroforesis en gel. .... | 70 |
| 2.3.3                                      | Visualización de fragmentos. ....  | 72 |
| CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....   |  | 72 |
| 2.1  | Objetivo Particular 1 .....  | 72 |
| 3.2  | Objetivo Particular 2 .....  | 77 |
| 3.3  | Objetivo Particular 3 .....  | 80 |



---

|                       |                             |     |
|-----------------------|-----------------------------|-----|
| 3.4                   | Objetivo Particular 4 ..... | 84  |
| 3.5                   | Objetivo Particular 5 ..... | 85  |
| CONCLUSIONES .....    |                             | 99  |
| RECOMENDACIONES ..... |                             | 101 |
| GLOSARIO .....        |                             | 102 |
| REFERENCIAS .....     |                             | 105 |
| ANEXOS .....          |                             | 112 |



## INDICE DE FIGURAS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 1  | Morfología del cacao <i>Theobroma cacao</i> L. (León, 1987).....  | 8  |
| Figura 2  | Aporte que contienen 100g de chocolate SAGARPA-SIAP (2017).....   | 10 |
| Figura 3  | Porcentaje del valor de la producción por entidad federativa SAGARPA-SIAP (2017).....                             | 13 |
| Figura 4  | Volumen de la producción nacional 2007-2016 (Miles de toneladas) SAGARPA-SIAP (2017).....                         | 13 |
| Figura 5  | Volumen de producción 2015-2016 por entidades productoras SAGARPA-SIAP (2017).....                                | 14 |
| Figura 6  | Consumo anual nacional per-cápita de cacao y chocolate en México SAGARPA-SIAP (2017).....                         | 14 |
| Figura 7  | Consumo mundial per-cápita de chocolate SAGARPA-SIAP (2017).....  | 15 |
| Figura 8  | Indicadores 2016 SAGARPA-SIAP (2017).....   | 15 |
| Figura 9  | Producción mensual nacional (%) SAGARPA-SIAP (2017).....  | 16 |
| Figura 10 | Origen destino-comercial SAGARPA-SIAP (2017).....   | 16 |
| Figura 11 | Comercio Exterior 2016 SAGARPA-SIAP (2017).....   | 17 |
| Figura 12 | Evolución del comercio exterior (miles de dólares) SAGARPA-SIAP (2017).....                                       | 17 |
| Figura 13 | Distribución mensual del comercio exterior (%) SAGARPA-SIAP (2017).....   | 18 |
| Figura 14 | Estructura de un gen (Sánchez, 2010).....   | 24 |
| Figura 15 | Área global de cultivos GM, por país (sobre 185,1 millones de hectáreas) ISAAA (2017). .....                      | 30 |
| Figura 16 | Porcentaje sembrado en Latinoamérica, Asia y África en 2016 ISAAA (2017).....                                     | 31 |
| Figura 17 | Dieciocho países mega-productores, con 50.000 hectáreas o más de cultivos biotecnológicos o GM ISAAA (2017) ..... | 32 |
| Figura 18 | Cultivos genéticamente modificados disponibles a nivel global Agrobioméxico (2016 b).....                         | 33 |
| Figura 19 | Desarrollo del marco legal de los OGMs en México Agrobioméxico (2016 a).....                                      | 34 |
| Figura 20 | Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente modificados (LBOGM) Agrobioméxico (2016 b).....                   | 35 |
| Figura 21 | Autoridades competentes para la aplicación del marco legal o regulatorio en México Agrobioméxico (2016 a).....    | 37 |
| Figura 22 | Autoridad involucrada para la aplicación del marco legal o regulatorio en México Agrobioméxico (2016 a).....      | 39 |
| Figura 23 | Porcentaje de permisos de liberación por cultivos (2005-2017).....  | 39 |
| Figura 24 | Componentes de la PCR (University of California Davis, 2007).....   | 43 |



|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 25 | Fases y componentes de la PCR (Pérez, 2011).....   | 46 |
| Figura 26 | Elementos necesarios para una electroforesis. (López y Sandoval, 2013).....  | 48 |
| Figura 27 | Cámaras de electroforesis (López y Sandoval, 2013).....  | 50 |
| Figura 28 | Programa de PCR Punto Final para <i>Theobroma cacao</i> L.....   | 69 |
| Figura 29 | Programa de PCR Directa para <i>Theobroma cacao</i> L.....   | 69 |
| Figura 30 | Programa de la PCR Directa para promotor CaMV y el terminador T-NOS.....   | 70 |
| Figura 31 | Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V para identificación de cacao en hoja y granos de cacao (dH1, dC4, dC3, dC2, dC1), mediante PCR punto final.....                                | 74 |
| Figura 32 | Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V para la identificación de cacao en especies filogenéticamente cercana y lejanas (dH1, dAv, dTri, dAlg, dP, dR), mediante PCR punto final ..... | 76 |
| Figura 33 | Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V para la identificación de cacao en Plantas de cacao (dH1, dH2, dH3, dH4), mediante PCR punto final.....  | 78 |
| Figura 34 | Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V para identificación de cacao en granos de cacao (H1, dC3, dC5, dC1, dC2, dC4), mediante PCR directa.....                                       | 80 |
| Figura 35 | Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V para identificación de cacao en chocolates (H1, Ch, dChT, dChL, dChX, dChR), mediante PCR directa.....   | 82 |
| Figura 36 | Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V para identificación de cacao en chocolates (H1, dChH, dChI, dChE, dChCa, dChCo ), mediante PCR directa.....                                    | 83 |
| Figura 37 | Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V para identificación de cacao en chocolates (H1, dChCru, dChMi, dChTo, dChHer, dChNes, dChKit), mediante PCR directa.....                       | 84 |
| Figura 38 | Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60 V. Para la verificación de la amplificación del gen de CaMV35S 195pb, en el Control Positivo (M+), mediante PCR directa.....                     | 86 |
| Figura 39 | Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60 V para la amplificación del gen de CAMV35S en Plantas de Cacao (M+, H1, H2, H3, H4), mediante PCR directa.....                                   | 87 |
| Figura 40 | Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60 V para la amplificación del gen de CAMV35S en granos de cacao (M+, dC3, dC5, dC1, dC2, dC4), mediante PCR con Master Mix.....                    | 88 |
| Figura 41 | Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60 V para amplificación del gen CAMV35S en chocolates (M+, ChCo, dChI, dChCa, ChH, ChR), mediante PCR directa.....                                  | 89 |
| Figura 42 | Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60 V para amplificación del   |    |



|           |  |    |
|-----------|--|----|
|           | gen CAMV35S en chocolates (M+, ChT, ChL, Ch, ChX), mediante PCR directa.....   | 90 |
| Figura 43 | Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60 V para amplificación del gen CAMV35S en chocolates (M+, dChKit, dChCru, dChNes, dChMi, dChTo, dChHer), mediante PCR directa..... | 91 |
| Figura 44 | Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60 V. Para la verificación de la amplificación del gen de T-NOS 180pb, en el Control Positivo (M+), mediante PCR directa.....         | 92 |
| Figura 45 | Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60 V para la amplificación del gen de T-NOS en plantas de cacao (M+, H1, H2, H3, H4), mediante PCR directa.....                       | 93 |
| Figura 46 | Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60 V para la amplificación del gen de T-NOS en granos de cacao (M+, dC3, dC5, dC1, dC2, dC4), mediante PCR directa.....               | 94 |
| Figura 47 | Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60 V para amplificación del gen T-NOS en chocolates (M+, ChCo, dChI, dChCa, ChH, ChR), mediante PCR directa.....                      | 95 |
| Figura 48 | Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60 V para la amplificación del gen de T-NOS en Chocolates (M+, ChT, ChL, Ch, ChX), mediante PCR directa.....                          | 96 |
| Figura 49 | Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60 V para amplificación del gen T-NOS en chocolates (M+, dChKit, dChCru, dChNes, dChMi, dChTo, dChHer), mediante PCR directa.....     | 96 |



## INDICE DE CUADROS

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabla 1  | Morfología de <i>Theobroma cacao</i> L.....  | 5  |
| Tabla 2  | Contenido de 100g de cacao en polvo (Morales et al., 2012).....  | 9  |
| Tabla 3  | Posicionamiento de México en el sector cacaotero a nivel mundial de 2012-2016 SAGARPA-SIAP (2017, 2016, 2015, 2014, 2013)..... | 11 |
| Tabla 4  | Criterios a considerar para la selección de primers (Cortazar y Silva 2004).....   | 56 |
| Tabla 5  | Muestras de material biológico natural.....  | 60 |
| Tabla 6  | Muestras de material biológico comercializado.....   | 61 |
| Tabla 7  | Primers seleccionados de <i>Theobroma cacao</i> L. para llevar a cabo la PCR.  | 66 |
| Tabla 8  | Primers seleccionados del promotor CaMV35S y el terminador T-NOS para llevar a cabo la PCR.....                                | 66 |
| Tabla 9  | Componentes de PCR con Master Mix®.....  | 68 |
| Tabla 10 | Componentes de PCR Directa.....  | 68 |
| Tabla 11 | Cuantificación y pureza del ADN de muestras de cacao.....  | 73 |
| Tabla 12 | Cuantificación y pureza del ADN de las muestras filogenéticamente cercana y lejanas al cacao.....                              | 75 |
| Tabla 13 | Cuantificación y pureza del ADN de hojas de plantas de cacao.....  | 77 |
| Tabla 14 | Cuantificación y pureza del ADN de granos de cacao.....  | 79 |
| Tabla 15 | Cuantificación y pureza del ADN de muestras de chocolates artesanales y comercializados en el país.....                        | 81 |
| Tabla 16 | Resumen de resultados de detección de OGM en cacao natural (plantas y granos).....   | 98 |
| Tabla 17 | Resumen de resultados de detección de OGM en productos comerciales que contienen cacao (chocolates).....                       | 98 |



---

## RESUMEN

Los cultivos transgénicos van en aumento, se han convertido en un recurso indispensable para los agricultores de todo el mundo debido a la gran cantidad de beneficios que ofrecen por su mejor productividad y rentabilidad, así como también por el menor esfuerzo que requieren. Por lo cual es de gran importancia la información en el etiquetado, pues es necesario que el consumidor conozca lo que está adquiriendo tanto en producto natural como procesado, por ello, evaluar la presencia de transgénicos en los alimentos que adquirimos con base en evidencia científica es trascendental.

El objetivo de esta investigación fue establecer una metodología para detectar cacao *Theobroma cacao L.* transgénico y no transgénico mediante la técnica de PCR para aplicarla en plantas y granos de cacao (productos naturales), así como en productos comercializados en México.

Para la identificación de *Theobroma cacao L.* nativo y transgénico se evaluaron 9 muestras de plantas y granos de cacao, procedentes de los estados productores de México, también se obtuvieron 7 muestras de chocolates importados en México y 7 muestras de chocolates artesanales. Posteriormente se extrajo el ADN de dichas muestras siguiendo el protocolo de Sambrook 2001, para conocer el estimado de la pureza y concentración del ADN. Se diseñaron primers para cacao con programas bioinformáticos para la identificación de cacao en los productos evaluados; utilizando como control positivo una planta de cacao del Estado de Chiapas, se comprobó la especificidad de los primers diseñados para la identificación de cacao en los productos; mientras que para la identificación de organismos genéticamente modificados se utilizó como promotor CaMV35S del virus del mosaico de la coliflor y como terminador T-NOS de *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando como control positivo granos de maíz transgénicos. Con el ADN extraído de las diferentes muestras se llevó a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de los fragmentos de ADN. Posteriormente se realizó la separación de fragmentos en un gel de agarosa por electroforesis para la posterior visualización de las muestras.

13 de esas muestras amplificaron para los genes de CaMV35S y 2 para T-NOS, asegurando así la presencia de cacao genéticamente modificado, ya que la mayoría de los cultivos transgénicos aprobados y comercializados utiliza el promotor constitutivo de la subunidad 35S del ARN ribosomal del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y secuencia de terminación T-NOS de *Agrobacterium tumefaciens*. Cabe mencionar que ni uno de los productos analizados presentó en la etiqueta la leyenda “libre de transgénicos”.



---

## INTRODUCCIÓN

El cacao se cultiva principalmente en África del Oeste, América Central, Sudamérica y Asia. Siendo el mayor productor Costa de Marfil; México se posiciona en el treceavo lugar a nivel mundial en producción de cacao con 26 mil 969 toneladas SAGARPA-SIAP (2017).

En México el consumo de cacao es de 0.5 kg por persona SAGARPA-SIAP (2017), de los cuales el consumo de chocolates es apenas de 700 g por persona al año, derivado de mitos que se le atribuyen como generador de obesidad y sobrepeso, a pesar de su importancia gastronómica, social y cultural; contrario a Estados Unidos, Francia, Bélgica y Suiza que tienen una ingesta de 10 kg o más por habitante (González, 2015).

A pesar de ser un fruto mexicano, auténtico que da identidad nacional y que es símbolo de potencial comercial, el año pasado se importó el 63% de nuestras necesidades, lo que significa que “no somos autosuficientes, ni producimos el cacao que consumimos” (Patiño, 2017). El cacao que más se ocupa es importado de África, de Costa de Marfil o de República Dominicana (Villamil, 2016).

Representantes de diez países y expertos internacionales (Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, así como de México, Panamá, Perú, República Dominicana y Trinidad y Tobago) participaron en el Primer Foro Regional de la Iniciativa Latinoamericana del Cacao (ILAC). Mencionando que una tonelada de cacao genéticamente modificado tiene un valor promedio de 3,000 dólares (USD), a diferencia del cacao fino y de aroma nativo de América Latina que su valor llega a 10,000 USD la tonelada (CAF, 2016).

El cacao es una planta originaria de México por lo cual México cuenta con la “Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados” que determina las bases para el establecimiento de áreas geográficas libres de OGMs (Organismos Genéticamente Modificados), en las que se prohíbe y restringe la realización de actividades con determinados OGM, así como de cultivos de los cuales México sea centro de origen, en especial del maíz, que mantendrá un régimen de protección especial. En México, la Ley de Bioseguridad no exige el etiquetado de los alimentos, pero se requiere el etiquetado de las semillas para la siembra.

La investigación se orientó en detectar la presencia de cacao genéticamente modificado en productos que pudieran contenerlo, naturales y procesados, empleando uno de los métodos más sensibles utilizados actualmente, la amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dicho método permite la amplificación in vitro de secuencias específicas de nucleótidos por medio de iniciadores. En el caso de las plantas transgénicas, se utilizan iniciadores que detecten las secuencias utilizadas para la inserción del transgen en el genoma de la planta. Tal es el caso de promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), y el terminador de la nopalina sintetasa (T-NOS).



## JUSTIFICACIÓN

El cacao está de moda, y su demanda es cada vez mayor, una situación inmejorable si no fuera porque la producción del cacao en México ha ido en descenso, debido a la falta de apoyo a los agricultores como consecuencia de la falta capital, créditos, tecnología, capacitación, bajo precio del grano etc. (De la Cruz *et al.*, 2015). Así como las enfermedades fúngicas constituyen un gran desafío para los productores de cacao en las regiones tropicales donde se cultiva. Por tal motivo se conoce que se han hecho modificaciones genéticas en cacao para obtener plantas resistentes a enfermedades para evitar pérdidas en el cultivo y económicas.

El trabajo de tesis se basará en la detección de cacao transgénico en plantas originarias de México, en productos industrializados en el país así como en productos artesanales.

Por lo mencionado anteriormente es de gran importancia que el consumidor conozca lo que está adquiriendo tanto en grano como en productos comercializados, debido a que la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SAG/BIO-2014 se debe declarar en el etiquetado los organismos genéticamente modificados que sean semillas o material vegetativo destinados a siembra, cultivo y producción agrícola (NOM-001- SAG/BIO, 2014).

Además son muy pocas las investigaciones realizadas sobre este tema aplicado en cacao.

## CAPITULO 1. GENERALIDADES

### 1.1 Cacao (*Theobroma cacao L.*)

El cacao (*Theobroma cacao L.*) pertenece al género *Theobroma*; vocablo griego que significa “alimento de los dioses”.

Linneo ubicó primero en 1753 el género *Theobroma* en la familia *Tiliaceae* y después consideró que podría ser incluido en la familia *Esterculiaceae*. En la actualidad se le ha ubicado en la familia *Malvaceae*.

*Theobroma cacao* es una de las 22 especies del género *Theobroma* (Hardy, 1960), originaria de Sudamérica y parte de Centroamérica (Avendaño *et al.*, 2011).



### 1.1.1 Origen de la especie

Etimología del cacao.

Aparentemente la palabra “cacao” se deriva de las dos palabras Mayas “kaj” y “kab”, que significan “amargo” y “jugo” respectivamente. Su combinación, “kajkab” se convirtió en “kahkah” en español. Cuando se le agrego el sufijo “atl”, que significa “agua” o “liquido” a kajkab, se obtuvo kajkabal, que luego cambio a “kajkabhuatl” por la inserción convencional del diptongo “hu”. En español se convirtió en “kakahuatl” o “cacahuatl”, forma que más tarde cambio a “cacauatl” y a “cacaoatl”. Finalmente se suprimieron las últimas tres letras, quedando entonces “cacao” (Hardy, 1960).

### 1.1.2 Clasificación taxonómica

Hoy en día se conocen de 20 a 22 especies dentro del género *Theobroma*; las cuales se distinguen por el tamaño de la planta, la forma de sus hojas, el tamaño, forma y color del fruto y la semilla, y las cualidades nutritivas del grano. En la actualidad se comercializan tres tipos de cacao: el criollo, el forastero y el trinitario (Avendaño *et al.*, 2011).

La clasificación taxonómica de *Theobroma cacao* L. es la siguiente:

- Reino: *Plantae*
- División: *Magnoliophyta*
- Clase: *Magnoliopsida*
- Orden: *Malvales*
- Familia: *Malvaceae*
- Género: *Theobroma*
- Especies: 20-22

### 1.1.3 Descripción morfológica (*Theobroma cacao* L.)

En la Tabla 1 se presenta la descripción morfológica del árbol de cacao.

Tabla 1. Morfología de *Theobroma cacao* L.

| PARTE DEL ÁRBOL DE CACAO   | FIGURA |
|--|--------|
| <p><b>Raíz</b></p> <p>El tipo de sistema radical depende también de la clase de propagación. En una planta proveniente de semilla hay una raíz principal o pivotante, que alcanza hasta 2 m de longitud, y varias raíces axiales, que ramifican superficialmente y miden hasta 5 m de largo (León, 1987).</p>  |        |
| <p><b>Porte</b></p> <p>El cacao es un árbol (Figura 1, A) que presenta un marcado diformismo de ramas. En una planta proveniente de semilla hay un solo eje vertical, que alcanza de 1- 1.5 m de altura detiene el crecimiento apical y emite en la parte superior de 3-5 ramas laterales. Estas brotan de yemas tan juntas que parecieran salir del mismo plano y forman lo que se llama “horqueta” (León, 1987).</p> |        |
| <p><b>Hoja</b></p> <p>La mayoría de las hojas tienen pigmentación, cuyo color varía desde un verde claro, casi blanquecino, hasta el violeta oscuro. Aparentemente las más pigmentadas se encuentran entre los cacaos criollos y trinitarios y los menos pigmentadas se encuentran en los amazónicos (Avendaño <i>et al.</i>, 2011).</p>   |        |
| <p><b>Inflorescencia</b></p> <p>Las inflorescencias o cojines (Figura 1, D) aparecen solo en el tronco y ramas principales, fenómeno denominado caulifloria, los cojines ocupan posiciones axiales a las hoja. (León, 1987).</p>   |        |
| <p><b>Flor</b></p> <p>La flor (Figura 1, E-F) individual tiene un pedicelio largo y fino, de 1-1.5 cm de longitud. Al final hay</p>  |        |



3-7, normalmente 5 sépalos agudos y rosados de 6-8 mm de largo. La corona consiste de 5 pétalos blancos, de 6-8 mm de largo, formados por una base cóncava en forma de concha y por una lígula triangular, muy delgada en la base. El centro de la flor lo ocupa el tubo estaminal, compuesto por 5 estambres fértiles, cortos y doblados hacia afuera, cada uno encerrado en la concha de un pétalo, y de 5 estaminodios internos, agudos y largos. (León, 1987).



#### Fruto

El fruto del cacao (Figura 1, K-M) llamado comúnmente “mazorca” es una drupa grande, sostenida por un pedúnculo fuerte, leñoso, resultado de la maduración del pedicelo de la flor. La forma varía considerablemente y ha sido el carácter que ha servido de base para agrupar las diferentes poblaciones dentro de la especie (León, 1987). El pericarpio está formado por tres partes: el exocarpo o sección exterior, formado por un tejido esponjoso, con o sin pigmentaciones, de espesor variable; el mesocarpo, es una capa de células semileñosas, dura, cuya característica puede variar según el genotipo, así en los cacaos criollos es suave mientras que en los forasteros es dura, y una capa interior o endocarpo carnosa y suave, que tiene continuidad con el mucílago de la semilla (Avendaño *et al.*, 2011).



#### Semilla

La fruta del cacao contiene de 10 a 50 semillas o “almendras”. Las semillas (Figura 1, L) son cuerpos aplanados y elipsoidales, de 2-4 cm de largo, rodeadas por la pulpa, blanca y azucarada compuesta principalmente por perénquina y recorrido por haces vasculante y canales de mucilago. La testa o envoltura es gruesa. El embrión se forma de dos grandes cotiledones (León, 1987).



Durante miles de años el cacao ha sido cultivado en América, y todos los tipos que se encuentran hoy en cultivo no son más que variedades o cultivares de los que apenas es



posible conocer su origen. Sin embargo a pesar de eso la mayoría de autores reparte los cacaos cultivados en tres grandes grupo: Criollo, Forastero y Trinitario (Braudeau, 1970).

### **Grupo de los Criollo**

Se reúnen en este grupo todos los cacaos que presentan las mismas características que los criollos venezolanos y en particular todos los tipos de cotiledones blancos antiguamente cultivados en América Central y México (Braudeau, 1970).

Los caracteres principales de los cacaos Criollos son los siguientes:

- Estaminodios de color rosa pálido.
- Mazorcas de color rojo o verde antes de la madurez, de forma generalmente alargada, con una punta muy acentuada en el extremo inferior, y marcados con diez surcos muy profundos iguales o a veces repartidos en dos grupos alternos de cinco, uno de los dos menos acentuados.
- Pericarpio en general muy rugoso, delgado y muy fácil de cortar; el mesocarpo, delgado, esta poco lignificado.
- Granos gruesos, de sección casi redonda, con los cotiledones frescos de color blanco o muy ligeramente pigmentados.

### **Grupo de los “Forastero” Amazónicos**

A este grupo pertenecen todos los cacaos corrientes del Brasil y del Oeste Africano, así como el cacao nacional del Ecuador y numerosos cultivares encontrados en los diferentes países de América Central y del Norte de América del Sur. Parecen ser originarios de la alta Amazónica y haber sido dispersados naturalmente, por la cuenca del Amazonas (Braudeau, 1970).

Los caracteres botánicos de los Forasteros son los siguientes:

- Estaminodios pigmentados de violeta.
- Mazorcas de color verde (amarillo en la madurez), de morfología variable que abarca desde la forma del Criollo hasta la forma <<amelonada>> (poco o nada asurcado, superficie lisa, extremidades redondeadas o embotadas).
- Pericarpio espeso y difícil de cortar a causa de la presencia de un mesocarpo fuertemente lignificado.
- Granos más o menos aplastados con los cotiledones frescos de color purpura subido.

### **Grupo de los Trinitarios**

El termino trinitario se ha conservado en la actualidad para designar las poblaciones híbridas que tienen por origen un cruzamiento entre Forastero Amazónico y Criollo.

Los caracteres botánicos de los Trinitarios son difíciles de definir. Son los de una población híbrida polimorfa donde se pueden observar todos los tipos intermedios entre los Criollos,



por una parte, y los Forastero, por la otra. Una disyunción muy grande de caracteres puede observarse en los descendientes de Trinitario (Braudeau, 1970).

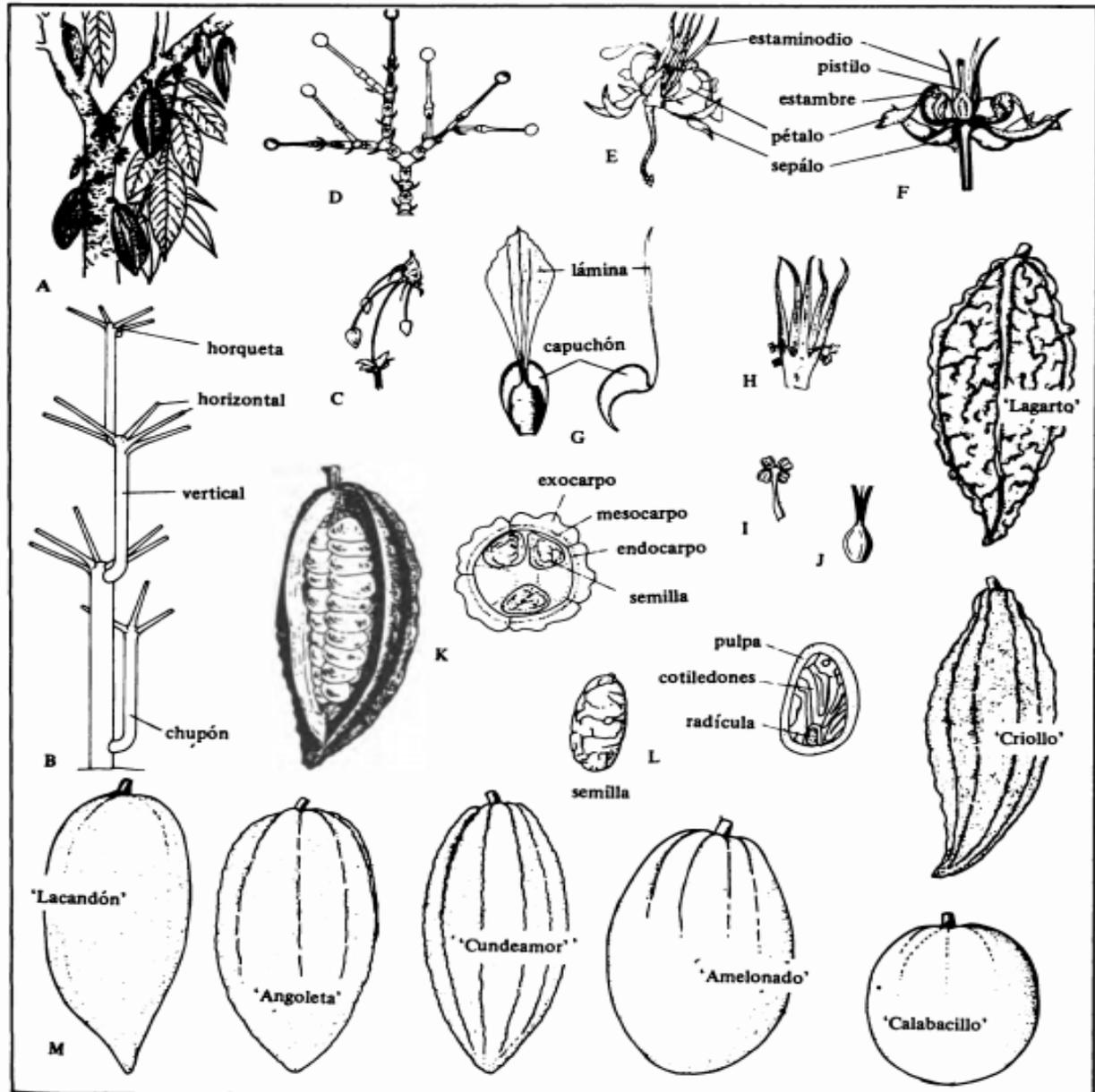


Figura 1. Morfología del cacao, *Theobroma cacao* L. A) porte, B) diformismo de las ramas, C) cojín floral, D) esquema de un cojín, E) flor, F) corte longitudinal de la flor, G) pétalo, H) tubo estaminal, I) estambre, J) pistilo, K) fruto en corte longitudinal y transversal, L) semilla y corte longitudinal, M) frutos de diversos orígenes y formas (León, 1987).



### 1.1.4 Composición química del cacao

Químicamente el cacao está constituido por: Grasa (53.05%), agua (3.65%), nitrógeno total (2.28%), nitrógeno proteico (1.50%), teobromina (1.71%), cafeína (0.085%). Carbohidratos: Glucosa (0.30%), sacarosa (1.58%), almidón (6.10%), pectinas (2.25%), fibra (2.09%). Polifenoles (7.54%). Ácidos: Acético libre (0.014%), oxálico (0.29%) (Morales *et al.*, 2012).

Cada 100 g de polvo de cacao contienen (Tabla 2):

**Tabla 2. Contenido de 100g de cacao en polvo (Morales *et al.*, 2012).**

| Elemento      | Contenido |
|---------------|-----------|
| Energía       | 452 kcal  |
| Proteínas     | 21.5g     |
| Carbohidratos | 35g       |
| Grasa         | 25.6      |
| Calcio        | 0.1690g   |
| Magnesio      | 0.544mg   |
| Sodio         | 0.0090mg  |
| Hierro        | 0.0138g   |
| Cobre         | 0.0045g   |
| Fosforo       | 0.795mg   |
| Potasio       | 2.057mg   |
| Zinc          | 0.0079g   |
| Teobromina    | 2.5g      |
| Flavonoides   | 7g        |

#### Valor nutritivo

Se ha descubierto recientemente que el cacao contiene tres sustancias que actúan en el cerebro, estas sustancias inducen una sensación de bienestar y, tomadas en cantidades superiores a las que hay en una tableta de chocolate, provocarían euforia y reducirían la sensibilidad al dolor. Se trata de la anandamida, N-oleoil-etanol-amina y N-linoleoil-etanol-amina (estas dos últimas contienen ácidos grasos de la porción grasa del cacao). La anandamida se acopla en el cerebro a los receptores canabinoides que hay en algunas células y, de este modo, desencadena una cascada de sensaciones placenteras. La N-oleoil-etanol-amina y N-linoleoil-etanol-amina impiden que la anandamida se destruya y, por lo tanto, ayudan a que las sensaciones placenteras se prolonguen. Así mismo el cacao también contienen fenil-etil-amina, una sustancia química (presente en el cerebro



humano) del grupo de las endorfinas cuyos efectos son conocidos, ya que al introducirse en la sangre eleva el estado de ánimo, creando una energía altamente positiva, una sensación un tanto euforizante. Aunado a todo esto un grupo de científicos estadounidenses ha llegado a la conclusión de que una taza de cacao soluble es la bebida que contiene mayor concentración de antioxidantes, casi el doble que el vino tinto y hasta cinco veces más que el té verde o negro, estos antioxidantes son componentes naturales que ayudan a prevenir el envejecimiento y el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y cáncer dentro de los que destacan los flavanoles, en especial la epicatequina, catequina y procianidinas (Morales *et al.*, 2012).

Comer 100g de chocolate aportan (Figura 2):

|                  |  |  |  |
|------------------|---|---|---|
| Aporte           | Negro   | Blanco  | Con leche   |
| Energía          | 520 kcal  | 566 kcal  | 534 kcal  |
| Grasas           | 6 g   | 33 g  | 31 g  |
| Grasas saturadas | 21 g  | 20 g  | 18 g  |
| Azúcares         | 42 g  | 56 g  | 54 g  |

Figura 2. Aporte que contienen 100g de chocolate SAGARPA-SIAP (2017).

Las empresas que desean atraer a los consumidores interesados en los beneficios para la salud del corazón, ahora tienen otra herramienta de mercadeo a su disposición: el porcentaje de cacao etiquetado en sus barras (Crawford, 2015).

El porcentaje etiquetado de sólidos de cacao que se muestra prominentemente en el frente de muchos paquetes de barras de chocolate negro, es directamente correlacionado con la cantidad de antioxidantes polifenol promotores de la salud. Además es una referencia para determinar qué tan saludable es una barra de chocolate negro sin voltear el paquete y analizar el nutriente (Crawford, 2015).

El chocolate más oscuro también podría ser más saludable que el chocolate con leche más dulce porque "promueve más saciedad, disminuye el deseo de comer algo dulce y suprime consumo de energía. Mientras que el chocolate negro puede proporcionar antioxidantes que promueven la salud del corazón, es más saludable que el chocolate con leche, ya que es alto en calorías, lo que puede conducir a un aumento de peso ganancia y otras preocupaciones de salud (Crawford, 2015).



El consumo regular de chocolate amargo se ha vinculado a un menor incidencia de infarto de miocardio y accidente cerebrovascular, y a una reducción general en mortalidad cardiovascular. Tales observaciones son consistentes con informes de que los productos de cacao reducen la presión arterial, mejoran respuestas vasodilatadoras dependientes del endotelio e inhibir agregación plaquetaria (Rull *et al.*, 2015).

Las acciones de cacao y chocolate negro han sido atribuidas principalmente al alto nivel de flavan-3-ols. Sin embargo, el contenido de flavanol de los productos de cacao es muy variable dependiendo de la cosecha, tratamiento de los granos de cacao, como la fermentación, el secado, etc; reducen el contenido total de flavanol (Rull *et al.*, 2015).

### 1.1.5 Producción Mundial de cacao

El cacao se cultiva principalmente en África del Oeste, América Central, Sudamérica y Asia. México se posiciona en el treceavo lugar a nivel mundial en producción de cacao.

A continuación se muestra la comparación de la evolución en ranking mundial de México en el sector cacaotero. Los datos de la Tabla 3, se publicaron un año después de los recabados. Los datos obtenidos publicados por el SIAP en 2017, son los datos obtenidos durante el año 2016 Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación-Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SAGARPA-SIAP, 2017).

**Tabla 3. Posicionamiento de México en el sector cacaotero a nivel mundial de 2012-2016 SAGARPA-SIAP (2017, 2016, 2015, 2014, 2013).**

| AÑO  | COSTA DE MARFIL   | MÉXICO   | FUENTE              |
|------|---|--|---------------------|
| 2016 | <p><b>1<sup>er</sup></b><br/>productor mundial</p>  <p><b>Costa de Marfil</b></p> <p><b>1,434,077 toneladas</b></p> <p>El cultivo de cacao se extiende en el territorio de 59 naciones. El líder productor cuenta con poco más de 2.7 millones de hectáreas de cacaoteros.</p> | <p><b>13<sup>o</sup></b><br/>productor mundial</p>  <p><b>México</b></p> <p><b>26,969 toneladas</b></p> <p>En el volumen mundial cosechado de cacao, México contribuye con seis de cada mil toneladas.</p> | SAGARPA-SIAP (2017) |



|      |   |  |                     |
|------|---|--|---------------------|
| 2015 | <p><b>1<sup>er</sup></b> <br/> <b>Costa de Marfil</b><br/> <b>1,448,992 toneladas</b><br/>                     En los plantíos cacaoteros del mundo se obtienen cerca de 4.6 millones de toneladas de cacao, una tercera parte la obtiene el principal productor del orbe.</p> | <p><b>8<sup>o</sup></b> <br/> <b>México</b><br/> <b>27,844 toneladas</b><br/>                     La extensión del cultivo mexicano es la décima más extensa entre los países con plantíos del fruto, la cosecha representa 1.8% de la total generada.</p> | SAGARPA-SIAP (2016) |
| 2014 | <p><b>1<sup>er</sup></b> <br/> <b>Costa de Marfil</b><br/> <b>1,448,992 toneladas</b><br/>                     Costa de Marfil aporta mundialmente 31% de cacao.</p>   | <p><b>8<sup>o</sup></b> <br/> <b>México</b><br/> <b>27,844 toneladas</b><br/>                     México contribuye con poco menos de 2% del cacao disponible en el mundo.</p>   | SAGARPA-SIAP (2015) |
| 2013 | <p><b>Costa de Marfil</b> <br/> <b>1<sup>er</sup> productor mundial</b><br/> <b>1,650,000 toneladas</b><br/>                     Una tercera parte de la oferta global de cacao se genera en Costa de Marfil.</p>  | <p><b>México</b> <br/> <b>8<sup>o</sup> productor mundial</b><br/> <b>27,619 toneladas</b><br/>                     Cerca de 2% de la producción mundial de cacao, se obtiene de nuestro país.</p>   | SAGARPA-SIAP (2014) |
| 2012 | <p><b>Costa de Marfil</b><br/> <b>1<sup>er</sup> productor mundial</b></p>  | <p><b>México</b><br/> <b>13<sup>o</sup> productor mundial</b></p>  | SAGARPA-SIAP (2013) |

### 1.1.6 Producción de cacao en México

Los datos recabados en 2016 señalan que la superficie de cacao se extiende en tres entidades localizadas en la parte sur de México, entre ellas Tabasco quien produce el 66.9% de la producción nacional, seguido por Chiapas que produce el 32.9% y Guerrero con el 0.2 % (Figura 3) SAGARPA-SIAP (2017).



Figura 3. Porcentaje del valor de la producción por entidad federativa SAGARPA-SIAP (2017).

El valor de la producción en 2016 registra un incremento de 1.5% con respecto al del año anterior, con una derrama económica de mil 51 millones de pesos (Figura 4) SAGARPA-SIAP (2017).



Figura 4. Volumen de la producción nacional 2007-2016 (Miles de toneladas) SAGARPA-SIAP (2017).



Cabe señalar que estadísticas del SIAP detallan que la producción de cacao en México se ubica en 26 mil 627 toneladas, principalmente en los estados de Tabasco y Chiapas, (Figura 5) SAGARPA-SIAP (2017).

| Rank | Entidad federativa    | Volumen (toneladas) | Variación (%) 2015-2016 |
|------|-----------------------|---------------------|-------------------------|
|      | <b>Total nacional</b> | <b>26,863</b>       | <b>-4.1</b>             |
| 1    | Tabasco               | 17,281              | -6.0                    |
| 2    | Chiapas               | 9,346               | -0.4                    |
| 3    | Guerrero              | 236                 | 4.4                     |

**Figura 5. Volumen de producción 2015-2016 por entidades productoras SAGARPA-SIAP (2017).**

El consumo de cacao es predominantemente de los chocolates, en México el consumo de cacao es de 0.5 kg por persona de los cuales el consumo de chocolates es apenas de 700 gramos por persona al año (Figura 6), derivado de mitos que se le atribuyen como generador de obesidad y sobrepeso, a pesar de su importancia gastronómica, económica, social y cultural SAGARPA-SIAP (2017).



**Figura 6. Consumo anual nacional per-cápita de cacao y chocolate en México SAGARPA-SIAP (2017).**

En 2015 Brasil tuvo una ingesta de 2kg de chocolate por habitante, Estados Unidos 10kg, mientras que países europeos como Francia, Bélgica y Suiza rebasan los 10kg de chocolate por habitante al año (González, 2015). Datos recabados en 2016 por el SIAP muestran que la ingesta de chocolate ha disminuido considerablemente en algunos países europeos así como también en Estados Unidos (Figura 7) SAGARPA-SIAP (2017).

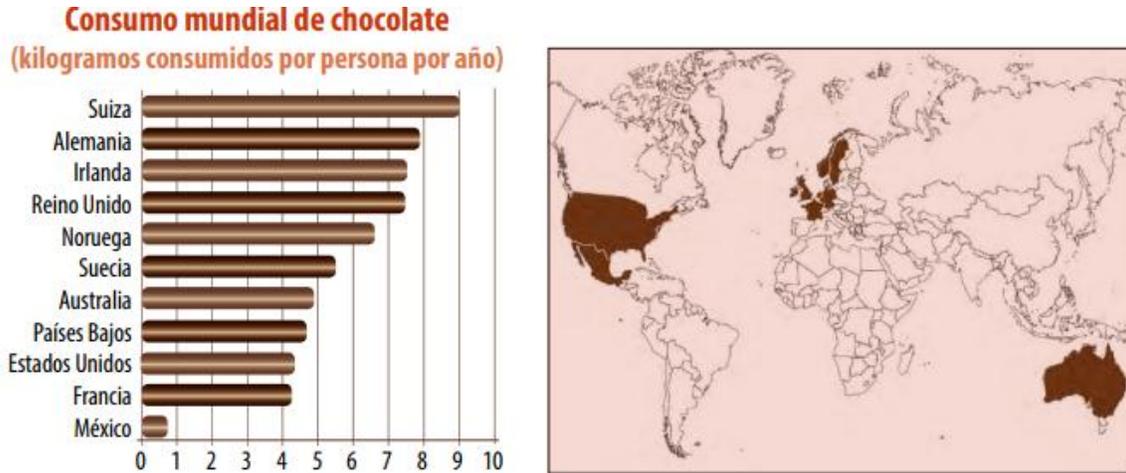


Figura 7. Consumo mundial per-cápita de chocolate SAGARPA-SIAP (2017).

La producción del cacao depende mucho de las estaciones del año. Casi todos los países productores tienen dos periodos de recolección: la cosecha principal y la intermedia SAGARPA-SIAP (2017).

En la Figura 8 podemos observar las notables variaciones durante el periodo 2015-2016, en el que hubo una disminución considerable en el porcentaje de volumen y en comparación con el obtenido en el periodo 2007-2016 que reporta la Tasa Media Anual de Crecimiento (TMAC), pero disminuyó considerablemente en la superficie destinada a la cosechada y la sembrada.

| Variaciones %    | Superficie         |             |           |                    |                   |                      |                    |
|------------------|--------------------|-------------|-----------|--------------------|-------------------|----------------------|--------------------|
|                  | Sembrada           | Siniestrada | Cosechada | Volumen            | Valor             | Rendimiento          | Precio Medio Rural |
|                  | Miles de hectáreas |             |           | Miles de toneladas | Millones de pesos | Toneladas / hectárea | Pesos / tonelada   |
|                  | 60                 | NA          | 59        | 27                 | 1,051             | 0.5                  | 39,111             |
| Annual 2015-2016 | -2.5               | NA          | -0.7      | -4.1               | 1.5               | -3.5                 | 5.9                |
| TMAC 2007-2016   | -0.2               | NA          | -0.4      | -1.2               | 8.4               | -0.8                 | 9.7                |

■ Aumenta    ■ Disminuye    ■ No aplica

Figura 8. Indicadores 2016 SAGARPA-SIAP (2017).



En la Figura 9 se muestra la producción mensual nacional de cacao. En el cual la cosecha mayor se obtiene en los trimestres de enero-marzo y octubre-diciembre. SAGARPA-SIAP (2017).



Figura 9. Producción mensual nacional (%) SAGARPA-SIAP (2017).

### 1.1.7 Importación y Exportación del cacao

El consumo nacional de cacao se satisface con volúmenes internos y con los adquiridos de otros países productores. Son cinco las naciones a las que México compra grano de cacao: Ecuador, Costa de Marfil, Republica Dominicana, Colombia y Ghana SAGARPA-SIAP (2017).

Estados Unidos es el principal país al que se le exportan el cacao producido, aunque también países europeos adquieren el grano mexicano (Figura 10).



Figura 10. Origen destino-comercial SAGARPA-SIAP (2017).



En la Figura 11 se puede observar como en el periodo de 2015-2016 hubo un aumento considerable en el ámbito de las exportaciones e importaciones viéndose reflejadas (Figura 12) en el volumen de exportación y el valor (millones de dólares) en comparación con años atrás SAGARPA-SIAP (2017).

|                               | Importaciones  | Exportaciones | Saldo Balanza   | Variación (%) 2015-2016 |               |
|-------------------------------|----------------|---------------|-----------------|-------------------------|---------------|
|                               |                |               |                 | Importaciones           | Exportaciones |
| <b>Volumen toneladas</b>      | <b>38,293</b>  | <b>169</b>    | <b>-38,124</b>  | <b>62.8</b>             | <b>21.0</b>   |
| <b>Valor miles de dólares</b> | <b>114,812</b> | <b>873</b>    | <b>-113,939</b> | <b>58.6</b>             | <b>77.7</b>   |

■ Aumenta

Figura 11. Comercio Exterior 2016 SAGARPA-SIAP (2017).



Figura 12. Evolución del comercio exterior (miles de dólares) SAGARPA-SIAP (2017).

A continuación se muestra la distribución mensual del comercio exterior en porcentaje de (importaciones y exportaciones) en el que se puede observar un aumento considerable en



la importación en el mes de diciembre con respecto a los otros meses y mayor exportación en el mes de marzo, reportada por el SIAP en el año 2016, (Figura 13).

|             | Ene | Feb | Mar  | Abr | May  | Jun | Jul  | Ago | Sep | Oct | Nov | Dic  |
|-------------|-----|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|
| Importación | 9.3 | 7.3 | 7.2  | 7.3 | 8.0  | 8.6 | 13.0 | 8.8 | 5.3 | 4.8 | 9.5 | 10.9 |
| Exportación | 4.8 | 8.6 | 49.1 | 3.8 | 12.7 | 0.3 | 8.9  | 4.4 | 5.8 | 0.5 | 0.2 | 0.9  |

Figura 13. Distribución mensual del comercio exterior (%) SAGARPA-SIAP (2017).

### 1.1.8 Enfermedades que atacan al cultivo

Las principales enfermedades que atacan el cultivo de cacao son las siguientes.

- Moniliasis o pudrición de la mazorca (*Moni rozeri*)

Esta enfermedad fue observada por primera vez en Ecuador, en 1916. Se extendió rápidamente por todo el país provocando daños considerables, y hoy la padecen Colombia, Perú y algunas regiones de Venezuela (Braudeau, 1970).

Síntomas:

Las mazorcas son infectadas cuando están jóvenes y la enfermedad se desarrolla internamente a medida que van creciendo los frutos. La primera indicación de su ataque es la aparición en la superficie de las mazorcas de manchas con coloración de madurez, sin otros síntomas externos. Esas manchas se vuelven de color pardo y después crecen bastante hasta cubrir toda la superficie del fruto. En condiciones favorables de tiempo, las manchas se cubren con una capa de micelio blanco, que tienen muchas esporas. Esas esporas pueden permanecer adheridas a la superficie de la mazorca durante mucho tiempo en forma de polvo blanco. Algunos frutos infectados pueden no mostrar síntomas externos, pero al abrirlos se encuentra en ellos líquido en abundancia, que resulta de la degeneración de los tejidos. Los síntomas de la mazorca se manifiestan dos meses después de la inoculación (Rimache, 2008).

- Mazorca negra (*Phytophthora palmivora*)

Esta enfermedad es la más antigua y la más importante de todas las del cacao. *Phytophthora palmivora* actúa prácticamente en todos los países donde se cultiva cacao (Braudeau, 1970). Las pérdidas globales que ocasiona son enormes y fueron estimadas en un 10% de la producción mundial, en Ghana se ha registrado una incidencia de mazorca negra del 25-30%, del 70-90% en Nigeria y de un 25% en Brasil (Rimache, 2008).



Síntomas:

En las mazorcas, el primer signo de infección se nota unos dos días después de que se ha iniciado, cuando aparece sobre la superficie del fruto una pequeña mancha translúcida. Pronto esa mancha toma un color pardo-chocolate y después se ennegrece y extiende con rapidez, de tal manera que toda la corteza de la mazorca puede quedar ennegrecida en unos catorce días. Tres días después de la infección inicial produce esporas en las áreas infectadas, formando una vellosidad blanca o amarillenta en la superficie de la mazorca que ya está tomando color negro. Internamente, los granos se infectan unos quince días después del inicio del ataque y pronto se vuelven sin valor comercial. Los chancros causados por *Phytophthora* pueden originarse por contacto directo con una mazorca enferma que se deje en el árbol o por extensión de una infección de estas, al ascender el hongo por el tallo e invadir el cojín floral y los tejidos circundantes. La corteza recién infectada no presenta síntomas externos, pero debajo de ella se encuentran manchas rojo-rosáceas (Rimache, 2008).

- Escoba de bruja (*Marasmius perniciosos*).

Esta enfermedad es originaria de Amazonia, se ha extendido a todos los países productores de América del Sur y a algunos de las islas Caribes (Trinidad, Tobago y Granada), no existe sin embargo en la región de Bahía, en Brasil, ni en el valle de Cauaca, Colombia (Braudeau, 1970).

Síntomas:

El síntoma más obvio de la enfermedad, que le da su nombre es la presencia de las ramas o escobas características, causadas por el desarrollo hipertrófico de una yema normal que se abre. Una escoba es mucho más gruesa que una rama sana y produce muchos brotes laterales con hojas poco desarrolladas y que muestra en forma típica entrenudos muy acortados. Al principio, las escobas son de color verde, pero después el tejido huésped muere y se vuelven de color pardo oscuro. Dichas escobas presentan la disposición de las hojas propia de la parte del árbol atacada y, por lo tanto, pueden observarse escobas tanto de las hojas de abanico como de los chupones (Rimache, 2008).

Existen otras enfermedades como lo son:

- Agalla del cojín (*Calonectria rigidiuscula*)
- Mal del machete (*Ceratocystis fimbriata*)
- Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*)
- La enfermedad rosada (*Corticium salmonicolor*), entre otras (Braudeau, 1970).



### 1.1.9 Productos derivados

El grano del cacao constituye la materia prima para la industria que fabrica (Braudeau, 1970).

- Productos semielaborados destinados a otras industrias:
  - Pasta de cacao, utilizada en chocolatería, repostería, pastelería.
  - Cacao en polvo, destinado a diversas industrias alimenticias de productos azucarados.
  - Manteca de cacao, utilizada en confitería, chocolatería, perfumería, farmacia, etc.
- Productos elaborados destinados directamente al consumo.
  - Chocolate en tabletas (para cocer, corriente, fundente, con leche, con avellanas o almendras picadas, etc).
  - Chocolate en polvo (soluble o no).
  - Confitura de chocolate.

Los subproductos de esta industria, tortas procedentes de la extracción de la manteca, cascarillas, materia grasa extraída de las cascarillas y gérmenes, pueden ser recuperados para la alimentación del ganado, la fabricación de fertilizantes, farmacia y la jabonería.

En Francia, los productos de chocolatería, fueron reglamentados en el decreto 1318 del 16 de noviembre de 1951. En los demás países consumidores, la reglamentación es bastante semejante a la francesa. En algunos países en especial en el Reino Unido e Irlanda, se admite el empleo de otras materias grasas en sustitución de la manteca de cacao para la fabricación de chocolate (Braudeau, 1970).

### 1.1.10 Normatividad aplicada en cacao

**NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-186-SSA1/SCFI-2013. Cacao, chocolate y productos similares, y derivados del cacao. Especificaciones sanitarias. Denominación comercial. Métodos de prueba.**

Esta Norma, tiene por objeto establecer las especificaciones sanitarias y comerciales que debe cumplir el cacao, el chocolate, los productos similares y los derivados del cacao. Asimismo, establece la denominación genérica y específica de dichos productos (NOM-186-SSA1/SCFI-2013).

**NMX-F-343-SCFI-2007 ALIMENTOS – MANTECA DE CACAO-ESPECIFICACIONES. (Cancela a la NMX-F-343-1983)**



Esta Norma Mexicana establece las especificaciones mínimas de calidad que debe de cumplir el producto “Manteca de Cacao”, para usarse en la fabricación de alimentos, en general, principalmente dulces y chocolates, que se produzcan o comercialicen en el territorio Nacional (NMX-F-343-SCFI-2007).

**NMX-FF-103-SCFI-2003 PRODUCTOS AGRÍCOLAS NO INDUSTRIALIZADOS - CACAO EN GRANO (*Theobroma cacao L*) – ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA (CANCELA A LAS NMX-F-129-S-1979; NMX-F-268-1976; NMX-F-272-1976; NMX-F-339-S-1979; NMX-F-352-S-1980 y NMX-412-S-1981)**

Esta norma mexicana (NMX) establece las especificaciones que debe cumplir el cacao en grano (*Theobroma cacao L.*) de la familia de las esterculiáceas, destinado para la elaboración de productos alimenticios y farmacéuticos, que se comercializa en la República Mexicana (NMX-FF-103-SCFI-2003).

## 1.2 Organismos genéticamente modificados (OGM)

La capacidad de transferir un gen de un organismo a otro emparentado o no, tuvo su origen en los descubrimientos de como 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.

El primero fue el descubrimiento de la descripción de las moléculas del ADN. Un gen es un segmento de ADN que induce a la célula a producir cierta proteína, desempeñar cierta función específica, o reproducirse así misma (Pengue, 2000).

El segundo descubrimiento fue en cierto tipo de ADN bacteriano asume la forma de anillos flotantes llamados plásmidos. Los plásmidos son intercambiados por las bacterias. Esta característica los hacia 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 plásmidos se atraen unos a otros, la aplicación de otra enzima denominada ligasa, une firmemente en su lugar el nuevo gen (Pengue, 2000).



### 1.2.1 Definición de Organismos Genéticamente modificados

Cualquier organismo vivo, con excepción de los seres humanos, que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través de uso de técnicas de la biotecnología moderna, tales como técnicas in vitro de ácido nucleico, incluidos el ADN (ácido desoxirribonucleico) recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u órganos; o la fusión de células más allá de la familia taxonómica, que superan las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o de la recombinación y que son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (Cofepris, 2013).

Los OGMs, también llamados transgénicos u OVMs (Organismos Vivos Modificados), han sido desarrollados como una alternativa de productos biológicos, a los que se les confieren características deseadas específicas tales como resistencia a insectos plagas (expresan la proteína Cry de la bacteria *Bacillus thuringiensis*) 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 Alimentos genéticamente modificados

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

1. Alimentos compuestos por o que contengan organismos vivientes/viables, por ejemplo maíz.
2. Alimentos derivados de o que contengan ingredientes derivados de OGM, por ejemplo harina, productos que contengan proteínas alimentarias o aceite de soja GM.
3. Alimentos que contengan un solo ingrediente o aditivo producido por microorganismos genéticamente modificado (MGM), por ejemplo colorantes, vitaminas y aminoácidos esenciales.
4. Alimentos que contengan ingredientes procesados por enzimas producidas mediante un MGM, por ejemplo, el jarabe de maíz de alta fructosa producido a partir del almidón, usando la enzima glucosa isomerasa (producto de un MGM) Organización Mundial de la Salud OMS (2005).



---

## RIESGO DE LOS ORGANISMOS Y ALIMENTOS GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA LA SALUD HUMANA Y EL MEDIO AMBIENTE

La introducción de un transgén en un organismo receptor no es precisamente un proceso controlado, y puede tener varios resultados con respecto a la integración, la expresión y la estabilidad del transgén en el huésped (OMS, 2005).

La Comisión del Codex Alimentarius (CAC, o Codex) adoptó los siguientes textos en julio de 2003: “Principios para el análisis de riesgos de alimentos derivados de la biotecnología moderna”; “Lineamientos para realizar la evaluación de inocuidad en alimentos derivados de plantas con ADN recombinante”; y “Pautas para realizar la evaluación de inocuidad de alimentos producidos usando microorganismos con ADN recombinante” (OMS, 2005).

Los principios de evaluación de inocuidad del Codex Alimentarius en 2003 para alimentos GM requieren investigar:

- a. Efectos directos sobre la salud (toxicidad);
- b. tendencia a causar reacciones alérgicas (alergenicidad);
- c. componentes específicos que podrían tener propiedades nutricionales o tóxicas;
- d. estabilidad del gen insertado;
- e. efectos nutricionales asociados con la modificación genética específica; y
- f. todo efecto no deseado que podría originar la inserción del gen.

### 1.2.3 Cacao transgénico

El cacao está de moda, y su demanda es cada vez mayor. Una situación inmejorable si no fuera porque las enfermedades fúngicas estén devastando los cultivos del cacao desde hace 15 años.

Los investigadores han desarrollado un sistema de transformación genética para el cacao, bajo el promotor de CaMV-35S por transformación mediada con *Agrobacterium*, examinando la función de un gen de quitinasa de cacao (TcChi1). Realizaron un ensayo donde vieron la actividad antifúngica del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, el ensayo demostró que las hojas de cacao transgénico TcChi1 inhibieron significativamente el crecimiento del hongo y el desarrollo de necrosis de la hoja. El análisis de plantas transgénicas proporciona una herramienta poderosa para estudios funcionales de genes de defensa en cacao (Maximova *et al.*, 2005).

Representantes de diez países y expertos internacionales (Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, así como de México, Panamá, Perú, República Dominicana y Trinidad y Tobago) participaron en el Primer Foro Regional de la Iniciativa Latinoamericana del Cacao (ILAC). Mencionando que una tonelada de cacao genéticamente modificado tiene un valor



promedio de 3,000 dólares (USD), a diferencia del cacao fino y de aroma nativo de América Latina que su valor llega a 10,000 USD la tonelada. Banco de Desarrollo de America Latina (CAF, 2016).

A pesar de ser un fruto mexicano, auténtico que da identidad nacional y que es símbolo de potencial comercial, el año pasado se importó el 63 por ciento de nuestras necesidades, lo que significa que “no somos autosuficientes, ni producimos el cacao que consumimos” (Patiño, 2017). El cacao que más se ocupa en México es importado de África, de Costa de Marfil o de República Dominicana (Villamil, 2016).

### 1.2.4 Promotores y Terminadores

La estructura de los genes en eucariotas es compleja. La secuencia de nucleótidos que constituye un gen, y los propios genes entre sí, no se disponen linealmente en los cromosomas sino espaciados por fragmentos de ADN que no poseen información que pueda ser transcrita. En todo gen, además, distinguiremos las siguientes regiones (Figura 14) (Sánchez, 2010).

- a) La región promotora o promotor (p)
- b) La región codificadora (c)
- c) La región terminadora o terminador (t)

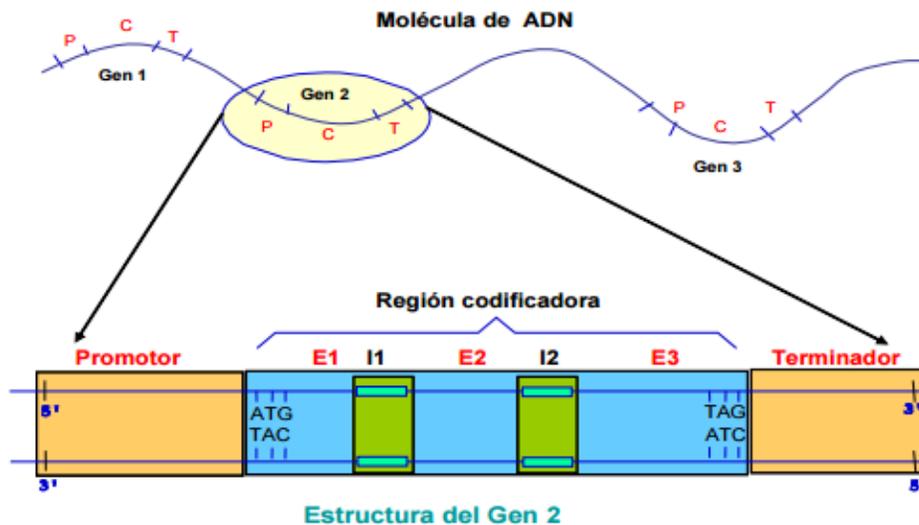


Figura 14. Estructura de un gen. p) región promotora; c) región codificadora; t) región terminadora-, e) exónes; i) intrones (Sánchez, 2010).



- a. La región promotora (Figura 14 p) es una porción del ADN situada al principio del gen y que, sin codificar ningún aminoácido, sirve para que las enzimas que realizan la transcripción reconozcan el principio del gen (Sánchez, 2010).
- b. La región codificadora (Figura 14 c) es la parte del gen que contiene la información para la síntesis de la proteína. En la región codificadora van a existir fragmentos de ADN que no contienen información: los intrones (Figura 14 i) y fragmentos que sí contienen información: los exones (Figura 14 e). Considerando la hebra 5'->3', el principio de esta región viene marcado por la secuencia de bases nitrogenadas ATG y el final por una de estas tres tripletas: TAA, TAG, TGA; tripletas que se denominan de paro, sin sentido o secuencias stop (Sánchez, 2010).
- c. La región terminadora (Figura 14 t) marca el final del gen (Sánchez, 2010).

Los OGM suelen contener un inserto o "cassette" de genes que consiste de un "promotor" (p), que controla la expresión del transgén, "la región de codificación", que define la secuencia de amino ácidos de un gen particular y un "terminador de expresión" (t) que funciona como una señal de parada para terminar la "lectura" de la gen durante la producción de proteínas (Karamollaoglu *et al.*, 2009).

Las construcciones vectoriales (vehículos) para la transformación de plantas contienen secuencias de ADN que están destinadas a ser insertadas en el organismo diana. Además de las secuencias, que pueden ser necesarias para la inserción de la construcción en el genoma de la planta tal como bordes de ADN T, una construcción vectorial incluye secuencias **promotoras** y **terminadoras** que permiten a la planta expresar el gen de interés (Holden *et al.*, 2009).

Los primeros promotores constitutivos usados para regular la expresión transgénica en plantas fueron aislados de patógenos vegetales, como los promotores de Opinas y el promotor CaMV (De Guglielmo *et al.*, 2016). El virus del mosaico de la coliflor (CaMV), es un virus de doble cadena de ADN que afecta a las plantas de las Crucíferas, Resedaceae y Solanaceae. El 35S promotor de CaMV es un funcional, bien caracterizado, y constitutivamente expresado promotor. Por lo tanto, se ha incorporado a numerosas construcciones y se ha utilizado para producir muchos de los cultivos transgénicos que se encuentran en producción comercial, como maíz, soja, canola y papaya (Holden *et al.*, 2009).

De forma similar, el sitio de poliadenilación de ARN (que indica el final de la transcripción) de la secuencia T-nos del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* ha servido como un sitio de poliadenilación en algunas de las mismas construcciones, por ello el número de eventos evaluados para conocer la presencia de transgenes se basan en la identificación de CaMV35S y T-NOS como promotor y terminador respectivamente, ya sea que contengan alguno de ellos o incluso los dos (Holden *et al.*, 2009).



### 1.2.5 Transgenes de importancia agronómica

Las plantas transgénicas inicialmente se crearon como modelos para explicar los circuitos de regulación genética y se probó la expresión de diversos tipos de genes en ellas.

El ejemplo más conocido es una planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*), que expresa el gen de la luciferasa de las luciérnagas, dando como resultado una planta luminiscente. Estos sistemas transgénicos ayudaron a dilucidar los sistemas de regulación de la expresión génica en eucariotas, este hecho abrió las puertas a la elaboración de plantas transgénicas, tanto con fin de aplicarlas a la agricultura, como al comercio y medicina.

Posteriormente se dedicaron los esfuerzos, al aislamiento y caracterización, de genes de diferentes fuentes biológicas, para determinados fines agronómicos. Los primeros trabajos en el campo radicó, en el aislamiento de los genes de las proteínas Cry de *Bacillus thuringensis*, una bacteria entomopatógena, y son usadas en las plantas transgénicas como un bioinsecticida, llamado convencionalmente Bt; también se trabajó en la construcción de genes que confieran a las plantas resistencia a herbicidas.

El principal trabajo, en lo que a resistencia a herbicidas se refiere, se hizo con el glifosfato, aunque también se trabajaron otros herbicidas como el glufosinato. Las plantas con la tecnología RoundupReady (RR) de Monsanto son resistentes al glifosfato de la misma empresa, denominado Roundup y sus variedades mejoradas. La resistencia a Roundup está dada por la expresión de una proteína bacteriana necesaria para la síntesis de enzimas fotosintéticas, la proteína de origen celular es inhibida por el herbicida, pero no la de origen bacteriano. En la actualidad, las nuevas ofertas de Monsanto muestran plantas de maíz, algodón y soya que poseen ambas características: la resistencia a insectos y la tolerancia a herbicidas (Trinidad, 2008).

Otras empresas han generado plantas similares y con otras características, como el tomate "Flavr-Savr de Calgene, el cual no se ablanda y puede ser almacenado por mucho tiempo, se logró mediante la tecnología de ARN antisentido, la cual inhibe la proteína responsable de la senescencia del fruto maduro.

Uno de los avances más impresionantes de la biotecnología vegetal ha sido la posibilidad de expresar vacunas contra una amplia variedad de enfermedades en las plantas. Hoy, la ingeniería genética se suma a las prácticas convencionales como una herramienta más para mejorar o modificar los cultivos vegetales (Trinidad, 2008).



### **1.2.6 Resistencia a enfermedades bacterianas**

Se piensa que control de enfermedades virales será el campo donde la ingeniería genética de plantas puede tener su mayor impacto. Ya que los virus son considerados entidades no celulares compuestos de ácidos nucleicos y proteínas, representan a los agentes fitopatogénicos más devastadores que se conocen.

El uso de genes virales y su introducción en plantas ha permitido el desarrollo de resistencia, lo cual se conoce como resistencia derivada del patógeno, donde la planta reconoce un exceso en la expresión de los genes virales introducidos y evita su expresión, impidiendo, además, la infección por el virus de la cepa utilizada y cepas relacionadas (Muñoz, 2004).

Usando el gen que codifica la cápside, se obtuvieron en 1986 las primeras plantas de tabaco resistentes al virus del mosaico del tabaco. Utilizando una estrategia similar se obtuvieron plantas de calabacita amarilla y de sandía resistentes a virus. La papaya ha sido severamente atacada por el virus de la mancha anular, donde fue necesario transformar plantas con el gen que codifica para la proteína de la cápside de este virus, a partir de 1994 se obtuvieron plantas resistentes al virus y ha sido posible mantener cultivos redituables de papaya como en Hawai (Muñoz, 2004).

### **1.2.7 Tolerancia a factores abióticos**

Otro factor negativo sobre los cultivos son las condiciones ambientales adversas, que provocan fuertes situaciones de estrés sobre las plantas disminuyendo su productividad o matándolas. Para ello, se han aislado genes de organismos resistentes a determinadas condiciones ambientales extremas, como son las elevadas o bajas temperaturas, condiciones de salinidad extremas o de pH bajo 5 o sobre 9.

Estos genes de resistencia a factores extremos normalmente se han tomado de arqueobacterias, que son los organismos mejor adaptados a estas circunstancias, aunque también se han tomado genes de animales y plantas para este efecto.

Uno de los avances más llamativos en este sentido es la producción de plantas de tabaco y nabo portadoras de un gen humano que les confiere la resistencia a ciertos metales pesados, por medio de una proteína de asimilación de éstos metales, pasándolos a formas menos tóxicas dentro del organismo. La principal ventaja que tiene esta reducción del estrés ambiental, es la potencialidad de uso de hábitats marginales para cultivos (Trinidad, 2008).



### 1.2.8 Otras aplicaciones

- **Resistencia a insectos.** La introducción de genes Bt en las plantas hace que éstas sean "naturalmente" resistentes a las principales plagas que atacan los cultivos y producen grandes pérdidas en la producción. La ventaja de las proteínas tóxicas Bt (provenientes de los genes cry) es que atacan solamente a ciertos grupos sensibles a ellas y no afectan al resto de la entomofauna relacionada a las plantas del cultivo. Otros beneficios se derivarían de la disminución del uso de plaguicidas químicos al disponer de cultivos que no requieran estas sustancias para detener las plagas (Trinidad, 2008).
- **Resistencia a herbicidas.** La construcción de plantas resistentes al efecto de los herbicidas, posibilita eliminar con facilidad las malezas que crecen en los campos de cultivo. La selectividad de resistencia hace que sea posible aplicar el herbicida a todo el campo de cultivo y matar a las malezas pero no a las plantas de interés económico (Trinidad, 2008).
- **Mejora de la productividad y producción.** Uno de los puntos más importantes en la construcción de transgénicos es el aumento de productividad y producción, es decir, el aumento de calidad y cantidad del producto final. Uno de los desafíos más grandes del mundo actual es dar de comer a la población mundial con la misma cantidad de tierras productivas, y para ello se necesitan variedades que den mayor cantidad de producto (Trinidad, 2008).
- **Mejora de la calidad nutritiva.** Uno de los ejemplos más representativos de ellos es el arroz dorado (golden rice, por su color) que es rico en vitamina A, la cual ayuda a evitar la ceguera en medio millón de niños por año en el mundo. La expresión de ciertos nutrientes que no estaban presentes antes en determinados cultivos es una buena opción para combatir la desnutrición en poblaciones con acceso restringido a muchos alimentos, y que por tal razón tienen una dieta incompleta y deficiente. Los principales campos de acción de esta área son el aumento de ácidos grasos, de proteínas y de micronutrientes (Trinidad, 2008).
- **Control de enfermedades virales.** Las enfermedades virales son causa de pérdidas masivas del cultivo cada año. Los grupos de virus que infectan las principales plantas son variados, los más conocidos son los virus mosaico. Los virus producen enfermedades mortales en las plantas y son capaces de acabar con cultivos enteros puesto que el contagio mediante insectos (u otros vectores) propaga rápidamente la enfermedad y produce un deterioro permanente de los cultivos. Se han diseñado plantas transgénicas resistentes a diferentes enfermedades virales, el principio de la resistencia a enfermedades virales es la expresión de proteínas del mismo virus, que compitan con las partículas virales infecciosas e interrumpan



los procesos de entrada a las células y de replicación. También se han diseñado plantas transgénicas que expresan proteínas capaces de interferir con los circuitos de regulación génica de los virus, inhibiendo la replicación del genoma viral y la síntesis de proteínas virales imprescindibles, mediante ARN antisentido (Trinidad, 2008).

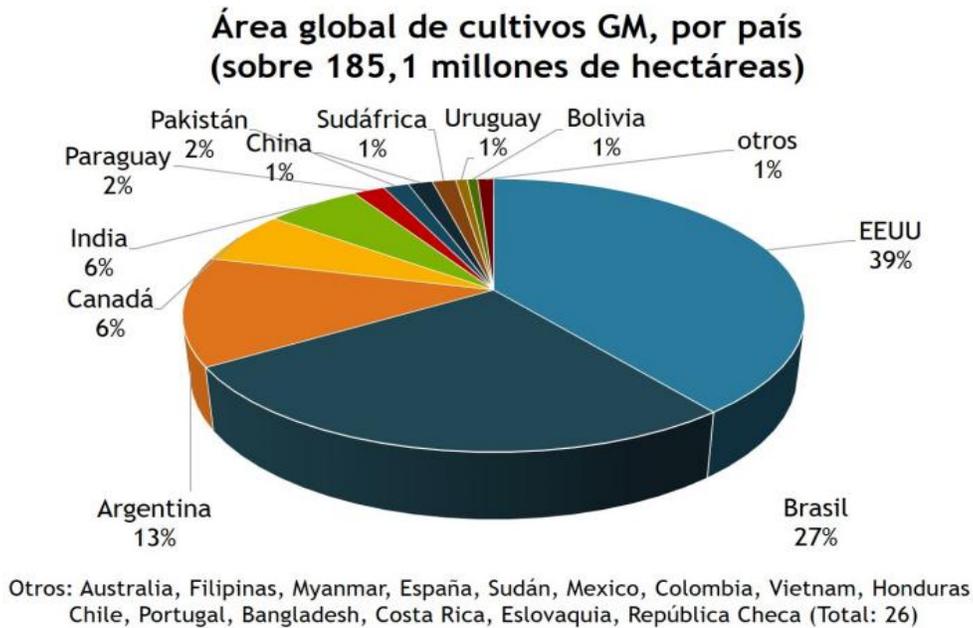
- **Producción de frutos más resistentes.** El primer transgénico que salió al mercado fue el tomate "Flavr-Savr" de Calgene, el cual posee un gen artificial que genera un ARN de antisentido que inhibe la producción de la proteína responsable de la senescencia del fruto. Esta tecnología permite almacenar y tener más tiempo de exposición al ambiente de muchos frutos sin que se ablanden y se malogren (Trinidad, 2008).
- **Producción de plantas bioreactoras.** La posibilidad de inserción de genes en plantas, es tan amplia, que permite actualmente, generar nuevas plantas que funcionen como bioreactores para descontaminación y reciclaje de productos (Trinidad, 2008).
- **Fijación de nitrógeno.** Se han creado plantas transgénicas con amplio espectro de asimilación de *Rhizobium* sp., una bacteria fijadora de nitrógeno. Estas bacterias normalmente hacen simbiosis solamente con las leguminosas, pero las nuevas tendencias en biotecnología vegetal han logrado ampliar el espectro de huésped a otras plantas (Trinidad, 2008).
- **Mejora con fines ornamentales.** Algunas plantas de importancia ornamental han sido modificadas para mejorar sus características estéticas, en especial el color de las flores y de esta manera hacerlas más atractivas al consumidor, por medio de la manipulación de pigmentos se han logrado colores de flores inexistentes en la naturaleza (Trinidad, 2008).

### 1.2.9 Situación actual de Organismos Genéticamente Modificados

El Servicio Internacional de Adquisición de Aplicaciones de Agrobiotecnología (ISAAA por su sigla en inglés) dio a conocer el "Estado mundial de los cultivos transgénicos/genéticamente modificados (GM) comercializados en 2016", notificando que la adopción de cultivos GM aumentó unas 110 veces a nivel global en tan sólo 21 años de comercialización, desde las primeras 1,7 millones de hectáreas en 1996 a las 185,1 millones de hectáreas en 2016 (Figura 15) (ISAAA, 2017).



De las hectáreas sembradas con cultivos GM en 2016 participaron 18 millones de agricultores de 26 países, esta superficie representa un aumento neto de 3% respecto de las 179,7 millones de hectáreas sembradas con OGM a nivel global en 2015, Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología (ArgenBio, 2017).



**Figura 15. Área global de cultivos GM, por país (sobre 185,1 millones de hectáreas) ISAAA (2017).**

Otros aspectos destacables del informe de ISAAA de 2016:

- Total de 26 países, entre los cuales se encuentran 19 países en desarrollo y 7 países industrializados, cultivaron transgénicos en 2016. Los países en desarrollo fueron responsables del 54 % de los cultivos GM mientras que los países industrializados representaron el 46 % (Figura 16).



**Figura 16. Porcentaje sembrado en Latinoamérica, Asia y África en 2016 ISAAA (2017).**

- 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.
- En 2016, los principales países con cultivos GM continuaron siendo Estados Unidos, Brasil, Argentina, Canadá e India. Estos países combinados representaron el 91 % de la superficie mundial con cultivos GM. De los cinco principales países tres son países en desarrollo (Brasil, Argentina e India) y dos son industriales (Estados Unidos y Canadá) (Figura 17)
- Diez países en América Latina cultivaron un total de 80 millones de hectáreas de cultivos transgénicos (Figura 17).
- Estados Unidos lidera la siembra de cultivos biotecnológicos en 2016 con 72,9 millones de hectáreas, seguido de Brasil (49,1 millones de hectáreas), Argentina (23,8 millones de hectáreas), Canadá (11,6 millones de hectáreas) e India (10,8 millones de hectáreas) para un total de 168.2 millones de hectáreas, el 91% de la superficie total mundial ISAAA (2017).
- Cuatro países en Europa-- España, Portugal, República Checa y Eslovaquia – sumaron más de 136.000 hectáreas de maíz transgénico, lo cual representó un aumento del 17 % con respecto a 2015 y mostró la necesidad que tienen los países europeos de contar con maíz resistente a los insectos.
- Si se tiene en cuenta la superficie mundial de cada cultivo, el 78 % de la soja, el 64 % del algodón, el 26 % del maíz y el 24 % de la canola fueron transgénicos.



Figura 17. Dieciocho países mega-productores, con 50.000 hectáreas o más de cultivos biotecnológicos o GM ISAAA (2017).

- A continuación se muestran los cultivos genéticamente disponibles a nivel mundial (Figura 18).



| Tecnologías/<br>Modificaciones genéticas   | Ventajas / Atributos Conferidos                                      | Cultivos                                   |
|--|--|--|
|  -Controlar el desarrollo.                        | -Maduración Retardada/ Mayor vida de anaquel.                        | -Jitomate.                                 |
|  -Producir bioinsecticidas mejorados (Bt).        | -Protección a insectos plaga/ Protección del rendimiento.            | -Maíz, soya, algodón, berenjena.           |
|  -Sintetizar enzimas que degradan agroquímicos.   | -Tolerancia a herbicidas/ Control de malezas.                        | -Maíz, soya, algodón, canola.              |
|  -Sintetizar moléculas de interferencia (ARNi).   | -Resistencia a virus, bloqueo al oscurecimiento de productos.        | -Calabaza, papaya, frijol, manzana y papa. |
|  -Controlar el metabolismo.                       | -Mejor balance de ácidos grasos, cocción saludable.                  | -Soya, canola, papa, alfalfa y maíz        |
|  -Regular algunos genes anti-estres.              | -Tolerancia a sequía, calor, frío, suelos ácidos o salinos.          | -Maíz, caña de azúcar.                     |
|  -Expresar nuevas enzimas y procesos bioquímicos. | -Biofortificación de vitaminas, hierro; aprovechamiento de fosfitos. | -Arroz, maíz, sorgo, camote, plátano.      |
|  -Sintetizar defensas anti-microbianas.           | -Resistencia a enfermedades por hongos o bacterias.                  | -Frijol, cítricos.                         |

Figura 18. Cultivos genéticamente modificados disponibles a nivel global Agrobioméxico (2016 b).

Los cultivos biotecnológicos contribuyeron a la seguridad alimentaria, la sustentabilidad y el cambio climático, ya que permitieron:

- Aumentar la productividad de los cultivos en 574 millones de toneladas valuadas en 167,8 mil millones de dólares en el período 1996-2015, y 75 millones de toneladas valuadas en 15,4 mil millones de dólares solo en 2015.
- Conservar la biodiversidad en el período 1996-2015 con el ahorro de 174 millones de hectáreas, y de 19,4 millones de hectáreas en 2015 solamente.
- Proporcionar un mejor medio ambiente – ahorrando en el uso de 620 millones de kg de principios activos de plaguicidas en el período 1996-2015, y de 37,4 millones de kg solo en 2015; – reduciendo las aplicaciones de plaguicidas, con un ahorro del 8,1% en el período 1996- 2015, y de 6,1% solo en 2015; – también se redujo el CEA (Coeficiente de Impacto Ambiental) un 19% en el período 1996-2015, y un 18,4% solo en 2015.
- Reducir las emisiones de CO<sub>2</sub> en 2015 en 26,7 mil millones de kg, lo cual equivale a sacar de circulación a 11,9 millones de automóviles durante un año.



- Contribuir a mitigar la pobreza ayudando a 18 millones de pequeños agricultores que, con sus familias, totalizan >65 millones de personas, algunas de ellas, las más pobres del mundo ISAAA (2017).

ISAAA considera que a medida que se aprueben y se comercialicen más variedades GM, el porcentaje de adopción irá en aumento y beneficiará a los agricultores de los países en desarrollo. Por ejemplo, se están comenzando a ver avances en los países africanos, como Sudáfrica y Sudán, donde la adopción va en aumento. En el resto del continente está surgiendo una nueva ola de aceptación para una amplia variedad de cultivos GM que se están desarrollando en Kenia, Malawi, Nigeria, Etiopía, Ghana, Nigeria, Suazilandia y Uganda ISAAA (2017).

### 1.2.10 Legislación en México

La diversidad y utilidad de las aplicaciones de la biotecnología moderna, en particular de los cultivos genéticamente modificados (GM), promovieron la creación de un marco legal que permitiera su manejo seguro y responsable para un aprovechamiento sustentable de los mismos como se muestra en la Figura 19 (Agrobioméxico, 2016 a).

| DESARROLLO DEL MARCO LEGAL DE LOS OGMs EN MÉXICO                                |  |  |  |
|---|--|--|--|
| 1986  | 1996   | 2003   | 2005   |
| Inicio de la investigación con plantas genéticamente modificadas (GM) en México | Etapas experimentales de algodón y soya GM en México   | Entrada en vigor del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología  | Publicación de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) y entrada en vigor |
| 2008  | 2009   | 2011-2012  | 2014   |
| Publicación del Reglamento de la LBOGM y entrada en vigor                       | Publicación del Régimen de Protección Especial del Maíz. Solicitudes y permisos para siembra experimental de maíz y entrada en vigor | Solicitudes y permisos para siembra de maíz en programa piloto y Acuerdo de Centros de Origen y Diversidad Genética del Maíz | Normas Oficiales Mexicanas de reporte de resultados y etiquetado de semillas GM                          |

Figura 19. Desarrollo del marco legal de los OGMs en México Agrobioméxico (2016 a).

El marco legal está conformado por cuatro instrumentos básicos:

1. Protocolo de Bioseguridad (Protocolo de Cartagena)
2. Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM)
3. Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (RLBOGM)



4. Régimen de Protección Especial del Maíz Agrobioméxico (2016 a).



Figura 20. Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM).

**1. Protocolo de Bioseguridad (Protocolo de Cartagena)**

Objetivo: Contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización seguras de los organismos vivos modificados resultantes de la biotecnología moderna que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana, y centrándose concretamente en los movimientos transfronterizos, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, 2000).

**2. Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM)**

Para cumplir su objeto, este ordenamiento tiene como finalidades (Figura 20).



- Garantizar un nivel adecuado y eficiente de protección de la salud humana, del medio ambiente y la diversidad biológica y de la sanidad animal, vegetal y acuícola, respecto de los efectos adversos que pudiera causarles la realización de actividades con organismos genéticamente modificados (Art. 2, fracc. I) (CIBIOGEM, 2005).
- Definir los objetivos, actividades y responsables a nivel nacional, para el manejo y aprovechamiento adecuados de OGM –bioseguridad- (Art. 2, fracc. II) (CIBIOGEM, 2005).
- Establecer mecanismos para la participación pública en aspectos de bioseguridad materia de esta Ley, incluyendo el acceso a la información, la participación de los sectores privado, social y productivo a través del Consejo Consultivo Mixto de la CIBIOGEM, y la consulta pública sobre solicitudes de liberación de OGMs al ambiente (Art. 2, fracc. XIV).
- Establecer instrumentos de fomento a la investigación científica y tecnológica en bioseguridad y biotecnología (Art. 2, fracc. XV) (CIBIOGEM, 2005).

En México, la Ley de Bioseguridad no exige el etiquetado de los alimentos, pero se requiere el etiquetado de las semillas para la siembra. El etiquetado de información debe incluir el hecho de que las semillas de siembra están genéticamente modificadas, las características de la combinación genética adquirida, implicaciones con respecto a las condiciones especiales y las necesidades de crecimiento, y cambios en las características productivas y reproductivas. En el caso de eventos apilados, no se requiere de revisiones o aprobaciones adicionales para una planta que combina dos o más rasgos transgénicos ya aprobados (Gutiérrez *et al.*, 2015). Para ello se ayuda de:

**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 salud, a la sanidad animal, vegetal y acuícola (NOM-164-SEMARNAT/SAGARPA,2013).

**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 y producción agrícola (NOM-001-SAG/BIO, 2014).

### **3. Reglamento de la Ley de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados**

Objeto:

–Contribuir al cumplimiento de las disposiciones de la LBOGM, estableciendo los procedimientos a seguir y requisitos a cumplir, para la obtención de permisos y autorizaciones (Arts. 1 al 32) Agrobioméxico (2016 a).



– Contiene el Régimen de Protección Especial del Maíz: SAGARPA y SEMARNAT expedirán (Arts. 5 a 32) las disposiciones jurídicas relativas a bioseguridad necesarias para resolver las solicitudes de permisos de liberación de maíz (Arts. 65 a 73) Agrobioméxico (2016 a).

#### 4. Régimen de Protección Especial del Maíz

Objeto:

– Establecer las disposiciones jurídicas relativas a la bioseguridad necesarias para resolver las solicitudes de liberación de maíces GM: prevención, monitoreo, inspección, vigilancia y medidas de control Agrobioméxico (2016 a).

– No permitir la experimentación ni la liberación al ambiente de maíces GM que contengan características que impidan o limiten su uso o consumo humano o animal, o bien su uso en procesamiento de alimentos para consumo humano (Art. 67) Agrobioméxico (2016 a).

– La SAGARPA y la SEMARNAT deberán promover la conservación de los maíces mexicanos nativos y de especies relacionadas como los “teocintles”, en sus regiones de origen y de mayor diversidad; a través de los programas de subsidio u otros mecanismos de fomento para la conservación de la biodiversidad, sin que ello implique autorización alguna para el cambio del uso de suelo de forestal a agrícola (Art. 70) Agrobioméxico (2016 a).

### AUTORIDADES COMPETENTES EN MÉXICO PARA LA APLICACIÓN DEL MARCO LEGAL O REGULADORIO DE OGM

En la Figura 21 y 22 se muestran las autoridades que participan dentro del marco regulatorio de OGM.

|  |   |
|--|---|
|  | <p><b>SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN.</b></p> <p>Analiza las solicitudes para evaluar posibles riesgos a la sanidad vegetal y, si aplica, expide permisos de liberación al ambiente de organismos genéticamente modificados (OGM), e impone las medidas de bioseguridad que considere necesarias. (Art. 12 y 13).</p> |
|  | <p><b>SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES.</b></p> <p>Analiza las solicitudes para evaluar posibles riesgos al</p>  |



|  |   |
|--|---|
|  | ambiente y a la diversidad biológica. También impone medidas de bioseguridad en los permisos de liberación de OGM (Art. 11 y 15 LBOGM).   |
|  | <p><b>SECRETARÍA DE SALUD.</b><br/>                 Evalúa la inocuidad y expide autorizaciones de OGM: para uso o consumo humano directo, incluyendo granos; así como los destinados al procesamiento de alimentos para consumo humano. También se consideran OGM para uso o consumo humano, aquellos que sean para consumo animal y que puedan ser consumidos directamente por el ser humano. (Art. 16)</p> |
|  | <p><b>SECRETARÍA DE HACIENDA Y CRÉDITO PÚBLICO.</b><br/>                 Revisa en aduanas que los OGM cuenten con los permisos o autorizaciones correspondientes para ingresar al país. De no ser así impide su entrada. (Art. 18)</p>   |
|  | <p><b>SECRETARÍA DE ECONOMÍA.</b><br/>                 Participa en la expedición de NOMs sobre OGM en términos de esta Ley: etiquetado, identificación, entre otros. (Arts. 101 y 102)</p>   |
|  | <p><b>SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA.</b><br/>                 Constituye el eje fundamental del desarrollo científico y tecnológico. (Art. 19, fracc. I)</p>  |
|  | <p><b>CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA.</b><br/>                 Fomenta, apoya y fortalece la investigación científica y tecnológica en materia de bioseguridad y de biotecnología en los términos de la LBOGM, y de la Ley de Ciencia y Tecnología. (Arts. 28 a 31)</p>   |

Figura 21. Autoridades competentes para la aplicación del marco legal o regulatorio en México Agrobioméxico (2016 a).



Otras instancias involucradas

|                        |   |
|------------------------|---|
| <p><b>CIBIOGEM</b></p> | <p><b>COMISIÓN INTERSECRETARIAL DE BIOSEGURIDAD DE LOS ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS.</b><br/>                 Es la instancia coordinadora de las seis secretarías mencionadas se encarga de establecer las políticas relativas a la seguridad de la biotecnología respecto al uso de los organismos genéticamente modificados. (Art. 19)</p> |
|------------------------|---|

Figura 22. Autoridad involucrada para la aplicación del marco legal o regulatorio en México Agrobioméxico (2016 a).

Del año de 1988 a 2005 se aprobaron 344 ensayos de OGMs autorizados en México en 26 organismos conforme a la Ley Federal de Sanidad Vegetal (LFSV) (CONACYT, 2017d), tomate, papa, calabaza, maíz, tabaco, trigo, arroz, algodón, calabacita, soya, alfalfa, canola, melón, Bt modificado genéticamente, jitomate, microorganismos, chile, papaya, piña, plátano, clavel, limón, lino, *Rhizobium etli*, *Arabidopsis*, cártamo (CONACYT, 2017a).

Se ha permitido la liberación al ambiente de cultivos como algodón, trigo, soya y maíz en sus diferentes tipos de solicitudes. De 2005 a 2017 existieron en México un total de 620 permisos de liberación al ambiente de Organismos Genéticamente Modificados, de los cuales 475 fueron de solicitud experimental, 128 de solicitud piloto y 17 de solicitud comercial (CONACYT, 2017c). En la Figura 23 se presentan los permisos de liberación al ambiente de OGMs en México de 2005 a 2017, por cultivo, conforme a la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) por cultivo (CONACYT, 2017b).



Figura 23. Porcentaje de permisos de liberación por cultivo (2005-2017).



### **1.2.11 Legislación Mundial**

#### **Marco Regulatorio Internacional**

A continuación se despliegan los instrumentos legales que están relacionados al uso de OGM's a nivel mundial de los que derivan diversas leyes y normas que rigen los aspectos regulatorios sobre la tecnología.

#### **Convenio sobre la Diversidad Biológica**

Los objetivos del convenio, son la conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos, mediante un acceso adecuado a esos recursos, una transferencia apropiada de las tecnologías pertinentes, entre otros; teniendo en cuenta todos los derechos sobre esos recursos y a esas tecnologías, así como mediante una financiación apropiada Agrobioméxico (2016 c).

#### **Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología del convenio sobre diversidad biológica**

“El Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología, deriva del Convenio sobre la Diversidad Biológica. Su objeto es contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización seguras de los organismos vivos modificados resultantes de la biotecnología moderna que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana, y centrándose concretamente en los movimientos transfronterizos. Es el primer instrumento internacional especializado en organismos genéticamente modificados. Entró en vigor en el año 2003. México lo ha firmado y ratificado, por lo que formalmente es Parte del Protocolo.” Agrobioméxico (2016 c).

#### **Protocolo de Nagoya – Kuala Lumpur**

El objetivo de este Protocolo Suplementario es contribuir a la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana, proporcionando normas y procedimientos internacionales en la esfera de la responsabilidad y compensación en relación con los organismos vivos modificados humanidad, particularmente en cuanto a satisfacer necesidades críticas de alimentación, agricultura y cuidados sanitarios Agrobioméxico (2016 c).



## 1.3 Técnicas biotecnológicas para la identificación de transgenes

Los métodos de detección (cualitativos o cuantitativos) de los organismos genéticamente modificados (OGM) se basan, fundamentalmente, en la determinación de las modificaciones introducidas en el ácido desoxirribonucleico (ADN), así como en la detección de las nuevas proteínas secretadas en el organismo genéticamente modificado y que son los productos de la transgénesis (Núñez, 2011).

### 1.3.1 Técnicas basadas en el análisis de proteínas

#### ELISA

El ensayo de inmunodetección ligado a enzimas (reconocido por sus siglas en inglés **ELISA**) se ha convertido en el método por excelencia utilizado para la determinación de la presencia de un OGM a partir de la proteína transgénica expresada. El método ELISA se basa en el uso de anticuerpos o antígenos específicos marcados con una enzima para la detección de la proteína de interés presente en la muestra de análisis, y se caracteriza por su alta sensibilidad, y por la posibilidad de discriminar entre cientos de proteínas presentes en la muestra, lo que lo convierte en un método extremadamente sensible y versátil (Núñez, 2011).

Los anticuerpos son los reactivos claves en un ELISA, y son proteínas solubles expresadas por el sistema inmunitario en respuesta a una infección provocada por una sustancia extraña (que es denominada “antígeno”). En el caso particular de los OGMs, el antígeno es la nueva proteína expresada producto del nuevo gen introducido (Núñez, 2011).

El método ELISA, al ser menos sensible que la PCR, hace que sea más difícil que aparezcan resultados falsos positivos, debido a los bajos niveles de contaminación. Sin embargo, no debe asarse por alto las desventajas del ELISA; requieren de elevados costos iniciales para la obtención de los anticuerpos y los patrones de proteínas, y no pueden discriminar entre diferentes modos y modelos de expresión de varios productos transgénicos que pueden resultar en proteínas similares (Núñez, 2011).

#### WESTERN BIOT

El Western Biot (o también llamado *immunoblot*) es una técnica analítica usada para detectar las proteínas específicas en una mezcla completa de proteínas, tales como un extracto tisular. Mediante una electroforesis en gel, las proteínas se separan mediante la aplicación de corriente eléctrica a la mezcla de proteínas por un periodo de tiempo, hasta que las proteínas migren y se separen en base a su tamaño. Posteriormente son transferidas a una membrana adsorbente típicamente de nitrocelulosa o de



polivinildifluoruro (PVDF). Las proteínas transferidas e inmovilizadas sobre el soporte se incuban con anticuerpos específicos marcados, que permiten su visualización. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto, y analizar su cantidad relativa respecto a otras moléculas similares. El “Western Blot” es una técnica semicuantitativa, pero altamente específica, y capaz de determinar si la presencia de OGM se encuentra entre los niveles previamente establecidos para su identificación y etiquetado (Núñez, 2011).

Una desventaja que presenta la técnica consiste en su eficacia en la detección de proteínas insolubles, lo que genera una ventaja adicional en la identificación de especies. Los ensayos por Western Blot se realizan a condiciones desnaturalizantes, es decir, condiciones que provocan la ruptura de los enlaces que mantienen la estructura de la proteína, con el fin de evitar estos problemas (López *et al.*, 2003).

### **1.3.2 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. 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 *et al.*, 2013).

### **1.3.3 Componentes de la PCR**

Para realizar una PCR se necesita mezclar en un tubo el ADN que contiene la secuencia a amplificar, ambos cebadores que se alinearán a las cadenas simples del ADN, la mezcla de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatados (dNTPs) en cantidades suficientes, el tampón de reacción para la polimerasa, agua ultrapura para completar el volumen final de reacción (que normalmente oscila entre 20 y 100µl), y como ingrediente final crucial para la reacción, la enzima ADN polimerasa termoestable (Figura 24) (Rodríguez y Barrera, 2004).

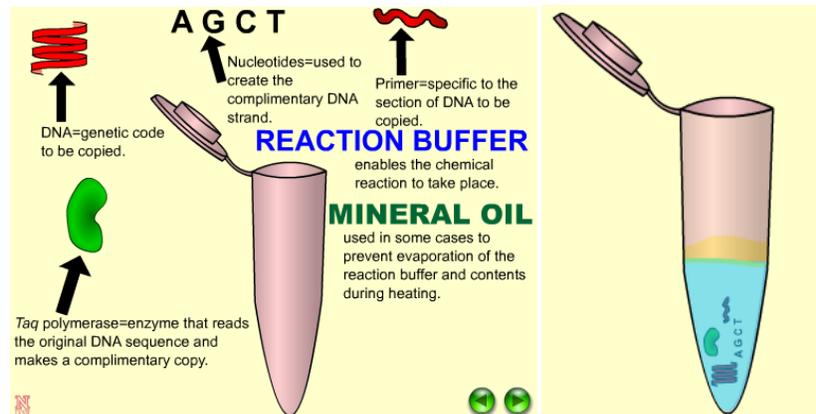


Figura 24. Componentes de la PCR (University of California Davis, 2007).

### Solución amortiguadora

La solución amortiguadora para la reacción se emplea, comúnmente, concentrada diez veces, y por lo general incluye Tris-HCl (pH=8.4 a temperatura ambiente), KCl, gelatina y  $MgCl_2$ .

Algunos autores recomiendan el uso de adyuvantes, los cuales en la práctica aumentan la especificidad y fidelidad de la reacción, tales como el dimetilsulfóxido (DMSO) añadido para disminuir la estructura secundaria del ADN, detergentes como el tween 20 o el Tritón X-100, que ayudan a estabilizar la enzima, y, finalmente, el polietilenglicol (PEG), el glicerol, la formamida, entre otros; aunque en ningún caso estos últimos son imprescindibles (Rodríguez y Barrera, 2004).

### Magnesio

Tanto el magnesio como el manganeso tienen una función crítica en la reacción, requiriéndose a una concentración que oscila regularmente entre 0.5 y 2.5mM. La concentración de  $MgCl_2$  debe optimizarse para cada ensayo en particular, ya que puede tener efecto tanto en la especificidad como en el rendimiento de la reacción. En general, concentraciones insuficientes de  $Mg^{+2}$  dan lugar a bajo rendimiento, mientras que en exceso se obtienen amplificaciones inespecíficas (Rodríguez y Barrera, 2004).

### Desoxirribonucleosidos trifosfatados (dNTPs)

Los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP; distinguibles por sus bases nitrogenadas) son los ladrillos con los que se construyen las nuevas cadenas de ADN (Figura 25 A).

La variación en su concentración afecta la especificidad y fidelidad de la reacción. Concentraciones altas de los mismos hacen disminuir la fidelidad con la que la polimerasa efectúa su trabajo, e incluso pueden llegar a inhibir su actividad. También afecta a la fidelidad de la reacción el uso de concentraciones desbalanceadas de estos cuatro



ingredientes, siendo las concentraciones usuales, en la mayoría de los casos, entre 0.2 a 1mM. Los dNTPs pueden captar iones de magnesio por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación, aconsejándose que la concentración de  $Mg^{+2}$  sea 0.5 a 1mM superior a la concentración de los dNTPs (Rodríguez y Barrera, 2004).

### Cebadores o iniciadores

Estos son el componente más sensible que determina el éxito de un ensayo de PCR. Su longitud suele estar entre 18 y 30 nucleótidos, y su contenido en G+C entre 40-75%. La concentración a la que suelen emplearse en una PCR está en el intervalo de 0.1-0.5 $\mu$ M. Los iniciadores normalmente se diseñan para ser exactamente complementarios al molde de ADN (Figura 25 A).

Los cebadores ideales deben carecer lo más posible de estructuras secundarias, así como de complementariedad entre sí. La complementariedad en el extremo 3' induce a que ambos iniciadores se traslapen en dicho extremo y sirvan de templados y a su vez de iniciadores entre sí, para que la polimerasa los extienda y genere así pequeños amplicones referidos como dímeros de cebadores. Estos dímeros son productos cortos que se amplifican muy eficientemente, reduciendo la cantidad de cebadores disponibles en la reacción, y provocando un menor rendimiento del amplicón de interés.

Ambos iniciadores deben tener una temperatura de fusión o  $T_m$  similar y, por ende, un contenido semejante en G+C.

La distancia que separa los sitios donde se aparean los cebadores dentro del ADN molde determina el tamaño del producto de amplificación. El tamaño ideal depende de la aplicación: los productos largos se amplifican con menor eficiencia, mientras que los productos muy cortos pueden confundirse con dímeros de los iniciadores y limitan mucho la posibilidad de caracterizarlos posteriormente. Existen diferentes programas computacionales que ayudan en el diseño de cebadores y calculan sus  $T_m$ s, estructuras secundarias y posibles interacciones entre ellos (Rodríguez y Barrera, 2004).

### Enzima

Sólo pueden utilizarse polimerasas (Figura 25 A) que sean capaces de actuar a las altas temperaturas empleadas en la reacción. En la actualidad la mayoría de las polimerasas que se suministran comercialmente son versiones recombinantes e incluso mejoradas por ingeniería genética. Dos enzimas de uso muy extendido son la ADN polimerasa Taq, proveniente de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* y la Vent de la bacteria *Thermococcus litoralis*. Sus temperaturas óptimas de catálisis oscilan alrededor de los 72°C, temperatura a la cual incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo, siendo estables a altas temperaturas, incluso por encima de 92°C. De las dos enzimas señaladas, la popularidad alcanzada por la Taq rebasa por mucho y en diferentes aspectos a otras polimerasas. Su fidelidad de replicación depende de la concentración del in  $Mg^{+2}$



y de los dNTPs, así como del que exista o no balance en la concentración de estos últimos (Rodríguez y Barrera, 2004).

### **ADN**

La cantidad de ADN molde puede ser de tan sólo 1ng en el caso de material genético clonado (en virus o plásmidos), o de un mínimo de 20ng, cuando se utiliza ADN genómico proveniente de células eucariotas (Figura 25 A). De hecho, como se ha mencionado arriba, el molde puede ser también ARN que sea previamente transformado en ADNc mediante transcripción reversa. Hay muchas formas posibles de preparar el molde para PCR. En general, no es necesario purificar el molde, porque la reacción puede tolerar la presencia de impurezas, pero hay que tener mucho cuidado de eliminar, lo más posible, la presencia de inhibidores de la polimerasa, sobre todo en las muestras clínicas. Si el material son suspensiones celulares, puede ser suficiente con romper las células por calor. Pero para la mayoría de las muestras clínicas es necesario realizar un procedimiento de extracción con fenol-cloroformo y posteriormente precipitación de ácidos nucleicos con isopropanol o etanol (Rodríguez y Barrera, 2004).

### **Agua**

El agua se usa como solvente del resto de los ingredientes y se requiere al menos destilada (Rodríguez y Barrera, 2004).

### **1.3.4 Etapas de la reacción**

En la Figura 25 se muestra las etapas de la reacción en cadena de la polimerasa en un solo diagrama, así como los componentes que se utilizan para que se lleve a cabo la reacción.

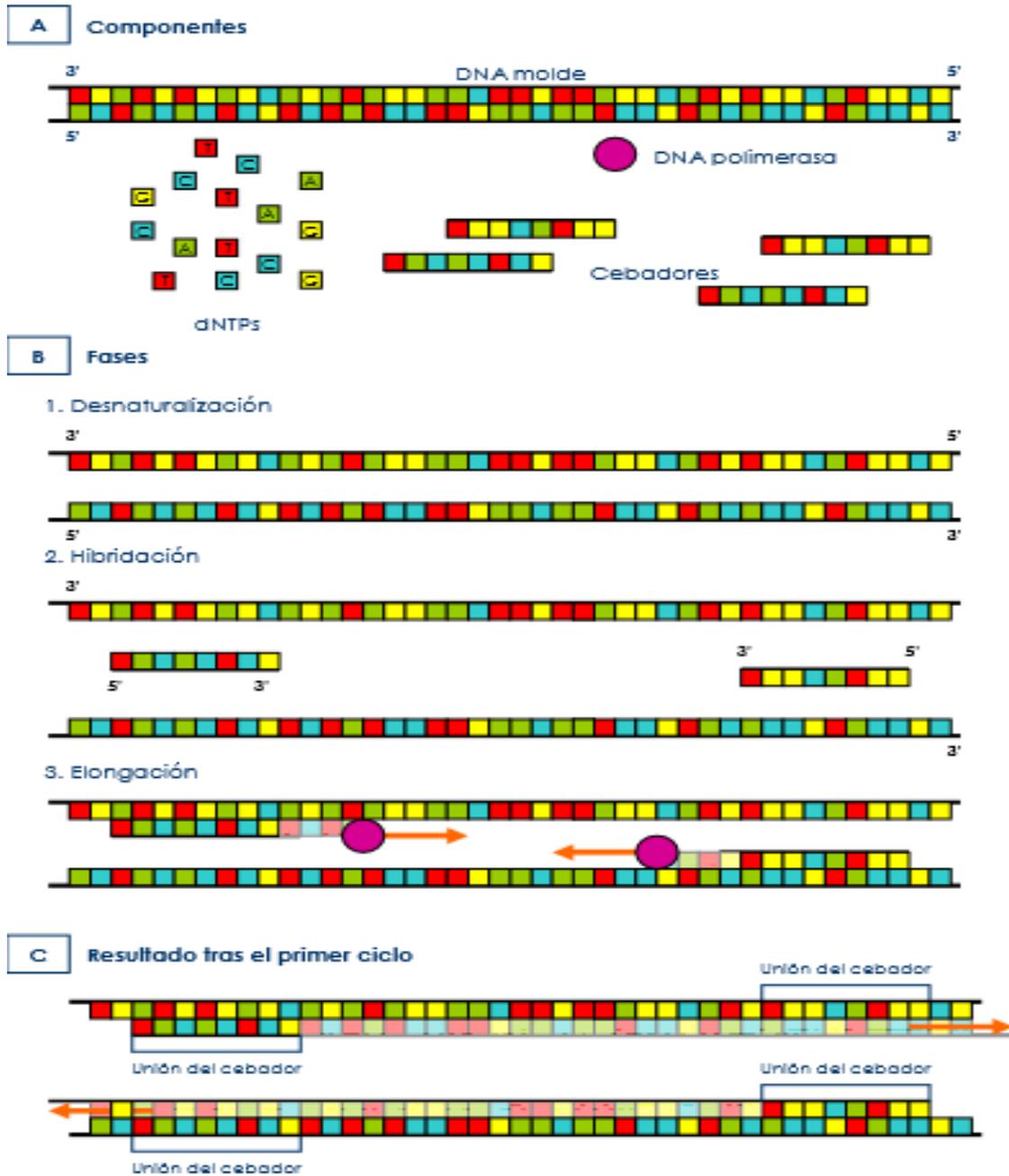


Figura 25. Fases y componentes de la PCR (Pérez, 2011).

### Desnaturalización

El sustrato de la enzima de la PCR es el ADN de simple cadena que actúa como molde para la síntesis de su nueva cadena complementaria. Mediante un calentamiento a 94°C, el ADN de doble cadena logra que sus cadenas se separen o desnaturalicen (Figura 25 B) (Rodríguez y Barrera, 2004).



Ésta es una etapa crítica, ya que es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente, lo que se consigue a temperaturas de 94°C, durante por lo menos un minuto. Si la muestra tiene alto contenido de G+C, se recomienda aumentar de preferencia el tiempo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la actividad de la enzima decrece de manera muy rápida a partir de los 95°C (vida media a 92.5°C = 2h, a 95°C = 40 min. y a 97.5°C = 5 min.), por lo que a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación. En la práctica se suele empezar con un período de desnaturalización prolongado (cinco minutos a 94°C), para asegurarse que la desnaturalización se lleve a cabo a lo largo de toda la molécula del ADN (Rodríguez y Barrera, 2004).

### **Alineamiento**

La enzima, como todas las ADN polimerasas, necesita del grupo OH- libre en el extremo 3' del iniciador ya apareado al sitio blanco de la amplificación, a partir de donde iniciar la síntesis. Este punto constituye el sitio de crecimiento de la cadena complementaria al molde. Mientras que un cebador (referido como el 5' o sentido) es complementario a la secuencia del extremo 5' de la región del ADN molde a amplificar, el otro es al extremo 3' de la misma, pero en la cadena opuesta (Figura 25 B) (Rodríguez y Barrera, 2004).

El alineamiento específico de ambos cebadores se produce a una temperatura determinada por composición de bases y oscila entre 40 y 72°C. Ambas cadenas originales del ADN sirven simultáneamente como moldes para sintetizar sus respectivas cadenas complementarias nuevas. Un aumento de temperatura favorece la especificidad, ya que disminuye las uniones incorrectas de los cebadores con sitios apócrifos del ADN molde (Rodríguez y Barrera, 2004).

### **Extensión**

Con el ADN molde de cadena sencilla, excepto en los sitios donde los iniciadores se aparean, la polimerasa empieza a copiar la hebra, incorporando desoxirribonucleósidos monofosfatos en dirección 5' → 3'. Esta etapa debe realizarse a una temperatura alta, que es la que coincide con la máxima actividad de la polimerasa (72°C) para evitar alineamientos inespecíficos de los iniciadores. El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación, debiendo estimar 1 min, para alargar 1000 nucleótidos. Es común que al finalizar todos los ciclos se realice un último alargamiento por 5 min a 72°C, para asegurarse que todos los productos de amplificación estén completamente terminados y tengan, por ende, exactamente la misma longitud (Figura 25 B) (Rodríguez y Barrera, 2004).



### 1.3.5 Análisis del producto de la PCR

La idea ahora es poder analizar el o los amplificadores obtenidos en la PCR, mediante 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<sup>-</sup>). 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. Si hay muchos fragmentos de un mismo tamaño se agruparán todos juntos, por lo que podremos verlos formando lo que llamamos una banda en el gel (Eguiarte *et al.*, 2007).

Para realizar una electroforesis se requiere de una serie de elementos descritos a continuación y enlistados en la (Figura 26) (López y Sandoval, 2013).

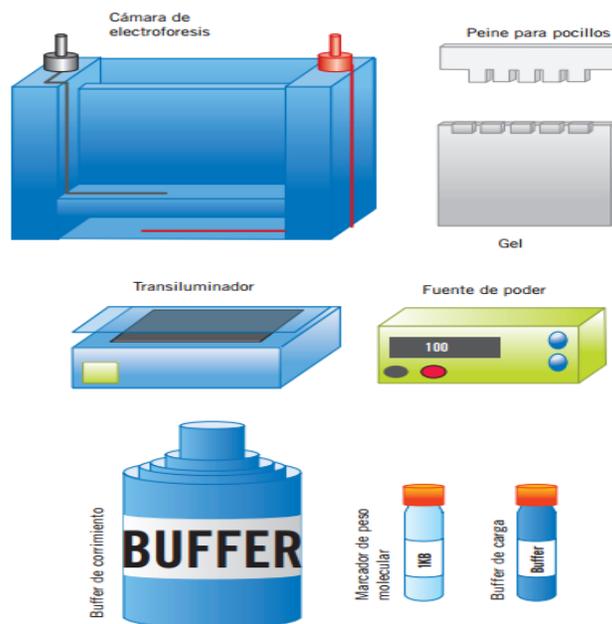


Figura 26. Elementos necesarios para una electroforesis. En la imagen se aprecian los elementos que se requieren para el corrimiento y visualización del gel (López y Sandoval, 2013).



### **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, ya sea de agarosa o de acrilamida. 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 8.5. (López y Sandoval, 2013).

### **Marcador de peso molecular**

Son una mezcla de moléculas de ADN o de proteínas de tamaño conocido que permiten determinar por comparación el tamaño de las moléculas (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 bacteriófagos o plásmidos sometidos a corte con enzimas de restricción que generan fragmentos de diversos tamaños; también puede tratarse de moléculas de ADN sintéticas denominadas escaleras, porque contienen fragmentos con incrementos de tamaño gradual (López y Sandoval, 2013).

### **Buffer de carga**

Este amortiguador tiene como fin brindar peso, densidad y color a la muestra, lo que facilita su depósito en el pocillo y evita su salida del gel; permite, además, monitorear el corrimiento de la muestra en el gel. Se emplea en relación 1:3 para ácidos nucleicos o 1:6 para proteínas, respecto a la cantidad de muestra. El buffer de carga de ácidos nucleicos contiene Tris, azul de bromofenol, azul de xileno y glicerol. Mientras que el buffer de carga para proteínas contiene Tris-HCl, pH 6.8, ditionitritol (DTT), SDS, glicerol y azul de bromofenol (López y Sandoval, 2013).

### **Transiluminador 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, aunque también existen para 254 y 365nm; suelen contar con un botón para baja y alta intensidad por si se requiere una menor exposición de la muestra a la luz ultravioleta. Una vez que se tienen los materiales necesarios existen dos maneras de realizar la electroforesis: de forma horizontal y vertical (López y Sandoval, 2013).

### **Electroforesis horizontal**

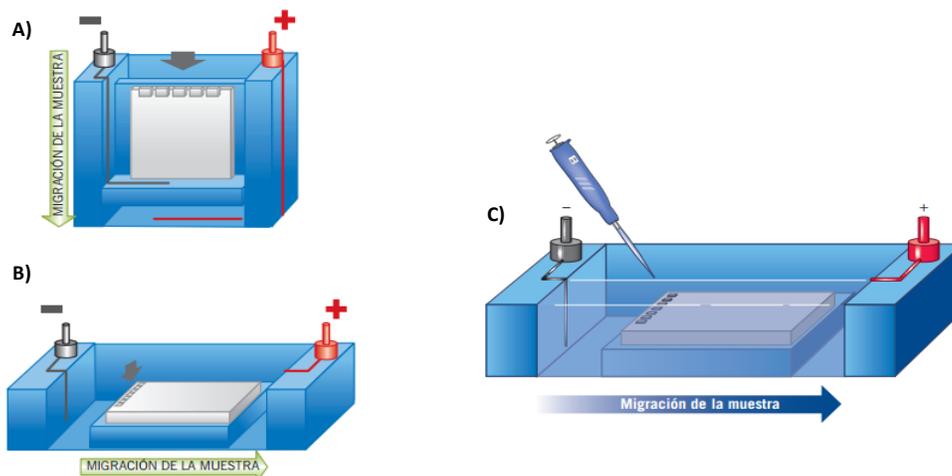
Se lleva a cabo con gel de agarosa para ácidos nucleicos. Para el corrimiento el buffer debe cubrir el gel, con la finalidad de evitar que se seque por el calentamiento inducido por el paso de la corriente eléctrica. Al momento de cargar las muestras en los pocillos, se puede optar por hacerlo en seco; esto es, llenar parcialmente la cámara con líquido de



corrimiento de tal manera que la parte superior del gel no se cubra de buffer para que los pocillos puedan llenarse sin la interferencia del líquido. Una vez cargada la muestra, se corre por unos minutos a bajo voltaje hasta que la muestra entre en el gel y entonces se cubre del todo con el buffer de corrimiento (Figura 29 B). También existe la técnica denominada electroforesis submarina, en la que la totalidad del gel se cubre con buffer de corrimiento, desde el momento de cargar las muestras en los pocillos. En esta técnica el buffer siempre debe cubrir el gel, y se llama submarina porque la muestra se coloca con el gel sumergido en el buffer (Figura 29 C) (López y Sandoval, 2013).

### Electroforesis vertical

Empleada de forma exclusiva con gel de poliacrilamida, se utiliza para proteínas o ácidos nucleicos de pequeño tamaño. El gel debe estar contenido entre dos placas rectangulares de vidrio donde la corriente eléctrica se genera gracias al buffer en el que se encuentra embebido el gel y llena las cubetas o compartimientos del ánodo y el cátodo como se aprecia en la Figura 27 A (López y Sandoval, 2013).



**Figura 27. Cámaras de electroforesis. A) en las cámaras de electroforesis vertical el comportamiento de la muestra sigue la gravedad, ya que el polo positivo se encuentra en la parte inferior de la cámara. B) En la electroforesis horizontal debe cuidarse que el ánodo se coloque hacia el extremo del gel donde corren las muestras, de lo contrario las muestras se saldrán del gel. C) Ejemplificación de una electroforesis submarina, la muestra se coloca después de haber vertido el buffer de corrimiento y retirado el peine que sirve de molde para la formación de los pocillos (López y Sandoval, 2013).**

A continuación se exponen los pasos de los que consta una electroforesis típica.

1. Preparar un gel de agarosa o acrilamida a la concentración requerida.
2. Mezclar las muestras a analizar con un buffer de carga adecuado.



3. Cargar las muestras en el gel.
4. Realizar la corrida electroforética al voltaje pertinente.
5. Visualizar los ácidos nucleicos o las proteínas (López y Sandoval, 2013).

Para la visualización de los ácidos nucleicos se utiliza un colorante fluorescente, el bromuro de etidio, que tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas del ADN y el ARN. Debido a esta propiedad es un agente mutagénico y debe manipularse con cuidado. El bromuro de etidio, por lo general, se incorpora a la agarosa (0.5mg/ml) antes de permitir la solidificación, o puede incorporarse luego del corrimiento, incubando el gel en una solución que lo contenga a 0.5mg/ml. El bromuro de etidio emite fluorescencia de color naranja cuando se expone a la luz ultravioleta con longitud de absorción de 254nm, y longitud de emisión de 366nm. La señal fluorescente es proporcional a la cantidad de producto, como puede observarse en la figura (López y Sandoval, 2013).

### 1.3.6 Tipos de PCR

En los últimos años, se han desarrollado modificaciones o variantes a partir del método de PCR básico para mejorar el rendimiento y la especificidad, adaptarse a muestras particulares y para lograr la amplificación de moléculas de interés en la investigación como ARN en lugar de ADN. Algunas de estas variantes son:

#### **PCR larga**

Denominada L-PCR (Long PCR) o LA-PCR Longer and Accurate PCR, (PCR más larga y exacta) su objetivo es superar 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 cadena de esta actividad y, al mismo tiempo, seguir aprovechando la eficacia de elongación de la polimerasa (Taq o similar) (Luque y Herráez, 2002).

#### **PCR anidada**

La especificidad puede aumentarse realizando una segunda reacción de PCR, con dos cebadores nuevos que hibridan dentro del fragmento diana amplificado por el primer par, dando así lugar a productos de PCR más cortos, pero más específicos. Las copias correctas de la primera diana contendrán ambas secuencias complementarias a los nuevos cebadores, a diferencia de los productos no específicos generados en la primera PCR (que



se observan en la electroforesis como varias bandas o una banda difusa) que por ello no resultarían amplificadas en la segunda. Este método también sirve para aumentar el factor de amplificación conseguido, al suponer dos rondas de amplificación (Luque y Herráez, 2002).

### **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 solo (Luque y Herráez, 2002).

### **PCR inversa**

Esta variante se emplea para clonar regiones desconocidas de un ADN, situadas en posición vecinal a secuencias diana conocidas. Es decir, en lugar de amplificar la región interna, flanqueada por los dos cebadores (PCR convencional), se amplifica la región externa, que flanquea a los cebadores. Para ello es necesario cortar el ADN a ambos lados de la región diana con una enzima de restricción, de tal forma que los extremos cohesivos resultantes pueden hibridar entre sí, formando una molécula circular. Esta es cerrada por una ligasa y se realiza la PCR con cebadores que hibridan en los extremos 5' de la secuencia conocida, por lo que la elongación se extenderá alrededor del círculo. Se generan copias de un ADN lineal delimitado, como en el ADN normal, por la posición de ambos cebadores (Luque y Herráez, 2002).

### **Multiplex PCR**

Multiplex PCR 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. Multiplex PCR puede detectar diferentes patógenos en una sola muestra, también se utiliza para identificar exones e intrones secuencias en genes específicos y determinación de la dosificación génica. Esto se consigue cuando en un solo tubo incluyen conjuntos de cebadores específicos para objetivos diferentes. En este 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 en tiempo real**

PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) es otra adaptación del método de PCR para cuantificar el número de copias de ácidos nucleicos durante la PCR. Por lo tanto, qPCR se



utiliza para cuantificar ADN o ADNc, la determinación de genes o números de transcripción presentes en diferentes muestras. qPCR ofrece ventajas tales como velocidad en el resultado, menor riesgo de la contaminación y la facilidad en el manejo de la tecnología. Esta PCR utiliza fluorescencia, sistemas de detección que son generalmente de dos tipos: agentes de intercalación y sondas marcadas con fluoróforos.

Los agentes intercalantes tales como SYBR Green son fluorocromos que aumentan dramáticamente la fluorescencia por la unión a una doble cadena de ADN. Por lo tanto, el aumento de cada ciclo refleja un aumento proporcional en la fluorescencia emitida. Sin embargo se consideran que los agentes intercalantes ofrecen una especificidad baja porque pueden ser productos no específicos o dímeros de cebador. Varios estudios han demostrado que una cuidadosa selección de primers y el uso de condiciones óptimas de PCR puede minimizar esta no especificidad.

Otro sistema de detección utilizado en PCR en tiempo real son las sondas de hibridación específicas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donante y un aceptador. El aumento de ADN en cada ciclo es proporcional a la hibridación de las sondas, que a su vez es proporcional al aumento de la fluorescencia emitida. El uso de sondas permite identificar polimorfismos y mutaciones; Sin embargo, éstos son más complejos y costosos que agentes intercalantes (Hernández y Gómez, 2012).

### **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 los disponibles sufrieron copias del ADN diana, solo una de sus hebras sigue amplificándose gracias al cebador más abundante (Luque y Herráez, 2002).

### **RT-PCR: amplificación de ARN**

El nombre “PCR con transcriptasa inversa” (iniciales reverse transcriptase), indica que se trata de una amplificación de ARN (especialmente ARNm) a través de la síntesis previa de su ADNc (ADN complementario al ARN), que después de su amplificación por PCR, es decir, no se obtienen copias del ARN de partida, sino de ADN aunque se conserva obviamente la secuencia de aquel (Luque y Herráez, 2002).

Es el método de mayor capacidad de detección de los disponibles para la medida de la expresión génica in vitro. Se utiliza preferentemente para amplificar ARNm de células asequibles, por ejemplo sanguíneas, con una expresión elevada de ciertos genes (por ejemplo globina). También se ha aplicado al análisis de transcritos de genes expresados en grado mínimo (Luque y Herráez, 2002).

La mezcla inicial contiene todos los componentes necesarios: muestra de ARN, transcriptasa inversa, ADN polimerasa, cebadores y dNTPs. El proceso comienza (por ejemplo, 45 min a 48°C) con la síntesis de una hebra de ADNc por la acción de la



transcriptasa inversa, una polimerasa de ADN dirigida por ARN, permaneciendo el ADNc unido al molde como dúplex ARN: ADNc. En una segunda etapa (por ejemplo 2 min a 94°C) se desnaturaliza el dúplex y comienza la amplificación según el mecanismo de una PCR normal: la hebra de ADNc liberada actúa como molde para una segunda hebra de ADNc y luego el dúplex se amplifica en sucesivos ciclos (Luque y Herráez, 2002).

### 1.3.7 Aplicaciones de la PCR

- La tecnología PCR proporciona atajos en muchas aplicaciones de clonación y secuenciación. Estos procedimientos permiten a los científicos obtener datos definitivos de la estructura de genes y secuencias de ADN cuando solo están disponibles cantidades muy pequeñas de ADN (Gardner *et al.*, 2005).
- El molde original para la reacción puede ser ADN o ARN, de modo que la PCR puede emplearse para obtener una copia genómica completa o una copia de ADNc del gen (Alberts *et al.*, 2004).
- Una aplicación importante es el diagnóstico de enfermedades humanas hereditarias, especialmente en el diagnóstico prenatal, cuando se dispone de cantidades muy limitadas de ADN fetal (Gardner *et al.*, 2005).
- Para muchas infecciones la PCR es el método más sensible de detección; actualmente está remplazando el uso de anticuerpos contra proteínas de superficie para detectar la presencia de patógenos en las muestras humanas (Alberts *et al.*, 2004).
- Por último, la PCR tiene un gran potencial en la medicina forense. Su extrema sensibilidad vuelve posible que esta funcione con muestras muy pequeñas mínimas trazas de sangre y tejido que pueden contener los restos de tan solo una célula y aun obtener una huella genética de ADN (ADN fingerprint) de la persona de la cual proviene (Alberts *et al.*, 2004).

### 1.3.8 Ventajas y Desventajas de la PCR

Principales ventajas de la reacción

#### **Duración**

La duración de cada una de las tres etapas de cada ciclo y el número de ciclos debe optimizarse dependiendo de la secuencia concreta que se quiera amplificar. En muchos casos, la elección de estas condiciones debe hacerse de forma empírica (Luque y Herráez, 2002).



### **Especificidad**

Es muy elevada. Esta determinada especialmente por la secuencia de los dos cebadores utilizados y por las condiciones del templado. Se puede determinar la especificidad analizando por electroforesis los productos generados, la aparición de una banda única indica que la técnica es específica (Luque y Herráez, 2002).

### **Capacidad de detección**

(Común, aunque incorrectamente denominada sensibilidad). Es muy alta (bajo límite de detección), tanto que la PCR puede permitir detectar una única molécula de ADN en casi cualquier tipo de muestra clínica, forense o arqueológica (célula, pelo, semen, etc.). sin embargo esta característica supone también un elevado riesgo de contaminación por molécula de origen ajeno a la muestra (Luque y Herráez, 2002).

### **Fidelidad**

Es decir, la capacidad de copiar secuencias con precisión, sin introducir mutaciones (cambios en la secuencias de nucleótidos). Esta característica se debe sobre todo de que la enzima empleada tenga o no actividad correctora de pruebas. En todo caso, la elección de la enzima dependerá del objetivo de la PCR. No es muy importante la fidelidad si solo se pretende obtener una sonda, pero es fundamental si el objetivo es la identificación de mutaciones poco frecuentes (Luque y Herráez, 2002).

### **Desventaja de la reacción**

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy elevada, pero presenta algunos inconvenientes como la 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).

### **1.3.9 Criterios a considerar para la selección adecuada de los primers**

Los oligonucleótidos iniciadores o primers son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN.

La selección de oligonucleótidos iniciadores es muy importante en la reacción en cadena de la polimerasa. De este paso depende el éxito en el laboratorio. En la Tabla 4 se muestran los criterios principales a considerar para la selección adecuada de los primers (Cortazar y Silva, 2004).



**Tabla 4. Criterios a considerar para la selección de primers (Cortazar y Silva 2004).**

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| <b>Tamaño</b>                      | Tamaño ideal: 20-25 nucleótidos de longitud generalmente: 18-30 nucleótidos de longitud         |
| <b>Base en el extremo 3'</b>       | Debe ser una G o una C  |
| <b>Temperaturas de fusión (Tm)</b> | 50-65°C   |
| <b>Contenido GC</b>                | 40-60%  |
| <b>Auto-complementariedad</b>      | Debe ser evitada para minimizar la formación de estructuras secundarias y los dímeros de primer |
| <b>Similaridad</b>                 | Debe tener un 100% de apareamiento con el molde   |

## CAPITULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Detección de *Theobroma cacao* L. transgénico en plantas originarias de México y productos comercializados en el país por la técnica de PCR.

### Objetivo General

Establecer una metodología para detectar *Theobroma cacao* L. transgénico y no transgénico mediante la técnica de PCR para aplicarla en plantas de cacao, así como en productos comercializados en México.

#### Objetivo Particular 1

Diseñar los primers específicos para *Theobroma cacao* L. mediante programas bioinformáticos para detectar cacao en los productos procesados que declaren contenerlo.

#### Actividades Preliminares

1. Diseñar primers y evaluarlos en programas bioinformáticos.
2. Extraer y cuantificar el ADN de varias especies filogenéticamente cercana (algodón) y filogenéticamente lejanas (pollo, res, avena y trigo) al cacao.
3. Aplicar la técnica de PCR al ADN de las especies, usando los primers específicos de cacao.
4. Los amplificados obtenidos de la PCR se utilizaron para evaluar la especificidad de los primers mediante electroforesis en gel de

#### Objetivo Particular 2

Realizar la técnica de PCR con los primers diseñados para identificar la especie *Theobroma cacao* L. en hojas y frutos (granos) de plantas de cacao.

#### Actividades Preliminares

1. Extraer y cuantificar el ADN de las hojas y frutos (granos) de plantas de cacao.
2. Aplicar PCR al ADN extraído de las hojas y frutos (granos) de plantas de cacao con los primers específicos de cacao.
3. Visualizar los amplificados obtenidos en la PCR con electroforesis en gel de agarosa.

#### Objetivo Particular 3

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

#### Actividades Preliminares

1. Extraer y cuantificar el ADN de los productos procesados que declaran contener cacao.
2. Aplicar PCR con el ADN extraído de los productos procesados con los primers específicos de cacao.
3. Visualizar los amplificados obtenidos en la PCR con electroforesis en gel de agarosa.

#### Objetivo Particular 4

Seleccionar los primers específicos para detectar el promotor CaMV35S y el terminador T-NOS mediante trabajos previos, para utilizarlos en la detección de cacao transgénico.

#### Actividades Preliminares

1. Evaluar los primers seleccionados con programas bioinformáticos.
2. Extraer y cuantificar el ADN de especies genéticamente modificadas que contengan el promotor CaMV35S y no genéticamente modificados
3. Aplicar PCR al ADN extraído de las muestras con primers específicos del promotor CaMV35S y el terminador T-NOS.
4. Evaluar la especificidad de los primers en electroforesis en gel de agarosa con los amplificados que se obtuvieron en la PCR.

#### Objetivo Particular 5

Aplicar la técnica de PCR a los productos naturales (hojas y frutos de plantas de cacao) y procesados de cacao utilizando los primers específicos, el promotor CaMV35S y el terminador T-NOS para detectar la presencia de cacao genéticamente modificado.

#### Actividades Preliminares

1. Extraer y cuantificar el ADN de los productos naturales y procesados de cacao.
2. Aplicar PCR con el ADN extraído de los productos naturales y procesados con los primers específicos del promotor CaMV35S y el terminador T-NOS.
3. Visualizar los amplificados en electroforesis en gel de agarosa.

#### Análisis de Resultados

#### Conclusiones



---

## 2.1 Descripción del cuadro metodológico

### 2.1.1 Problema

Detección de *Theobroma cacao L.* transgénico en plantas originarias de México y productos comercializados en el país por la técnica de PCR.

### 2.1.2 Objetivo general

Establecer una metodología para detectar cacao (*Theobroma cacao L.*) transgénico y no transgénico mediante la técnica de PCR para aplicarla en plantas de cacao, así como en productos comercializados en México.

### 2.1.3 Objetivo Particular 1

Diseñar los primers específicos para *Theobroma cacao L.* mediante programas bioinformáticos para detectar cacao en los productos procesados que declaren contenerlo.

#### Actividades Preliminares

1. Diseñar primers y evaluarlos en programas bioinformáticos.
2. Extraer y cuantificar el ADN de varias especies filogenéticamente cercana (algodón) y filogenéticamente lejanas (pollo, res, avena y trigo) al cacao.
3. Aplicar la técnica de PCR al ADN de las especies, usando los primers específicos de cacao.
4. Los amplificadores obtenidos de la PCR se utilizaron para evaluar la especificidad de los primers mediante electroforesis en gel de agarosa.



### 2.1.4 Objetivo Particular 2

Realizar la técnica de PCR con los primers diseñados para identificar la especie *Theobroma cacao* L. en hojas y frutos (granos) de plantas de cacao.

#### Actividades Preliminares

1. Extraer y cuantificar el ADN de las hojas y frutos (granos) de plantas de cacao.
2. Aplicar PCR al ADN extraído de las hojas y frutos (granos) de plantas de cacao con los primers específicos de cacao.
3. Visualizar los amplificadores obtenidos en la PCR con electroforesis en gel de agarosa.

### 2.1.5 Objetivo Particular 3

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

#### Actividades Preliminares

1. Extraer y cuantificar el ADN de los productos procesados que declaran contener cacao.
2. Realizar PCR con el ADN extraído de los productos procesados con los primers específicos de cacao.
3. Visualizar los amplificadores obtenidos en la PCR con electroforesis en gel de agarosa.

### 2.1.6 Objetivo Particular 4

Seleccionar los primers específicos para detectar el promotor CaMV35S y el terminador T-NOS mediante trabajos previos, para utilizarlos en la detección de cacao transgénico.

#### Actividades Preliminares

1. Evaluar los primers seleccionados con programas bioinformáticos.
2. Extraer y cuantificar el ADN de especies genéticamente modificadas que contengan el promotor CaMV35S y no genéticamente modificados.



3. Aplicar PCR al ADN extraído de las muestras con primers específicos del promotor CaMV35S y el terminador T-NOS.
4. Evaluar la especificidad de los primers en electroforesis en gel de agarosa con los amplificados que se obtuvieron en la PCR.

### 2.1.7 Objetivo Particular 5

Aplicar la técnica de PCR a los productos naturales (hojas y frutos de plantas de cacao) y procesados de cacao utilizando los primers específicos, el promotor CaMV35S y el terminador T-NOS para detectar la presencia de cacao genéticamente modificado.

#### Actividades Preliminares

1. Extraer y cuantificar el ADN de los productos naturales y procesados de cacao.
2. Aplicar PCR con el ADN extraído de los productos naturales y procesados con los primers específicos del promotor CaMV35S y el terminador T-NOS.
3. Visualizar los amplificados en electroforesis en gel de agarosa.

## 2.2 Materiales y métodos

### 2.2.1 Material biológico

Se consiguieron 9 muestras de plantas y granos de cacao procedentes de los estados productores de México (Morelos, Chiapas, Guerrero, Oaxaca y Tabasco) (Tabla 5).

**Tabla 5. Muestras de material biológico natural.**

| #  | MUESTRA  | PRECIO (\$) Por kg | ORIGEN                  |
|----|----------|--------------------|-------------------------|
| H1 | Planta 1 | Donación           | Chiapas                 |
| H2 | Planta 2 | Donación           | Yautepec<br>Morelos     |
| H3 | Planta 3 | Donación           | Costa chica<br>Acapulco |
| H4 | Planta 4 | Donación           | Costa                   |



|           |         |       |                    |
|-----------|---------|-------|--------------------|
|           |         |       | grande<br>Acapulco |
| <b>C1</b> | Cacao 1 | \$120 | Tabasco            |
| <b>C2</b> | Cacao 2 | \$125 | Chiapas            |
| <b>C3</b> | Cacao 3 | \$100 | Tlalnepantla       |
| <b>C4</b> | Cacao 4 | \$125 | Chiapas            |
| <b>C5</b> | Cacao 5 | \$100 | Oaxaca             |

Se obtuvieron 11 muestras de chocolates comercializados en el país, de diferentes tiendas de autoservicio (Tabla 6).

El parámetro de los chocolates a elegir fue que tuvieran una concentración del 26-100% de sólidos de cacao pues así se facilitaría la extracción de ADN, esperando así mismo que estos chocolates estuvieran elaborados a partir de productos orgánicos.

También se consiguieron 5 muestras de chocolates artesanales, obtenidos de la feria de cacao y chocolate, donde varios productores mexicanos ofrecen sus productos a base de cacao.

Es de gran importancia que el consumidor conozca lo que está adquiriendo, debido a que en México no hay una normatividad que indique declarar la presencia de transgénicos en el producto.

**Tabla 6. Muestras de material biológico comercializado.**

| #           | MUESTRA                                | MARCA          | CON-<br>TENI-<br>DO (g) | %<br>CACAO | PRECIO<br>(\$) | PROCEDENCIA                              | LOTE | CADUCIDAD     |
|-------------|--|----------------|-------------------------|------------|----------------|--|------|---------------|
| <b>Ch</b>   | Chocolates con frutos y miel Soconusco | Como el origen | 40                      | 70         | \$35.00        | 6ta Feria Artesanal de cacao y chocolate | ND   | ND            |
| <b>Ch X</b> | Chocolate Xofía                        | Xofía          | 50 aprox.               | 70         |                | 6ta Feria Artesanal de cacao y chocolate | ND   | 04-Abril-2018 |
| <b>Ch R</b> | Chocolate Ranek                        | Ranek          | ND                      | 100        | \$20.00        | 6ta Feria Artesanal de cacao y chocolate | ND   | ND            |



|               |                             |                        |      |           |          |                           |                 |                |
|---------------|-----------------------------|------------------------|------|-----------|----------|---------------------------|-----------------|----------------|
| <b>Ch Ca</b>  | Chocolate Amargo con canela | Cazuela, Comal y Cacao | 80   | NE        | \$40.00  | Salón y chocolate         | ND              | ND             |
| <b>Ch I</b>   | Chocolate Amargo            | La Ixta                | 100  | 100       | \$65.00  | Salón y chocolate         | ND              | ND             |
| <b>Ch L</b>   | Chocolate Mini Eggs         | Lindt                  | 124  | NE        | Donación | Comercial Mexicana        | ND              | ND             |
| <b>Ch T</b>   | Chocolate Turin             | Turin                  | 18   | 70 mínimo | \$12.00  | Tienda Cuautitlán Izcalli | LO06 90315 05   | 15-Junio-2019  |
| <b>Ch H</b>   | Chocolate Cookies & cream   | Lindt                  | 100  | NE        | Donación | Comercial Mexicana        | ND              | Diciembre-2018 |
| <b>Ch E</b>   | Chocolate Excellence        | Lindt                  | 100  | 49 mínimo | Donación | Comercial Mexicana        | ND              | Octubre-2017   |
| <b>Ch Co</b>  | Chocolate Casa Luker Cacao  | Casa Luker Cacao       | 6    | NE        | Donación | Salón y chocolate         | 99000 52229     | 24-Mayo-2019   |
| <b>Ch To</b>  | Chocolate Tobleron          | Tobleron               | 50   | 26 mínimo | \$42.00  | SEARS                     | 00Y21 71831     | 03-Agosto-2018 |
| <b>Ch Mi</b>  | Chocolate Milka             | Milka                  | 100  | NE        | \$79.00  | Liverpool                 | 00A22 71443 -01 | 06-Enero-2018  |
| <b>Ch Kit</b> | Chocolate Kit Kat           | Kit Kat                | 41.5 | NE        | \$17.00  | Tienda Cuautitlán Izcalli | 72111 211A      | 30-Mayo-2018   |
| <b>Ch Cru</b> | Chocolate Crunch            | Crunch                 | 40   | NE        | \$13.00  | Tienda Cuautitlán Izcalli | 71880 215B1     | 31-Mayo-2018   |
| <b>Ch Her</b> | Chocolate Hersheys          | Hersheys Bites dark    | 43   | NE        | \$16.00  | Oxxo Cuautitlán Izcalli   | 25J02 63222     | Febrero-2019   |
| <b>Ch Nes</b> | Chocolate Nesquik           | Nesquik                | 14   | NE        | \$3.00   | Tienda                    | 72830 214TA     | 31-Agosto-2018 |

\*NE no especificado, ND no declarado.



### 2.2.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo con las muestras naturales (hojas y frutos de plantas de cacao) y productos procesados de *Theobroma cacao L.*

Todas las células tienen ADN, en su núcleo o en organelos como mitocondrias y en las plantas los cloroplastos, por lo que cualquier metodología de extracción de ADN consiste en una etapa para romper las estructuras que confinan el ADN y liberar al medio su contenido y otra etapa de purificación, que implica retirar de la solución final la mayoría de los elementos que pueden interferir en la PCR (Microbial, 2009).

Para dichas muestras se utilizó el protocolo clásico Sambrook, 2001, basado en la desintegración del tejido usando detergentes y proteinasa K para liberar el contenido celular, extracción de polisacáridos y proteínas con una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico para finalmente precipitar el ADN con etanol.

#### REACTIVOS

- ✓ Agua desionizada libre de nucleasas
- ✓ Solución de lisis
- ✓ Enzima proteinasa K
- ✓ Mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico
- ✓ Etanol frío

#### MATERIAL Y EQUIPO

- ✓ Mortero
- ✓ Tubos eppendorff esterilizados
- ✓ Balanza analítica electrónica, Cole parmer PR410 Equipar 500mg
- ✓ Termoblock
- ✓ Micropipetas Rainin
- ✓ Microcentrífuga, minispin plus eppendorff 1400rpm

#### MÉTODO

Para el caso de las hojas de Plantas de cacao y para los granos de cacao, antes de realizar la extracción se pusieron a hidratar en agua por 24 horas, pasando este tiempo, se enjuagaron las muestras con agua libre de nucleasas para quitar las sales que pudieron haberse quedado del agua común y así no pudieran inhibir la PCR.

Para obtener las muestras de plantas estas se cortaron en trozos pequeños, los granos se trituraron con una punta de una micropipeta, y en los chocolates las muestras se rasparon con una navaja.



#### DISGREGACIÓN DEL TEJIDO

1. Se pesaron 0.125g de muestra en un tubo eppendorff esterilizado.
2. Se agregaron 1250 $\mu$ L de solución lisis.
3. Se agitó con el vortex en un tiempo mínimo para homogenizar bien la mezcla.
4. Se adicionaron 7 $\mu$ L de enzima proteinasa K.
5. Se incubaron los tubos a 50°C en el termoblack por 2 horas.
6. Se elevó la temperatura del termoblack a 60°C por 1 hora para desactivar la enzima.

#### EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y POLISACÁRIDOS DE ADN

7. Se agregaron 250 $\mu$ L de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

(Para las muestras de granos de cacao y chocolates se realizó un segundo lavado con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, debido a la cantidad de pigmentos, proteínas y grasa en las muestras)

8. Se mezcló el tubo varias veces suavemente.
9. Se centrifugó a 10000rpm por 10min.
10. Se recuperó la fase acuosa superior que contiene el ADN.
11. Se trasladó la fase recuperada a un nuevo tubo eppendorrrff esterilizado.

#### PRECIPITACIÓN DE ADN

12. Se añadieron 1500 $\mu$ L de etanol frío a los tubos de la muestra.
13. Se mezcló con un movimiento suave.
14. Se centrifugó a 10000rpm por 10min.
15. 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.
16. Posterior se adicionaron 50 $\mu$ L de agua desionizada para re-suspender el ADN, agitando suavemente el tubo hasta su completa disolución.
17. Se cuantifico el 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 260nm y 280nm. La lectura de 260nm permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos y 280nm permite el cálculo de la concentración de proteínas; la relación entre estas lecturas proporciona un estimado de la pureza de los ácidos 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. (Sambrook y Russell, 2001).



#### REACTIVOS:

- ✓ Muestras de ADN: Naturales (hojas y frutos de plantas de cacao), especie filogenéticamente cercana al cacao, especies filogenéticamente lejanas al cacao, productos procesados (chocolates), y controles positivos transgénicos etc.
- ✓ Agua libre de nucleasas.

#### MATERIAL Y EQUIPO:

- ✓ Nano espectrofotómetro, Accesolab Nano Drop ND-1000
- ✓ Micropipetas Rainin
- ✓ Tubos eppendorff esterilizados

#### MÉTODO:

1. Se abrió el programa “*Nanodrop*” en la computadora y se seleccionó la opción ácidos nucleicos.
2. Se colocaron 2 $\mu$ L de agua libre de nucleasas en el sensor para iniciar el equipo, se selección la opción “ok”.
3. Se limpió el sensor con ayuda de un pañuelo y se colocaron 2 $\mu$ L de agua libre de nucleasas, la cual sirvió como blanco para la lectura.
4. Se corrió el programa, cuando el equipo dio los valores del blanco, se limpió el sensor con un pañuelo.
5. Se colocaron 2 $\mu$ L de la muestra ADN a cuantificar y se seleccionó la opción “measure”.
6. Se registraron los valores de concentración (260-280ng/ $\mu$ L) y pureza del ADN.
7. La concentración, debe ser de 60ng/ $\mu$ L. En caso de no ser así, se debe realizar la dilución correspondiente.

#### DISEÑO DE PRIMERS

La secuencia de primers seleccionados para la especificidad de *Theobroma cacao L.* (Tabla 7) se tomaron mediante el programa “primer quest tool” y del programa bioinformático “NCBI”, se tomó el gen localizado en “ LOC18585987 (LOC18585987), ARNm” para llevar a cabo la PCR (Anexo 1).

Una vez establecidos los primers se calculó la temperatura de hibridación correspondiente  $T_m=55^{\circ}\text{C}$  (Anexo 2).

Posteriormente se llevó a cabo el programa de PCR con Master Mix<sup>®</sup> de manera experimental, demostrando que a la  $T_m$  (Temperatura calculada) no amplificó. Por esa razón se varió la  $T_m$ , obteniendo amplificado a  $60^{\circ}\text{C}$ . Teniendo como programa final las condiciones de la Figura 29.



**Tabla 7. Primers seleccionados de *Theobroma cacao L.* para llevar a cabo la PCR.**

| Primer                                       | Secuencia (5' - 3')   | Tamaño del amplificado |
|--|-----------------------|------------------------|
| <b><i>Theobroma cacao L.</i><br/>Frontal</b> | AGATGCCTCTGTGCTGTTATG | <b>266pb</b>           |
| <b><i>Theobroma cacao L.</i><br/>Reverso</b> | GCCAGATGTCACGGTCAAT   |                        |

La secuencia de primers seleccionados para la especificidad del promotor CAMV35S y el terminador T-NOS, se tomaron del artículo “QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs)” (Karamollaoglu *et al.*, 2009). Para el promotor CaMV 35S del virus del mosaico de la coliflor los primers utilizados se ubican en el gen “CaMVgp7”, mientras que para el terminador T-NOS de *Agrobacterium tumefaciens* se encuentra en el gen que codifica la nopalina sintetasa. Las secuencias de bases de los primers son reportados en la Tabla 8, con fragmentos de amplificación de las dos regiones de ADN, P35S y TNOS, 195 y 180 pares de bases (pb) respectivamente.

Una vez establecidos los primers, se calculó la temperatura de hibridación correspondiente  $T_m=62.2^{\circ}\text{C}$ . Teniendo como programa final las condiciones de la Figura 31.

**Tabla 8. Primers seleccionados del promotor CaMV35S y el terminador T-NOS para llevar a cabo la PCR.**

| Primer               | Secuencia (5' - 3')  | Tamaño del amplificado |
|----------------------|----------------------|------------------------|
| <b>CaMV Frontal</b>  | GCTCCTACAAATGCCATCA  | <b>195pb</b>           |
| <b>CaMV Reverso</b>  | GGATAGTGGGATTGTGCGTC |                        |
| <b>T-NOS Frontal</b> | GAATCCTGTTGCCGGTCTTG | <b>180pb</b>           |
| <b>T-NOS Reverso</b> | TTATCCTAGTTTGCGCGCTA |                        |

Para preparar la reacción se necesitó que los “primers” tuvieran una concentración de 25  $\mu\text{M}$ .



## 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 *et al.*, 2013).

### MATERIAL BIOLÓGICO

- ✓ Muestras de ADN para amplificar por PCR.

### REACTIVOS

- ✓ Kit Master Mix® para PCR punto final ó
- ✓ Kit “*Phire Plant Direct PCR*”
- ✓ Pareja de primers
- ✓ Agua libre de nucleasas
- ✓ Muestras de ADN

### MATERIAL Y EQUIPO

- ✓ Micropipetas Rainin
- ✓ Puntas para micropipetas
- ✓ Gradilla
- ✓ Microcentrífuga
- ✓ Pafafilm
- ✓ Termociclador ATC 4011

### MÉTODO

1. Se agregaron todos los componentes del Kit para PCR con Master Mix® (Tabla 9) o los componentes del Kit “*Phire Plant Direct PCR*” (Tabla 10) según sea el caso, a un tubo eppendorff de 200µl mas el ADN correspondiente para cada muestra, obteniendo un volumen total en cada tubo de 20µl para Master Mix® y 25µl para PCR directa.



**Tabla 9. Componentes de PCR con Master Mix®.**

| COMPONENTE                    | PROPORCIÓN POR MUESTRA |
|-------------------------------|------------------------|
| Kit Master Mix                | 12.5µl                 |
| Primers<br>F 25 µM<br>R 25 µM | 0.5µl<br>0.5µl         |
| Agua libre de nucleasas       | 10.5µl                 |
| ADN                           | 2µl                    |

**Tabla 10. Componentes de PCR Directa**

| COMPONENTE                            | PROPORCIÓN POR MUESTRA |
|---------------------------------------|------------------------|
| 2X Phire Plant PCR Buffer             | 10µl                   |
| Agua libre de nucleasas               | 8.1µl                  |
| Primers<br>F a 25 µM<br>R a 25 µM     | 0.5µl<br>0.5µl         |
| ADN                                   | 0.5µl                  |
| Phire® Hot Start II<br>ADN Polymerase | 0.4 µl                 |

2. Posteriormente los tubos se colocaron en el termociclador a las diferentes condiciones del programa de PCR
3. Se programó los ciclos que indico el programa de la PCR para cada primers.

### 2.3.1 Etapas y ciclos de la reacción

La programación del termociclador se llevó a cabo con las condiciones indicadas tanto para cacao con Master Mix® (Anexo 2), cacao con PCR Directo (Anexo 3) y CaMV y T-NOS (Anexo 4), como se observa en las Figuras 28, 29 y 30.

Se empleó PCR Punto Final con el Kit Master Mix® para controles positivos de plantas de cacao y muestras de especificidad, mientras que para granos de cacao y muestras comerciales se empleó el Kit “Phire Plant Direct PCR”.

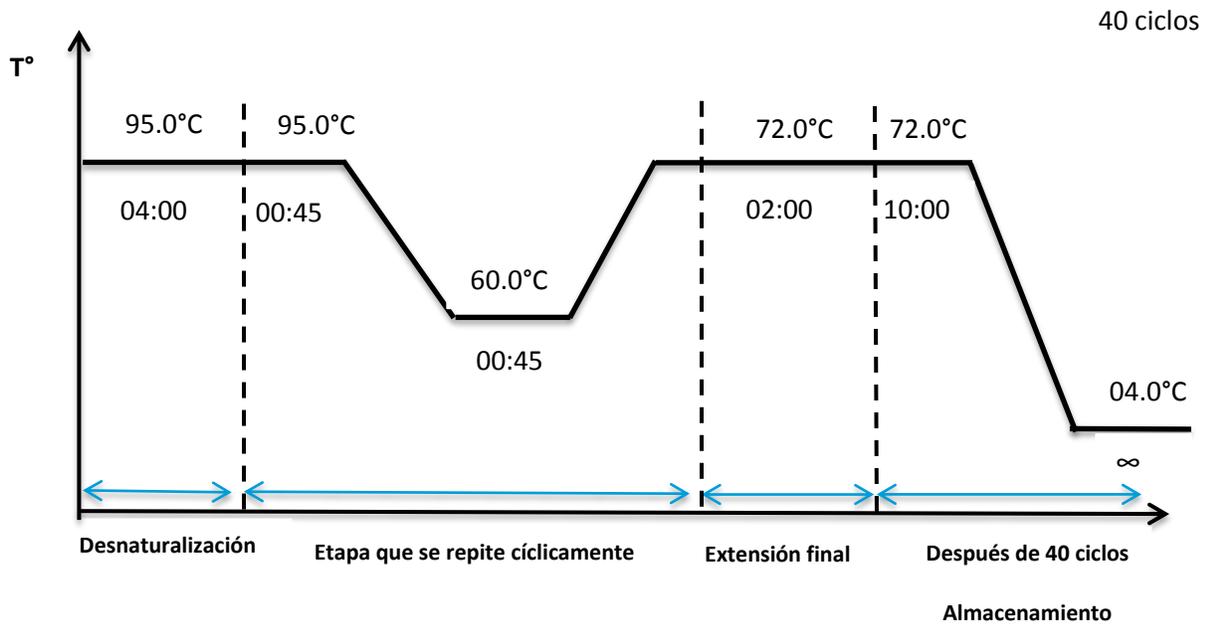


Figura 28. Programa de PCR Punto Final para *Theobroma cacao L.*

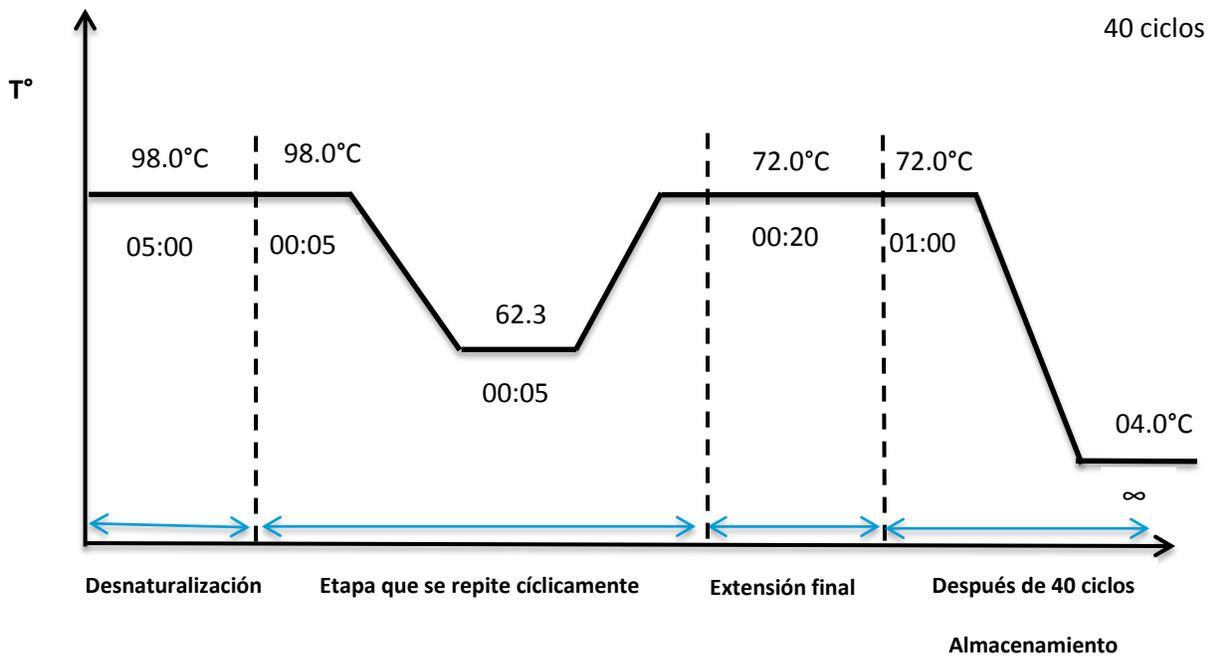


Figura 29. Programa de PCR Directa para *Theobroma cacao L.*

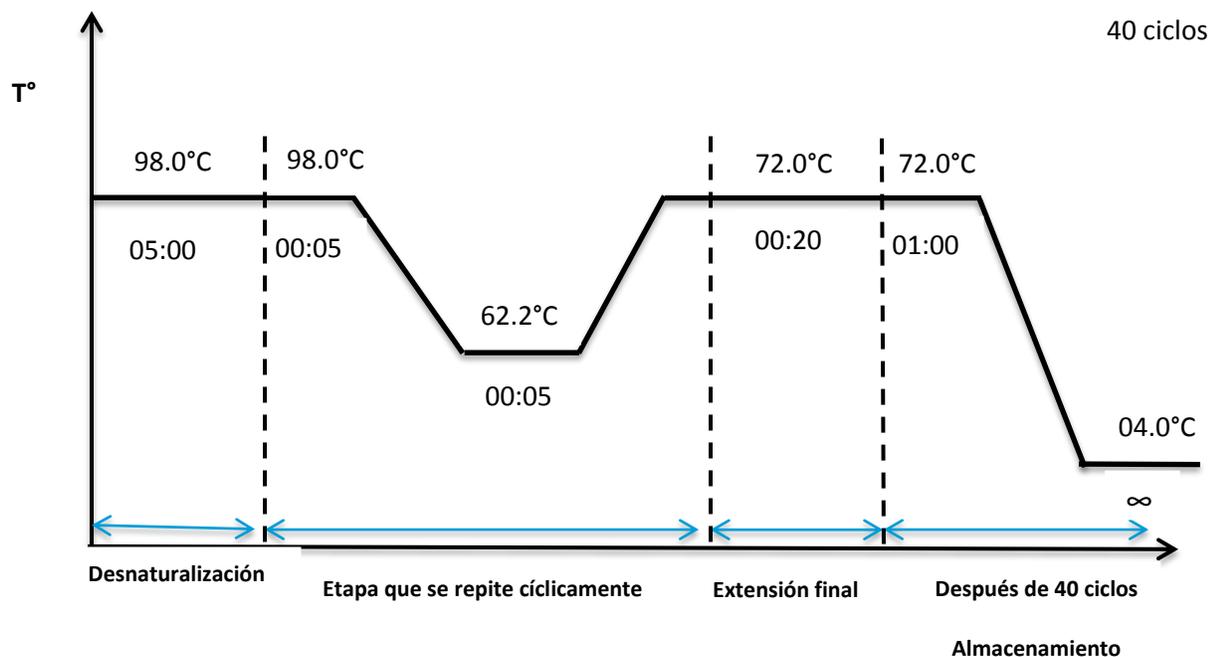


Figura 30. Programa de la PCR Directa para promotor CaMV y el terminador T-NOS

### 2.3.2 Evaluación de los productos obtenidos de la PCR mediante electroforesis en gel.

#### MATERIAL BIOLÓGICO

- ✓ Muestras de amplificación de PCR

#### REACTIVOS

- ✓ Agua desionizada con pH de 7
- ✓ Agarosa
- ✓ Bromuro de etidio
- ✓ Colorante blue-orange
- ✓ Marcador de peso molecular "HyperLadder 100bp" BIOLINE
- ✓ TAE XI

#### MATERIAL Y EQUIPO

- ✓ Parafilm
- ✓ Micropipetas *Rainin*
- ✓ Puntas para micropipetas



- ✓ Gradilla
- ✓ Matraz Erlenmeyer de 200ml
- ✓ Balanza analítica
- ✓ Microcentrífuga
- ✓ Cámara de electroforesis
- ✓ Transluminador
- ✓ Microondas
- ✓ Celular

## MÉTODO

Una vez finalizada la PCR se analizaron los productos amplificados obtenidos por medio de una electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1.5% (para muestras con primers de *Theobroma cacao L.*), 2.5% (para muestras con primers de CaMV) y 3% (para muestras con primers de T-NOS).

### PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA

1. Se realizaron geles al 1.5% de agarosa (0.45g) (para muestras con primers de *Theobroma cacao L.*), al 2.5 % de agarosa (0.75g) (para muestras con primers de CaMV) y al 3% de agarosa (0.9g) (para muestras con primers de T-NOS).
2. Se disolvieron en 30ml de TAE XI.
3. Se calentó la disolución en el horno de microondas aproximadamente por 1 minuto por espacios de 20 segundos.
4. Se añadió una gota de BRET y se mezcló.
5. Se cerraron las puertas laterales del soporte del gel.
6. Se vertió la mezcla en el soporte del gel, cuidando que no se forme burbujas y se colocaron los peines.
7. Se esperó a que la solución gelificara.
8. Se retiraron los peines y se colocó el soporte con el gel en la cámara de electroforesis.
9. Se agregó TAE XI a la cámara de modo que el gel quedara cubierto.

### CARGA Y CORRIDA DEL GEL

10. Se colocó en un trozo de parafil 3 $\mu$ l de BRET; 3 $\mu$ l de colorante blue-orange y 5 $\mu$ l de la muestra resultante de la PCR o 1 $\mu$ l de marcador de peso molecular.
11. Las tres gotas se mezclaron muy bien con ayuda de una micropipeta, se recogieron y se colocaron en el pocillo correspondiente.
12. Cuando se terminó de cargar el gel, se cerró la cámara electroforética y se activó el campo eléctrico a 60V (para muestras con CAMV y T-NOS) y 90V (para muestras con primer de *Theobroma cacao L.*).



### 2.3.3 Visualización de fragmentos.

Una vez concluida la migración de fragmentos de ADN, su tamaño puede determinarse comparando la distancia recorrida en el gel con la de fragmentos de tamaño conocido (marcador de peso molecular).

1. Se colocó el gel dentro del transluminador.
2. Se visualizaron los geles en el fotodocumentador y se fotografiaron.

## CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1 Objetivo Particular 1

*“Diseñar los primers específicos para Theobroma cacao L. mediante programas bioinformáticos para detectar cacao en los productos procesados que declaren contenerlo”.*

#### DISEÑO DE PRIMERS

Se logró el diseño de los primers para la detección de *Theobroma cacao L.* sin embargo no fueron específicos ya que amplificaron para especies filogenéticamente lejanas al cacao como el pollo.

Sin embargo no interfiere en el estudio porque la especie que amplifico no es una planta, ni los productos procesados contienen pollo, obteniéndose amplificados para la detección de cacao en la realización de este experimento.

Cuando se realizó el diseño de los primers en el programa bioinformático para la detección de *Theobroma cacao L.* dio un valor de amplificado de 266 pares de bases (pb), pero experimentalmente el amplificado no resulto ser el declarado por el programa bioinformático, por lo que se calculó el tamaño del amplificado con un marcador de peso molecular de Bioline “HyperLadder 100bp”, el cual nos indicó que el tamaño del amplificado era de 400pb.

Esta pareja de primers puede seguirse utilizando para posteriores experimentaciones pues ya han sido evaluados a las condiciones en las que se trabaja en el laboratorio.

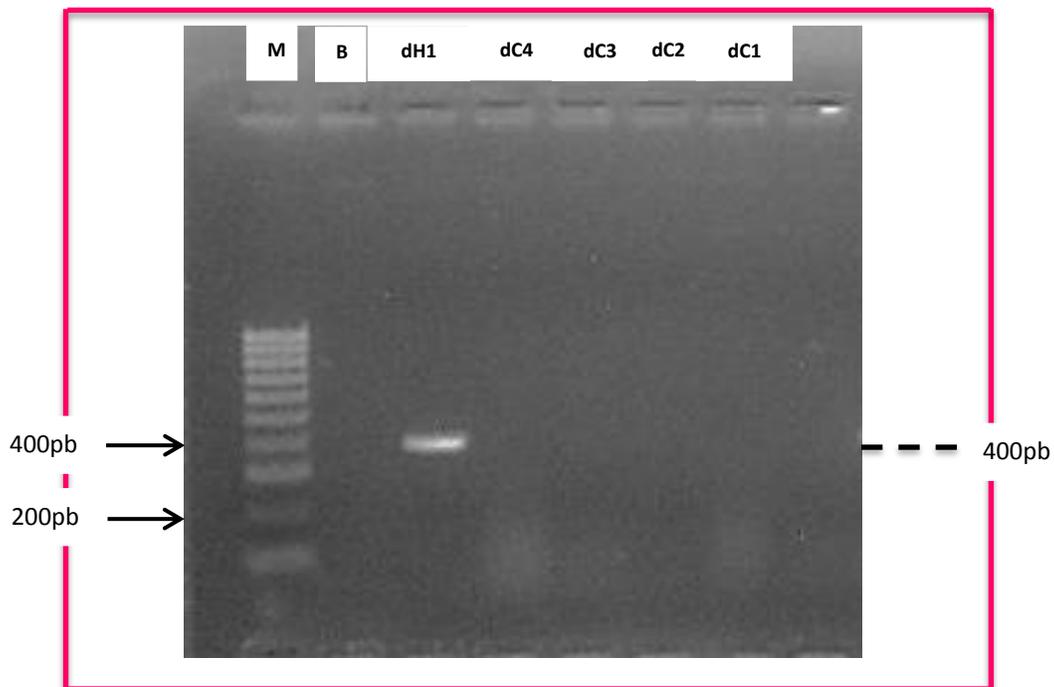
**CONTROL POSITIVO DE (*THEOBROMA CACAO* L.)**

Se realizó la extracción del ADN de las muestras de cacao utilizando el protocolo de Sambrook detallado anteriormente, obteniendo una cuantificación del ADN con los siguientes resultados (Tabla 11).

**Tabla 11. Cuantificación y pureza del ADN de muestras de cacao.**

| MUESTRAS  | ADN [ ]<br>ng/ $\mu$ l | PUREZA<br>260/280 | NOMENCLATURA | ADN<br>DILUIDO<br>ng/ $\mu$ l | PUREZA<br>260/280 |
|-----------|------------------------|-------------------|--------------|-------------------------------|-------------------|
| <b>H1</b> | 1411.3                 | 1.72              | <b>dH1</b>   | 68.5                          | 1.62              |
| <b>CN</b> | 3895.0                 | 1.42              | <b>dCN</b>   | 62.5                          | 1.43              |
| <b>C1</b> | 827.4                  | 1.07              | <b>dC1</b>   | 63.1                          | 1.10              |
| <b>C2</b> | 1671.2                 | 1.35              | <b>dC2</b>   | 65.5                          | 1.19              |
| <b>C3</b> | 2367.0                 | 1.39              | <b>dC3</b>   | 124.8                         | 1.43              |

Se utilizaron las muestras de ADN diluidas (dH1, dCN, dC1, dC2, y dC3) buscando que las muestras se encontraran a una concentración cercana a 60ng/ $\mu$ l. Los resultados de la relación 260/280 para las muestras de cacao, demuestran que hubo contaminación significativa con proteínas y pigmentos, ya que hubo valores menores a 1.8 en todas las muestras, siendo (dH1) la muestra que tuvo una preparación más pura, mientras que la muestra (dC1) fue la más contaminada, sin embargo se pudieron obtener amplificadas a esas relaciones en el ADN.



**Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V para identificación de cacao en hoja y granos de cacao, mediante PCR punto final; (M) Marcador de Peso Molecular de 100 pb; (B) Blanco; (dH1) Control Positivo Hoja de Cacao de Chiapas; (dC4) Cacao de Chiapas; (dC3) Cacao de Tlanepantla; (dC2) Cacao de Mazatan Chiapas; (dC1) Cacao de Tabasco.**

En el siguiente gel (Figura 31) de agarosa al 1.5% se muestran los resultados de la PCR llevada a cabo a una temperatura de hibridación de 60°C. En el gel se visualizó el amplificado de la muestra de la hoja de cacao procedente de Chiapas (carril dH1), el cual se tomó como control positivo para verificar que las demás muestras amplificaran a esas condiciones, obteniendo un amplificado de 400 pares de bases (pb), en donde se comprobó que el amplificado que declaraban los primers de 266pb no era correcto. Ya que cuando se realizó el diseño de los primers el programa bioinformático declaraba un amplificado de 266pb, pero experimentalmente se calculó el tamaño del amplificado con un marcador de peso molecular (carril M) de Bioline “HyperLadder 100bp” el cual nos indicó que el tamaño del amplificado era de 400pb. También se observa que no hubo contaminación en las muestras al realizar la PCR ni al cargar el gel pues no hubo una banda visible en el blanco (carril B), debido a que el blanco permite detectar posibles contaminaciones.

Tras varias experimentaciones no se logró una visualización para los granos de cacao (carriles dC4, dC3, dC2 y dC1) con los componentes de Master Mix®, ya que los granos son sometidos a procesos térmicos para su posterior transformación, por lo que no se lograron distinguir amplificados, por esta razón se optó por realizar PCR con los



componentes del Kit “Phire Plant Direct PCR”, tanto para granos como para chocolates. Mientras que para plantas se siguió realizando por Master Mix®.

### ESPECIFICIDAD DE LOS PRIMERS

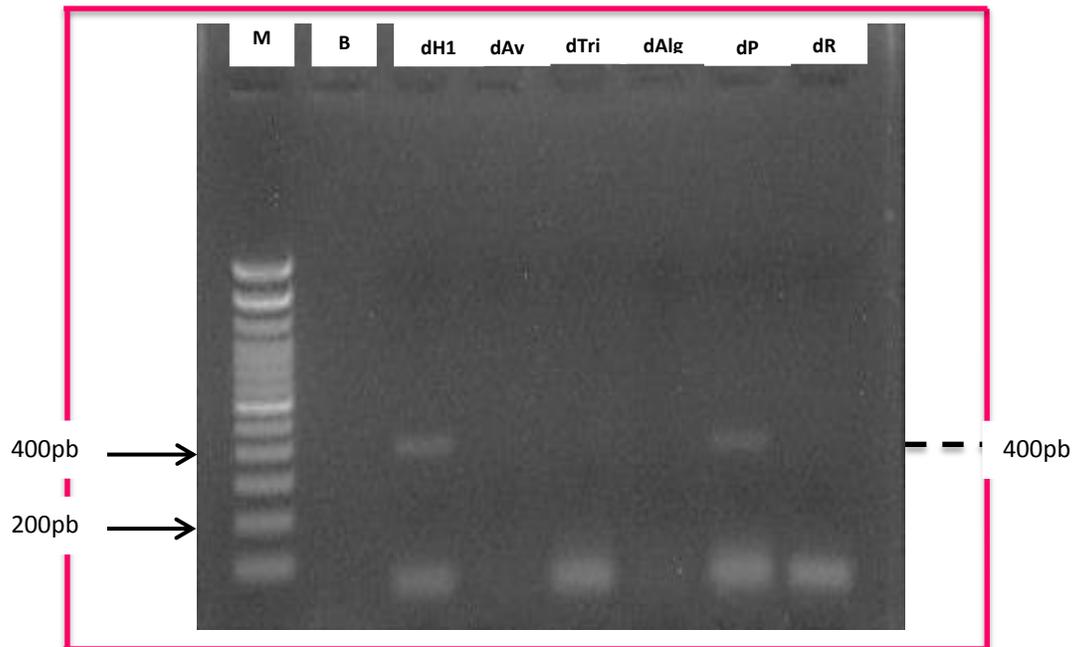
Obteniendo el control positivo de la muestra de cacao se comprobó la especificidad de los primers utilizando ADN de especies filogenéticamente cercana (algodón) y filogenéticamente lejanas (trigo, avena, pollo, y res) (Tabla 12).

**Tabla 12. Cuantificación y pureza del ADN de las muestras filogenéticamente cercana y lejanas al cacao.**

| MUESTRAS       | ADN [ ]<br>ng/μl | PUREZA<br>260/280 | NOMENCLATURA | ADN<br>DILUIDO<br>ng/μl | PUREZA<br>260/280 |
|----------------|------------------|-------------------|--------------|-------------------------|-------------------|
| <b>Cacao</b>   | 1411.3           | 1.72              | <b>dH1</b>   | 68.5                    | 1.62              |
| <b>Algodón</b> | 1883.7           | 1.55              | <b>dAlg</b>  | 62.2                    | 1.52              |
| <b>Avena</b>   | —                | —                 | <b>dAv</b>   | 63.9                    | 1.74              |
| <b>Trigo</b>   | —                | —                 | <b>dTri</b>  | 78.5                    | 1.73              |
| <b>Pollo</b>   | —                | —                 | <b>dP</b>    | 64.4                    | 1.69              |
| <b>Res</b>     | —                | —                 | <b>dR</b>    | 72.2                    | 1.90              |

Para verificar la especificidad de los primers, se utilizaron las muestras de ADN diluido con una concentración cercana a 60ng/μl. La pureza de las muestras filogenéticamente cercana (dAlg) y lejanas (dAv, dTri, dP, dR) al cacao, demuestran que hubo contaminación significativa con proteínas en el ADN ya que hubo valores menores a 1.8 en todas las muestras a excepción de dR (res), en la cual se observa la presencia de ARN pues se obtuvo un valor mayor a 1.8. Aun así el ADN de las muestras puede ser utilizado en PCR.

Se aplicó la técnica de PCR a las especies filogenéticamente lejanas al cacao utilizando los primers específicos de (*Theobroma cacao L*), y los componentes mostrados en la Tabla 9. Con el programa de la Figura 28, para verificar la especificidad de los mismos. Los resultados obtenidos se muestran en el siguiente gel (Figura 32).



**Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V para la identificación de cacao en especies filogenéticamente cercana y lejanas, mediante PCR punto final; (M) Marcador de Peso Molecular de 100 pb; (B) Blanco; (dH1) Control Positivo hoja de cacao de Chiapas; (dAv) Avena; (dTri) Trigo; (dAlg) Algodón; (dP) Pollo; (dR) Res.**

La especificidad de los “primers” es un factor importante para fines de este estudio, en donde se esperaba únicamente la identificación de cacao. Los “primers” diseñados resultaron no ser tan específicos para la identificación de esta especie, pues en la Figura 35 se observa un amplificado de 400pb para el control positivo la hoja de la planta de cacao procedente de Chiapas (carril dH1), como para la muestra de pollo (carril dP).

En la base de datos (NCBI), se aseguraba que la pareja de “primers” era específica para cacao así como para algunas variedades de Algodón y Aves, sin embargo, de manera experimental no amplificó la muestra de algodón (carril dAlg), en ninguna de las repeticiones realizadas, mientras que para la muestra de pollo (carril dP), amplificó cada vez que se realizó la prueba.

Realizada la especificidad de los primers se prosiguió a realizar la cuantificación obteniendo los siguientes resultados para de plantas de cacao (Tabla 13), y para granos de cacao (Tabla 14), para poder realizar la PCR con Master Mix® para las muestras de plantas de cacao y el Kit “Phire Plant Direct PCR” para los de granos de cacao y así poder verificar que son propios de esta especie.



### 3.2 Objetivo Particular 2

“Realizar la técnica de PCR con los primers diseñados para identificar la especie *Theobroma cacao* L. en hojas y frutos de plantas de cacao”.

#### IDENTIFICACION DE *THEOBROMA CACAO* L. EN HOJAS DE PLANTAS DE CACAO

Tabla 13. Cuantificación y pureza del ADN de hojas de plantas de cacao.

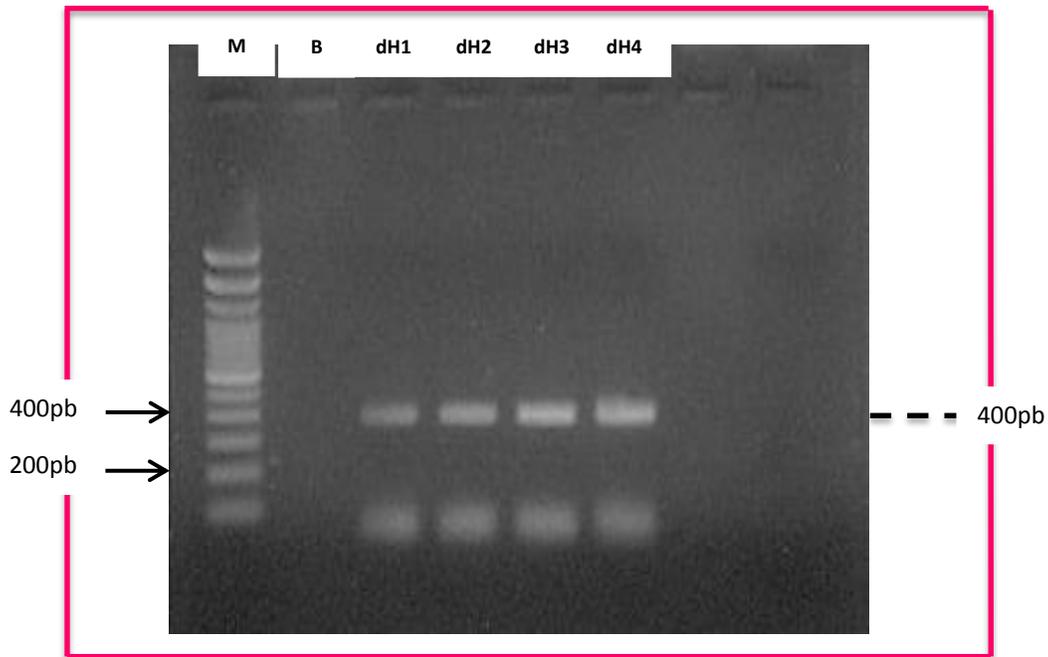
| MUESTRAS  | ADN [ ]<br>ng/μl | PUREZA<br>260/280 | NOMENCLATURA | ADN<br>DILUIDO<br>ng/μl | PUREZA<br>260/280 |
|-----------|------------------|-------------------|--------------|-------------------------|-------------------|
| <b>H1</b> | 1411.3           | 1.72              | <b>dH1</b>   | 68.5                    | 1.62              |
| <b>H2</b> | 1806.7           | 1.82              | <b>dH2</b>   | 67.4                    | 1.66              |
| <b>H3</b> | 1388.1           | 1.75              | <b>dH3</b>   | 71.9                    | 1.59              |
| <b>H4</b> | 233.3            | 1.75              | <b>dH4</b>   | 56.6                    | 1.61              |

Se utilizaron las muestras de ADN diluido (dH1, dH2, dH3, y dH4), ya que se buscaba que tuvieran una concentración cercana a 60ng/. Los resultados de la relación 260/280 para las muestras de ADN diluido utilizadas de plantas de cacao revelan que durante la extracción hubo contaminación significativa con proteínas en el ADN ya que hubo valores menores a 1.8 en todas las muestras. Por otra parte la concentración de ADN es adecuada para su uso en PCR.

Varias proteínas, carbohidratos y otros compuestos orgánicos pueden interferir con las ADN polimerasas termoestables (Schwab *et al.*, 1995) ya sea mediante el bloqueo directo total o parcial de su actividad catalítica o mediante la unión directa al ADN de doble cadena. Por ejemplo, algunas sustancias interaccionan con los iones Mg (un cofactor crítico de la actividad catalítica) o disminuyen su disponibilidad pudiendo inhibir la PCR (Microbial, 2009). Es por esta razón que para las hojas de plantas de cacao se pueden obtener amplificadas con PCR con Master Mix® y no para para granos de cacao ya que es un alimento rico en carbohidratos, grasa y proteínas como se muestra en la (Tabla 2) y chocolates que también cuentan con algunas sustancias inhibitoras que afectan como por ejemplo polisacáridos complejos, proteínas como la leche, Iones de calcio (leche) (Microbial, 2009).



Por ellos para estos dos últimos se necesita de una enzima más eficiente para poder obtener amplificadas.



**Figura 33.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V para la identificación de cacao en Plantas de cacao, mediante PCR punto final; (M) Marcador de Peso Molecular de 100 pb; (B) Blanco; (dH1) Control Positivo Hoja de Cacao de Chiapas; (dH2) Planta de vivero de Yautepec Morelos; (dH3) Planta de Costa Chica Acapulco; (dH4) Planta de Costa Grande Acapulco.

En el siguiente gel (Figura 33) de agarosa al 1.5% se observan amplificadas para todas las muestras (carriles dH2, dH3 y dH4) comprobando que las plantas analizadas eran de cacao al coincidir con el amplificado del control positivo (carril dH1) de 400pb. También se observó que no hubo contaminación al realizar la PCR así como al cargar el gel, pues no hubo una banda visible en la columna del blanco (carril B), debido a que el blanco permite detectar posibles contaminaciones.



**IDENTIFICACIÓN DE *THEOBROMA CACAO L.* EN FRUTOS (GRANOS)**

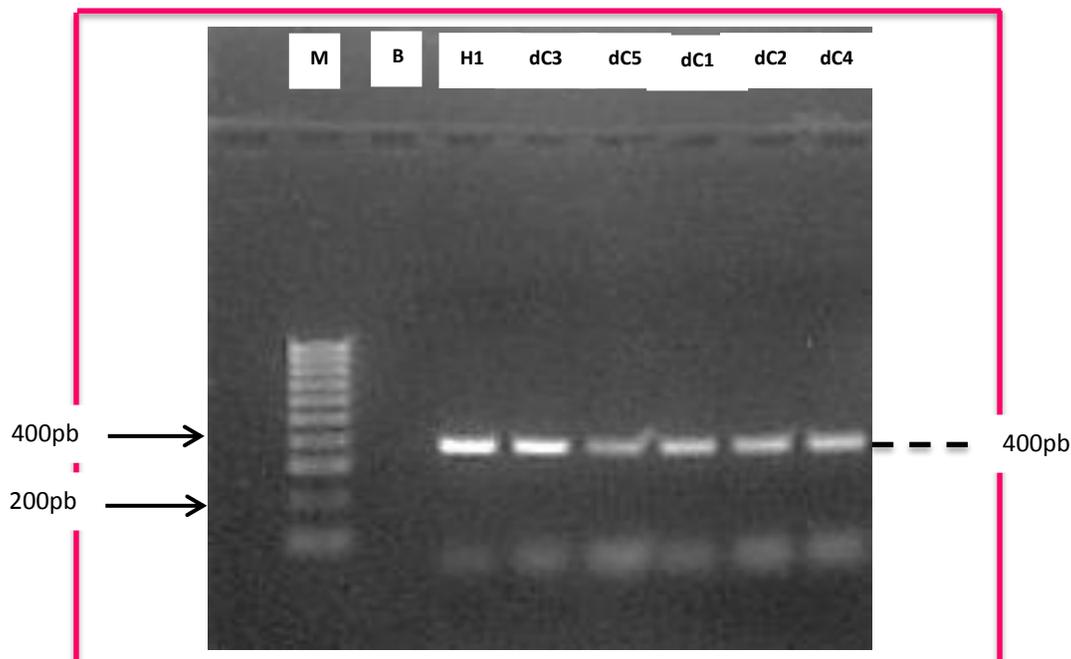
**Tabla 14. Cuantificación y pureza del ADN de granos de cacao.**

| MUESTRAS  | ADN [ ]<br>ng/μl | PUREZA<br>260/280 | NOMENCLATURA | ADN<br>DILUIDO<br>ng/μl | PUREZA<br>260/280 |
|-----------|------------------|-------------------|--------------|-------------------------|-------------------|
| <b>C1</b> | 1813.1           | 1.14              | <b>dC1</b>   | 307.4                   | 1.35              |
| <b>C2</b> | 1535.0           | 1.66              | <b>dC2</b>   | 476.6                   | 1.90              |
| <b>C3</b> | 1484.6           | 1.66              | <b>dC3</b>   | 490.6                   | 1.89              |
| <b>C4</b> | 1979.5           | 1.75              | <b>dC4</b>   | 449.8                   | 1.92              |
| <b>C5</b> | 1439.5           | 1.74              | <b>dC5</b>   | 481.9                   | 2.03              |

Se diluyeron las muestras concentradas con agua libre de nucleasas hasta alcanzar una concentración de 500ng/μL para PCR Directa, ya que a esta concentración se visualizaron mejor los amplificadores, pues a mayores concentraciones no se visualizaban los fragmentos.

Los resultados de la relación 260/280 para las muestras utilizadas (ADN diluido) de granos de cacao, manifiestan que hubo contaminación significativa con proteínas en el ADN como es el caso de la muestra (dC1) ya que hubo valores de pureza menores a 1.8 y en algunas muestras se observa la presencia de ARN como se observa en las muestras (dC2, dC3, dC4 y dC5) teniendo valores mayores a 1.8. Por otra parte la concentración de ADN es adecuada para su uso en la PCR, por lo que se realizó su posterior visualización en un gel de agarosa.

Se realizó la PCR para *Theobroma cacao L.* con los componentes del Kit “Phire Plant Direct PCR” (Tabla 10), con el programa de la Figura 29, ya que este kit cuenta con una enzima más eficiente que la de Master Mix®, necesaria para la amplificación de los granos de cacao, ya que estos pasan por algunos procesos térmicos como es el tostado, para su posterior transformación en subproductos, degradando el ADN, teniendo como resultado que no hubieran amplificadores por PCR con Master Mix®. Se utilizó el ADN concentrado del control positivo (H1) tanto para granos como para chocolates.



**Figura 34.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V para identificación de cacao en granos de cacao, mediante PCR directa; (M) Marcador de Peso Molecular de 100 pb; (B) Blanco; (H1) Control Positivo Hoja de Cacao de Chiapas; (dC3) Cacao de Tlalnepantla; (dC5) Cacao de Oaxaca; (dC1) Cacao de Tabasco; (dC2) Cacao de Mazatan Chiapas; (dC4) Cacao de Chiapas.

En la Figura 34 se pueden observar 6 bandas de amplificación correspondientes a las muestras de granos de cacao (carriles dC3, dC5, dC1, dC2 y dC4) así como para el control positivo (carril H1) teniendo un amplificado de 400pb, lo que reafirma que los granos analizados son legítimos de la especie.

### 3.3 Objetivo Particular 3

*“Aplicar la técnica de PCR a los productos procesados utilizando primers específicos para detectar la presencia de cacao”.*

#### IDENTIFICACIÓN DE *THEOBROMA CACAO L.* EN PRODUCTOS PROCESADOS

Se realizó la extracción de 16 muestras de chocolates utilizando el protocolo de Sambrook 2001 detallado anteriormente, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 15):



**Tabla 15. Cuantificación y pureza del ADN de muestras de chocolates artesanales y comercializados en el país.**

| MUESTRAS      | ADN [ ]<br>ng/μl | PUREZA<br>260/280 | NOMENCLATURA   | ADN<br>DILUIDO<br>ng/μl | PUREZA<br>260/280 |
|---------------|------------------|-------------------|----------------|-------------------------|-------------------|
| <b>Ch T</b>   | 4445.4           | 1.85              | <b>dCh T</b>   | 2674.8                  | 1.79              |
| <b>Ch R</b>   | 4640.6           | 1.70              | ----           | ----                    | ----              |
| <b>Ch L</b>   | 3635.2           | 2.01              | ----           | ----                    | ----              |
| <b>Ch</b>     | 4334.9           | 1.73              | ----           | ----                    | ----              |
| <b>Ch X</b>   | 4022.6           | 1.85              | ----           | ----                    | ----              |
| <b>Ch Ca</b>  | 4494.5           | 1.57              | <b>dCh Ca</b>  | 634.1                   | 1.50              |
| <b>Ch I</b>   | 4268.7           | 1.60              | <b>dCh I</b>   | 520.0                   | 1.66              |
| <b>Ch Co</b>  | 3940.4           | 1.42              | <b>dCh Co</b>  | 500.7                   | 1.44              |
| <b>Ch H</b>   | 3085.3           | 1.74              | <b>dCh H</b>   | 406.1                   | 1.75              |
| <b>Ch E</b>   | 3429.5           | 1.44              | <b>dCh E</b>   | 554.6                   | 1.49              |
| <b>Ch To</b>  | 2066.7           | 1.77              | <b>dCh To</b>  | 520.9                   | 2.00              |
| <b>Ch Mi</b>  | 2566.0           | 1.88              | <b>dCh Mi</b>  | 527.1                   | 2.08              |
| <b>Ch Cru</b> | 2955.7           | 1.82              | <b>dCh Cru</b> | 536.3                   | 1.99              |
| <b>Ch Kit</b> | 2155.0           | 1.80              | <b>dCh Kit</b> | 505.2                   | 2.00              |
| <b>Ch Her</b> | 2735.0           | 1.50              | <b>dCh Her</b> | 494.0                   | 1.53              |
| <b>Ch Nes</b> | 3008.1           | 1.42              | <b>dCh Nes</b> | 540.6                   | 1.49              |

---- no realizado

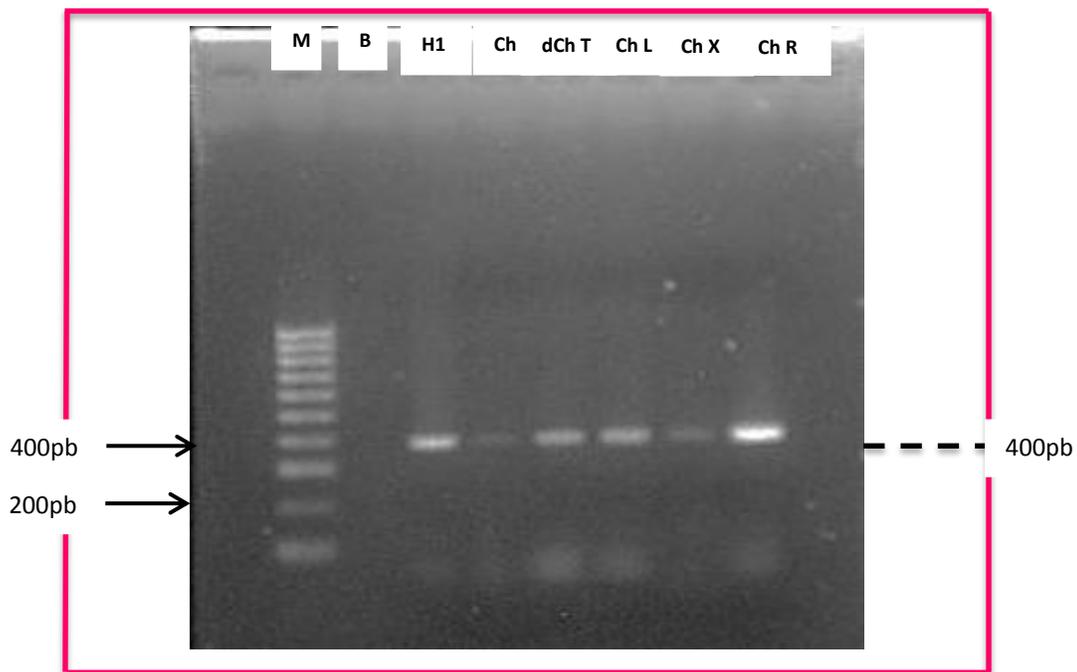
Para la realización de PCR Directa se efectuaron varias pruebas para lograr amplificadores más visibles, primero se utilizaron las muestras de ADN concentrado observándose que los amplificadores no eran tan visibles por lo que se prosiguió a diluirlos obteniéndose un amplificador más nítido. Visualizándose mejor los amplificadores a una concentración cercana a 500ng/μL, pues al igual que en el caso de los granos de cacao para la elaboración de chocolates se llevan a cabo bajo algunos procesos térmicos.

Se utilizaron las muestras de ADN concentrado de chocolates artesanales (Ch R, Ch y Ch X) y comercializados en México (Ch L) y ADN diluido de chocolates artesanales (dCh Ca y dCh I) y comercializados en México (dCh T, dCh Co, dCh H, dCh E, dCh To, dCh Mi, dCh Cru, dCh Kit, dCh Her y dCh Nes). Los resultados de la relación 260/280 demuestran que durante la extracción de chocolates hubo contaminación significativa con proteínas en el ADN ya que hubo valores menores a 1.8, como se observa en las muestras (Ch R, Ch, dCh Ca, dCh I,



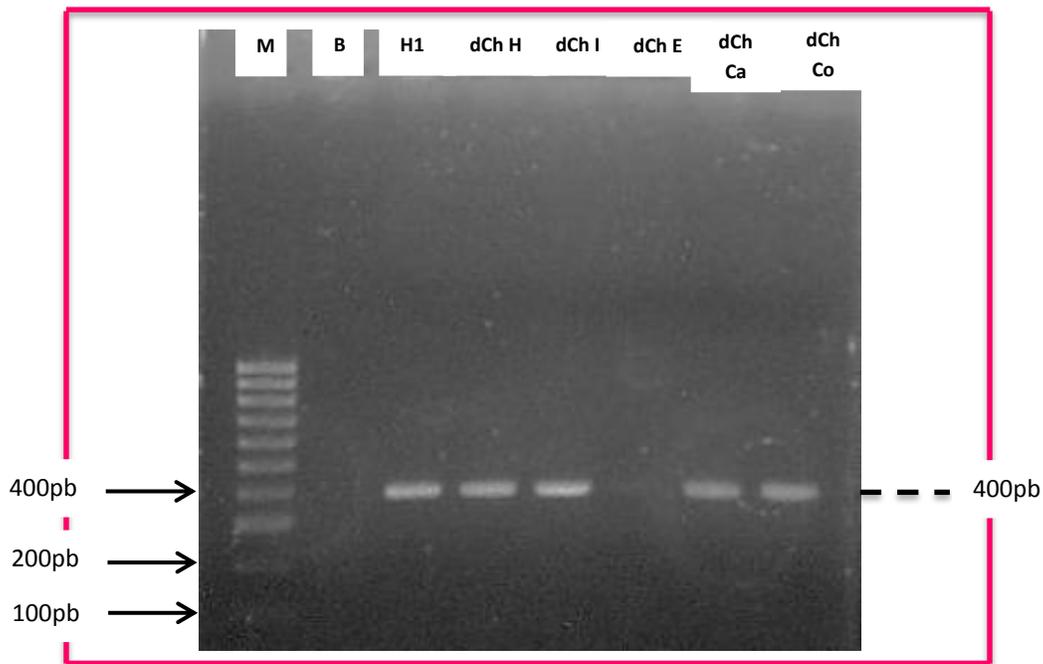
dCh Co, dCh H, dCh E y dCh Nes) y en algunas muestras (Ch L, dCh To, dCh Mi, dCh Cru, dCh Kit) se observa la presencia de ARN ya que hubo valores mayores a 1.8. Siendo las muestras (dCh T, Ch X y dCh H), las mejores pues tuvieron un valor muy cercano a 1.8, pues tuvieron preparaciones más puras en su ADN. Por otra parte la concentración de ADN es adecuada para su uso en PCR.

La visualización de los fragmentos se realizó en un gel de agarosa al 1.5% para la detección de cacao en los productos, utilizando los componentes del Kit "Phire Plant Direct PCR", siguiendo las condiciones del programa de PCR Directa para *Theobroma cacao L.* (Figura 29).



**Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V para identificación de cacao en chocolates mediante PCR directa; (M) Marcador de Peso Molecular de 100 pb; (B) Blanco; (H1) Control Positivo Hoja de Cacao de Chiapas; (Ch) Chocolate Como el Origen; (dCh T) Chocolate Turin; (Ch L) Chocolate Lindt mini eggs; (Ch X) Chocolate Xofia; (Ch R) Chocolate Ranek.**

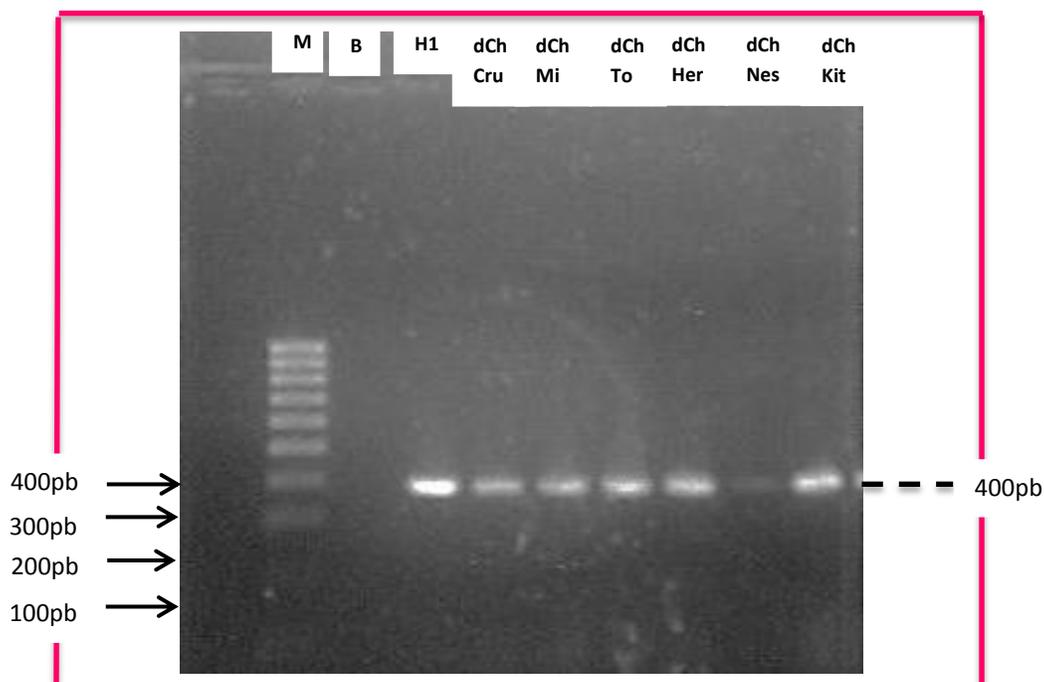
En el gel (Figura 35) de agarosa al 1.5% se observan 6 bandas de amplificación, los carriles Ch, Ch X y Ch R pertenecientes a muestras de chocolates artesanales, así como para los carriles dCh T y Ch L pertenecientes a muestras comercializadas en México y el carril H1 del control positivo, coincidiendo con un amplificado de 400pb comprobándose la presencia de *Theobroma cacao L.* en los productos. Para los carriles Ch y Ch R amplifico muy tenue, pero se observa la presencia de la especie.



**Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V para identificación de cacao en chocolates mediante PCR directa; (M) marcador de Peso Molecular de 100 pb; (B) Blanco; (H1) Control Positivo Hoja de Cacao de Chiapas; (dCh H) Chocolate Lindt “Hello my name is cookies”; (dCh I) Chocolate La Ixtla; (dCh E) Chocolate Excellence Lindt; (dCh Ca) Chocolate Cazuela, Comal y Cacao; (dCh Co) Chocolate Colombiano “Casa Luker”.**

En la Figura 36 se muestran los resultados de la PCR directa de las muestras de chocolates artesanales (carriles dCh I y dCh Ca) las cuales amplificaron confirmando la existencia de cacao en los productos; así también para las muestras comercializadas en México (carriles dCh H y dCh Co) se observa la presencia de cacao, concordando con el amplificado del control positivo (carril H1) de 400pb. Como se puede observar la muestra (dCh E) no amplificó para la detección de cacao, pese a que se realizaron 3 repeticiones, porque probablemente se pudo haber degradado el ADN con algún otro ingrediente con el que es hecho ese chocolate.

En la Figura 37 se observan los amplificados de la PCR de muestras de chocolates comercializadas en México (carriles dCh Cru, dCh Mi, dCh To, dCh Her, dCh Nes y dCh Kit), las cuales amplificaron confirmando la presencia de *Theobroma cacao L.* en los productos coincidiendo con el amplificado del control positivo (carril H1) de 400pb; sin embargo la muestra (carril dCh Nes) amplificó muy tenue, debido a que el contenido de cacao en el producto es muy bajo pues en su etiqueta menciona que contiene cacao mas no especifica el porcentaje de cacao, por lo que no se logró una visualización como en las demás muestras, pues la concentración de ADN no fue la suficiente para lograr ver una banda más clara.



**Figura 37.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90 V para identificación de cacao en chocolates mediante PCR directa; (M) Marcador de Peso Molecular de 100 pb; (B) Blanco; (H1) Control Positivo Hoja de Cacao de Chiapas; (dCh Cru) Chocolate Crunch; (dCh Mi) Chocolate Milka Oreo (Alemania); (dCh To) Chocolate Tobleron (Suiza); (dCh Her) Chocolate Hersheys; (dCh Nes) Chocolate Nesquik; (dCh Kit) Chocolate Kit Kat.

### 3.4 Objetivo Particular 4

*“Seleccionar los primers específicos para detectar el promotor CaMV35S y el terminador T-NOS mediante trabajos previos, para utilizarlos en la detección de cacao transgénico”.*

Después de corroborar que los primers diseñados para *Theobroma cacao L.* amplificaran en la zona de interés tanto para plantas y granos de cacao así como para los productos comerciales donde se comprobó que realmente contenían cacao, se llevó a cabo la PCR directa del ADN de todas las muestras analizadas para determinar la presencia de organismos genéticamente modificados utilizando los primers del promotor CAMV35S y del terminador T-NOS.

Para obtener los amplificados de los transgénicos se utilizaron los primers del trabajo previo “QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs)” (Karamollaoglu *et al.*, 2009). Con amplificados de CAMV 195 pb y T-NOS 180 pb



respectivamente, en caso de que una muestra amplifique en alguna de ellas indicaría que ha sido modificada genéticamente usando la secuencia del promotor o terminador correspondiente.

Se realizó la lisis celular para extraer el ADN utilizando el Buffer de extracción del Kit “*Phire Plant Direct PCR*” de un maíz transgénico, el cual se utilizó como control positivo para la identificación de OGM.

### **3.5 Objetivo Particular 5**

*“Aplicar la técnica de PCR a los productos naturales (hojas y frutos de plantas de cacao) y procesados de cacao utilizando los primers específicos, el promotor CaMV35S y el terminador T-NOS para detectar la presencia de cacao genéticamente modificado”.*

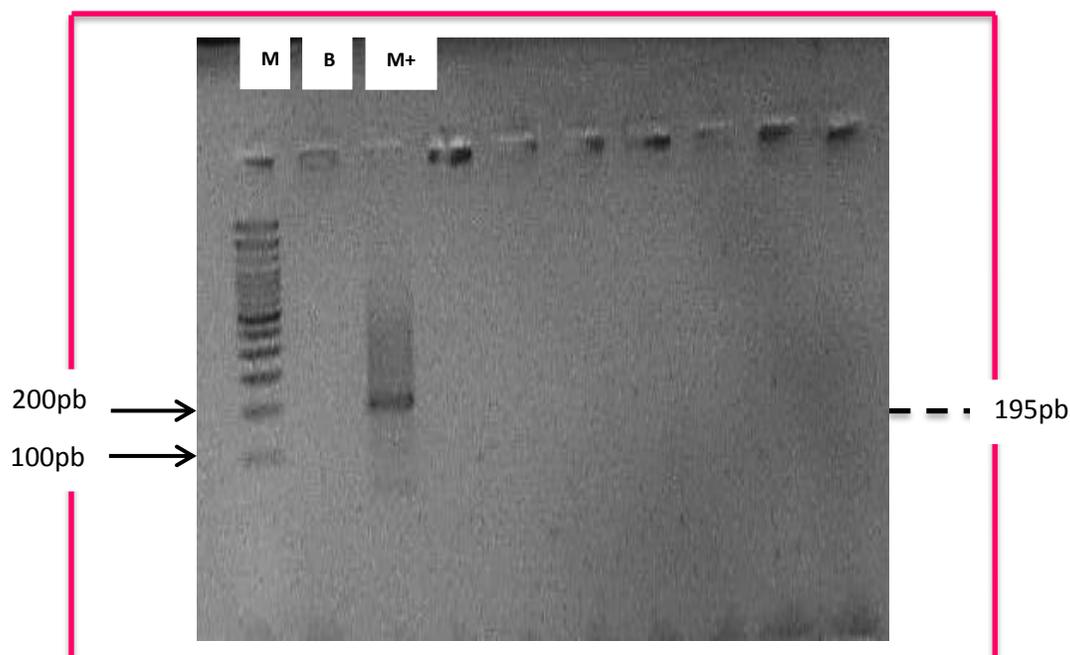
#### **IDENTIFICACIÓN DEL CONTROL POSITIVO CON EL GEN CAMV35S**

Se evaluaron las muestras que amplificaron en el Objetivo 2, al amplificar el ADN se aseguró que se trataba de muestras que en realidad contenían cacao. Mediante la técnica de PCR se buscó detectar la secuencia parcial de los genes de CaMV35S y T-NOS.

#### **Amplificación del gen CaMV35S**

Se realizó PCR mediante el Kit “*Phire Plant Direct PCR*”, las muestras extraídas de las hojas de plantas de cacao (Tabla 13); las muestras de granos de cacao (Tabla 14) y las muestras de chocolates (Tabla 15) para la identificación de Organismos Genéticamente Modificados, se tomaron las condiciones del programa de PCR Directo (Figura 30) para el promotor CAMV35S respetando la temperatura de hibridación de los primers que es de 62.2°C.

Para asegurar la presencia de Organismos Genéticamente Modificados se utilizó como control positivo: una muestra de maíz transgénico que contenía el gen de CaMV35S y de T-NOS.



**Figura 38.** Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60 V. Para la verificación de la amplificación del gen de CaMV35S 195pb, en el Control Positivo mediante PCR directa; (M) Marcador de Peso Molecular de 100 pb; (B) Blanco; (M+) Control Positivo Maíz Transgénico.

Como se observa en el gel (Figura 38) de agarosa al 2.5% se visualizó el amplificado de la muestra del grano de maíz transgénico (carril M+), el cual se tomó como control positivo para verificar que las demás muestras amplificaran a esas condiciones, obteniendo el amplificado que declaraban los primers de 195pb que se corrobora con el carril M, el marcador de peso molecular cercano al fragmento de 200pb. También se observó que no hubo contaminación al realizar la PCR así como al cargar el gel, pues no hubo una banda visible en la columna del blanco (Carril B, control negativo), debido a que el blanco permite detectar posibles contaminaciones.



IDENTIFICACIÓN DE OGM EN HOJAS DE PLANTAS DE CACAO CON CAMV35S

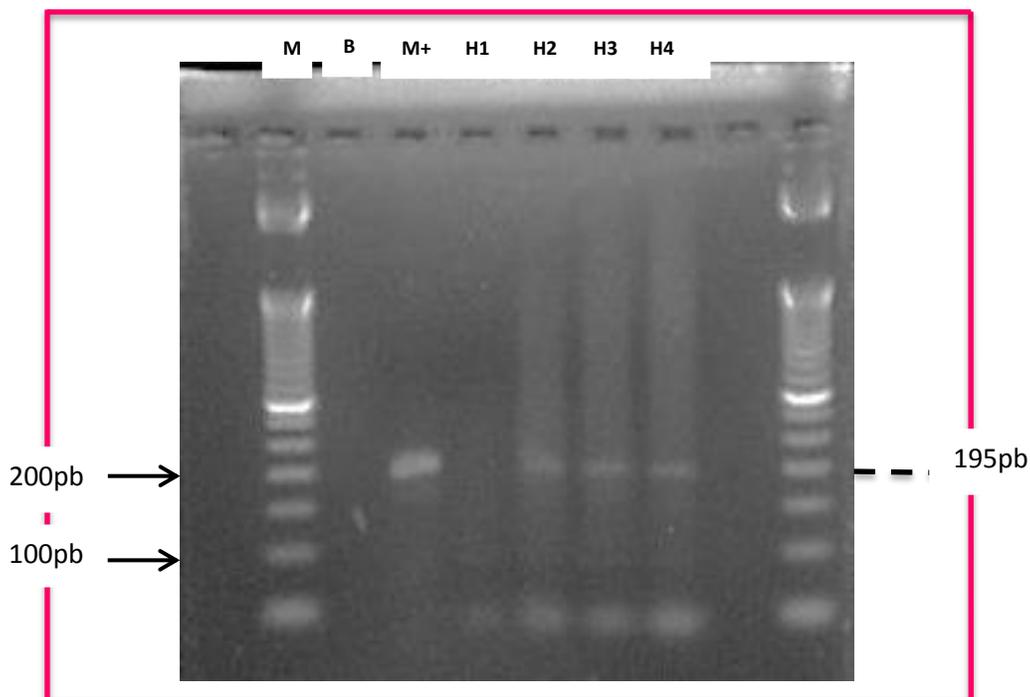


Figura 39. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60 V para la amplificación del gen de CAMV35S en Plantas de Cacao mediante PCR directa; (M) Marcador de Peso Molecular de 50 pb; (B) Blanco; (M+) Control Positivo Maíz Transgénico; (H1) Planta de Chiapas; (H2) Planta de vivero de Yautepec Morelos; (H3) Planta de Costa Chica Acapulco; (H4) Planta de Costa Grande Acapulco.

En la Figura 39 se observa el amplificado del control positivo (carril M+) a 195pb que es utilizado para detectar presencia de transgénicos, la cual indica que la reacción se llevó a cabo adecuadamente; en este gel se evaluaron las muestras de ADN concentrado de las hojas de plantas de cacao, para 3 de las muestras de hojas de cacao (carriles H2, H3 Y H4) se visualizó el amplificado de 195pb que indica la presencia del promotor CaMV35S, confirmando que algunas muestras estudiadas son genéticamente modificadas.

Al tratarse de plantas de cacao procedentes de nuestro país, no se esperaba obtener un resultado positivo en estas muestras, pero es necesario mencionar que la muestra del carril H2 es una planta de un vivero y que las muestras ubicadas en los carriles H3 y H4 pertenecen a personas que tenían un árbol en su casa sin el fin de obtener granos de cacao para venta, siendo desconocido el origen del grano del que nacieron. Sin embargo la muestra (carril H1) que no amplificó, fue obsequiada del Festival Artesanal de Cacao y Chocolate, siendo su origen una plantación perteneciente al Estado de Chiapas.



IDENTIFICACIÓN DE OGM EN FRUTOS CACAO (GRANOS) CON CAMV35S

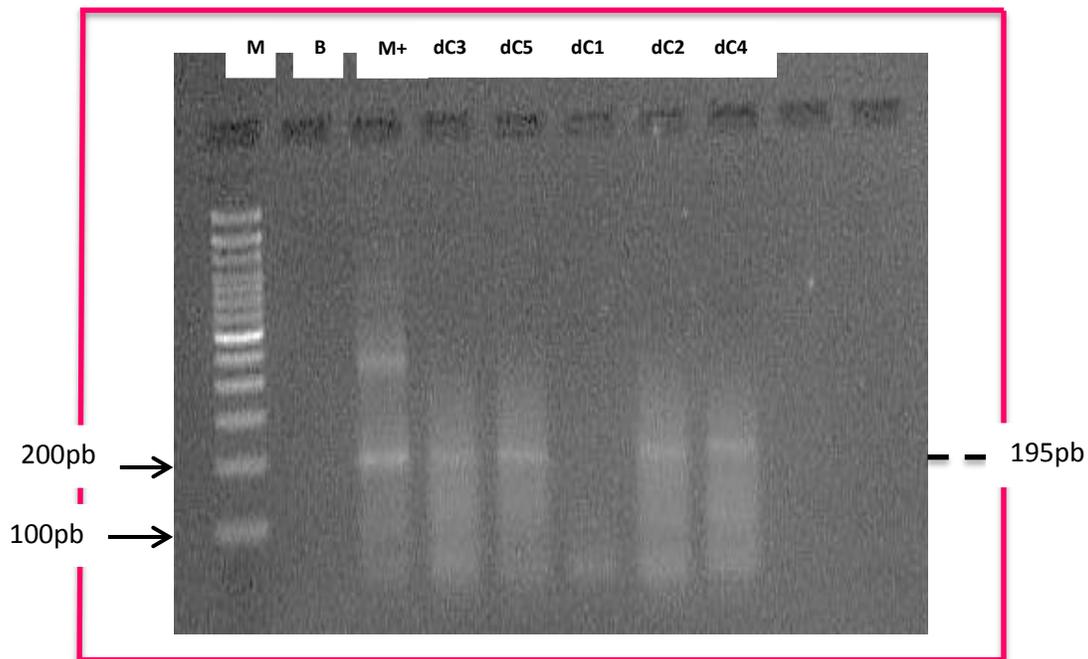


Figura 40. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60 V para la amplificación del gen de CAMV35S en granos de cacao mediante PCR con Master Mix®; (M) Marcador de Peso Molecular de 100 pb; (B) Blanco; (M+) Control Positivo Maíz Transgénico; (dC3) Grano de Tlalnepantla; (dC5) Grano de Oaxaca; (dC1) Grano de Tabasco; (dC2) Grano de Mazatan Chiapas; (dC4) Grano de Chiapas.

En el siguiente gel (Figura 40) de agarosa al 2.5% se observan 5 bandas de amplificación que corresponden a las muestra de granos de cacao (carriles dC3, dC5, dC2 y dC4), en la cual se visualiza un amplificado de 195pb, coincidiendo con el control positivo (carril M+), garantizando que esos granos sufrieron alguna modificación genética.

Estas muestras al tratarse de granos nacionales, no se esperaba obtener un resultado positivo o si se encontraba fuera menor al de las plantas de cacao, pues algunos de estos granos como dC2 y dC4 pertenecen a plantaciones muy grandes del Estado de Chiapas y dC5 del Estado de Oaxaca, mientras que dC3 fue adquirida en el mercado, del que no se conoce su origen.



IDENTIFICACIÓN DE OGM EN PRODUCTOS COMERCIALIZADOS CON CAMV35S

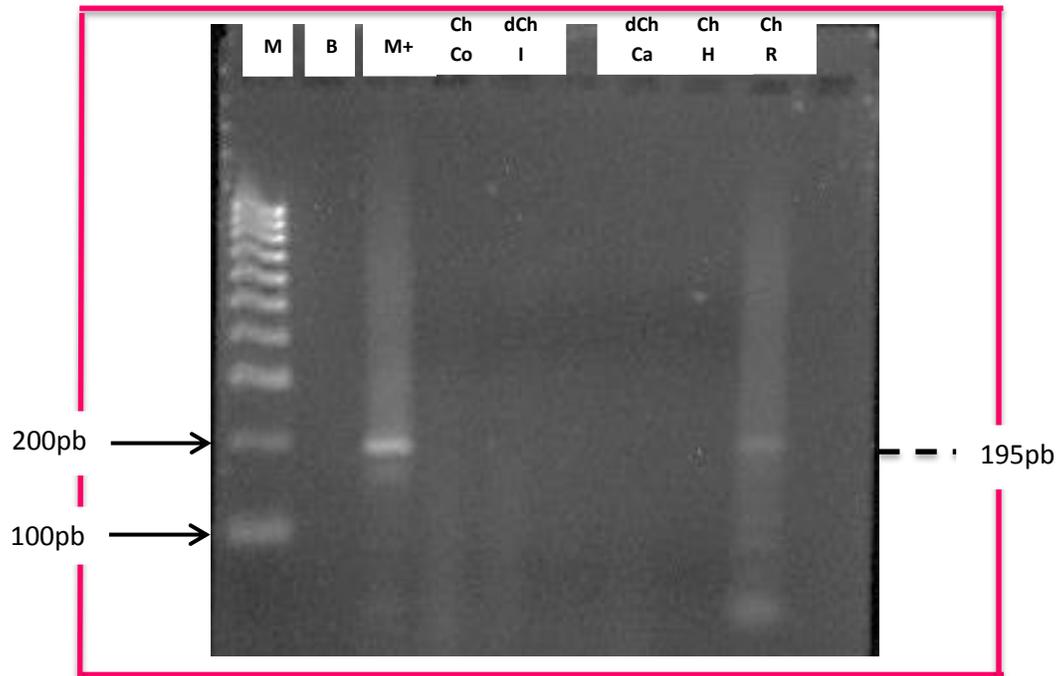


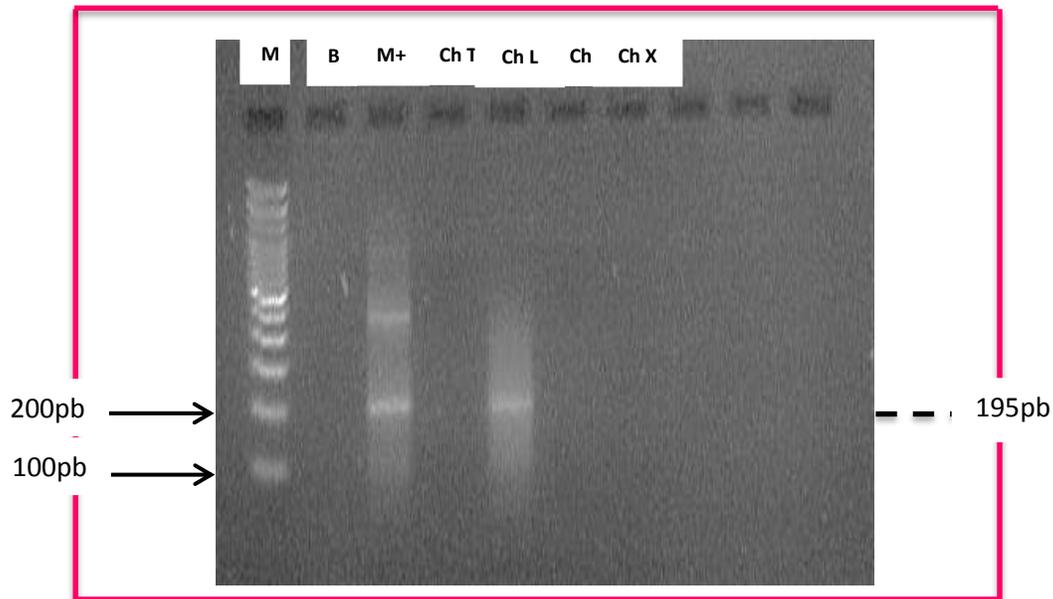
Figura 41. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60 V para amplificación del gen CAMV35S en chocolates mediante PCR directa; (M) Marcador de Peso Molecular de 100 pb; (B) Blanco; (M+) Control Positivo Maíz Transgénico; (Ch Co) Chocolate Colombiano “Casa Luker”; (dCh I) Chocolate La Ixtla; ; ; (dCh Ca) Chocolate Cazuela, Comal y Cacao; (Ch H) Chocolate Lindt “Hello my name is cookies”; (Ch R) Chocolate Ranek.

En el siguiente gel (Figura 41) de agarosa al 2.5% se evaluaron algunas de las muestras de chocolates artesanales (carriles dCh I, dCh Ca y Ch R), así como de algunos chocolates comercializados en México (carriles Ch Co y Ch H), en la cual se visualiza la presencia del promotor CaMV35S para la muestra del chocolate (carril ChR), coincidiendo con el amplificado del control positivo (carril M+) de 195pb, garantizando que esa muestra es genéticamente modificada.

Esta muestra al tratarse de un chocolate artesanal mexicano, no se esperaba obtener un resultado positivo, pero es necesario mencionar que el grano de cacao con el que fue elaborado pudo pertenecer de otro país (Villamil, 2016), pues México no es autosuficientes con el grano que se produce (Patiño, 2017).



En la Figura 42 se analizaron algunas muestras de chocolates artesanales (carriles Ch y Ch X), así como algunas muestras de chocolates comercializados en el país como (carriles Ch L, Ch T), obteniendo 2 amplificados que corresponden a la muestra del chocolate Lindt (carril Ch L) y a la muestra del maíz transgénico (carril M+), probando que la muestra examinada es genéticamente modificada al observar el amplificado de 195pb del promotor CaMV35S.



**Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60 V para amplificación del gen CAMV35S en chocolates mediante PCR directa; (M) Marcador de Peso Molecular de 100 pb; (B) Blanco; (M+) Control Positivo Maíz Transgénico; (Ch T) Chocolate Turin; (Ch L) Chocolate Lindt mini eggs; (Ch) Chocolate Como el Origen; (Ch X) Chocolate Xofia.**

En la Figura 43 se analizaron algunas muestras de chocolates comercializados en México (carriles dCh Kit, dCh Cru, dCh Nes, dCh Mi, dCh To y dCh Her) observándose 5 bandas de amplificación para las muestras ubicadas en los carriles dCh Kit, dCh Cru, dCh Mi y dCh To y para el control positivo (carril M+) coincidiendo en un amplificado de 195pb, cercano al carril M, próximo al fragmento de 200pb, que declara la presencia del promotor CaMV35S, y al no amplificar el blanco (control negativo, carril B) se asegura que no hubo contaminación al realizar la técnica ni al cargar el gel, probando que las muestras examinadas son genéticamente modificadas.

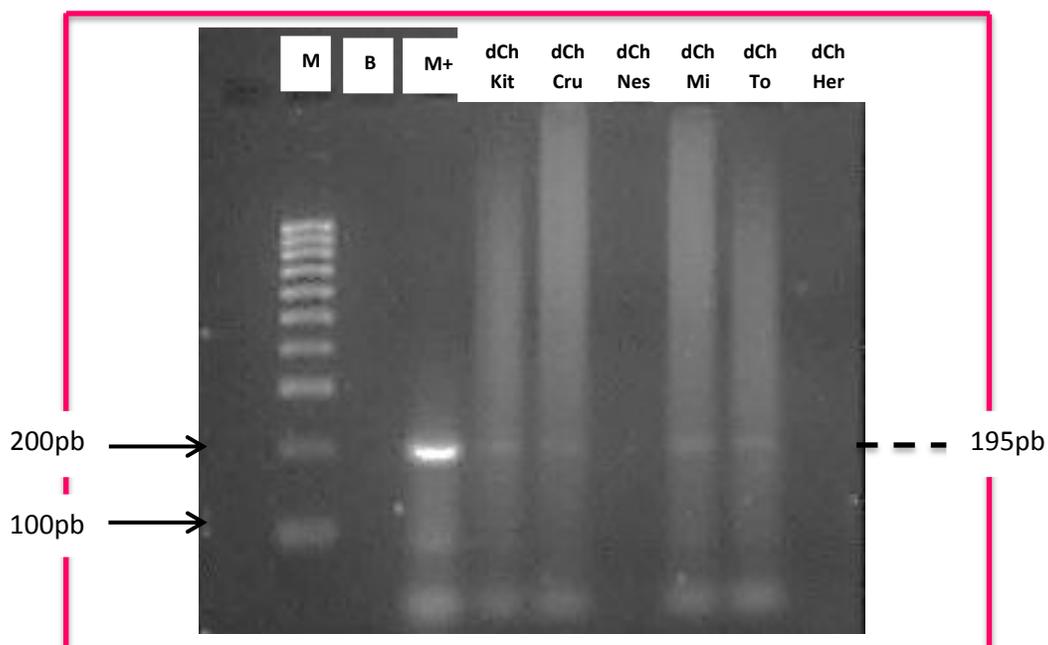
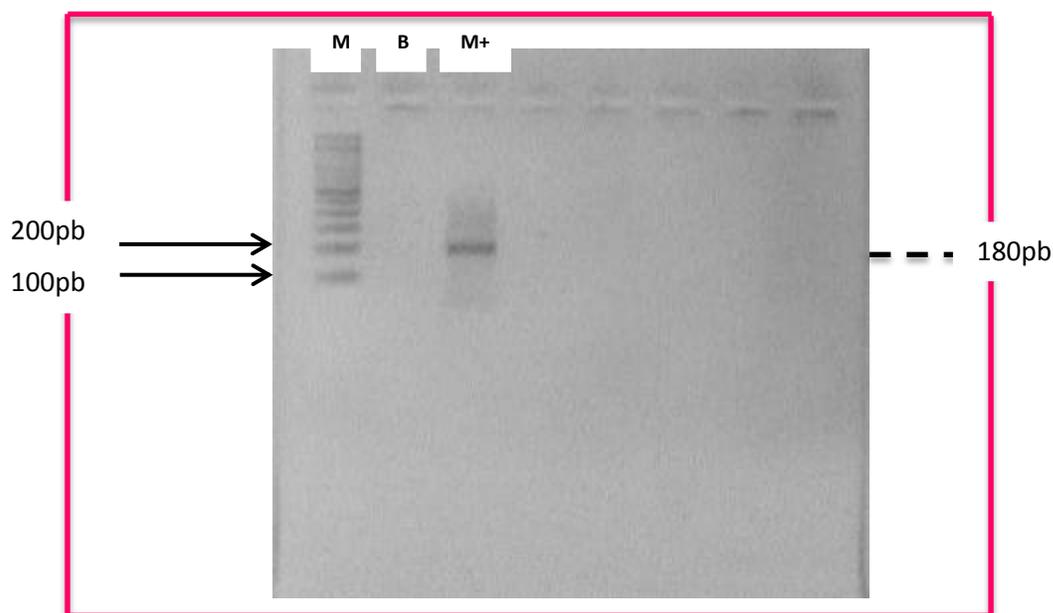


Figura 43. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 60 V para amplificación del gen CAMV35S en chocolates mediante PCR directa; (M) Marcador de Peso Molecular de 100 pb; (B) Blanco; (M+) Control Positivo Maíz Transgénico; (dCh Kit) Chocolate Kit Kat; (dCh Cru) Chocolate Crunch; (dCh Nes) Chocolate Nesquik; (dCh Mi) Chocolate Milka Oreo (Alemania); (dCh To) Chocolate Tobleron (Suiza); (dCh Her) Chocolate Hersheys.

## IDENTIFICACIÓN DEL CONTROL POSITIVO CON EL GEN T-NOS

### Amplificación del gen T-NOS

Una vez evaluadas todas las muestras con los primers específicos de CaMV35S se realizó lo mismo para la amplificación de T-NOS, primero se efectuó una PCR Directa para el terminador T-NOS con los componentes del Kit "Phire Plant Direct PCR" (Tabla 10) a las condiciones del programa de la Figura 30. En la que solo se analizaron el blanco (control negativo) y el maíz transgénico (control positivo) con un amplificado de 180pb.



**Figura 44.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60 V. Para la verificación de la amplificación del gen de T-NOS 180pb, en el Control Positivo mediante PCR directa; (M) Marcador de Peso Molecular de 100 pb; (B) Blanco; (M+) Control Positivo Maíz Transgénico.

Como se observa en el gel (Figura 44) de agarosa al 3% se obtuvo una banda visible de la muestra del grano de maíz transgénico (carril M+), obteniendo el amplificado que declaraban los primers de 180pb, que está próximo al carril M, cercano al fragmento de 200pb, indicando que la muestra contenía el gen del terminador T-NOS, lo cual indicaba la eficacia de la prueba, por esta razón se tomó como control positivo para verificar que las muestras de plantas de cacao, granos y chocolates amplificaran a esas condiciones.

Igualmente se verificó que no hubo contaminación al realizar la PCR así como al cargar el gel, pues no hubo una banda visible en la columna del blanco (carril B, control negativo).



IDENTIFICACIÓN DE OGM EN HOJAS DE PLANTAS DE CACAO CON T-NOS

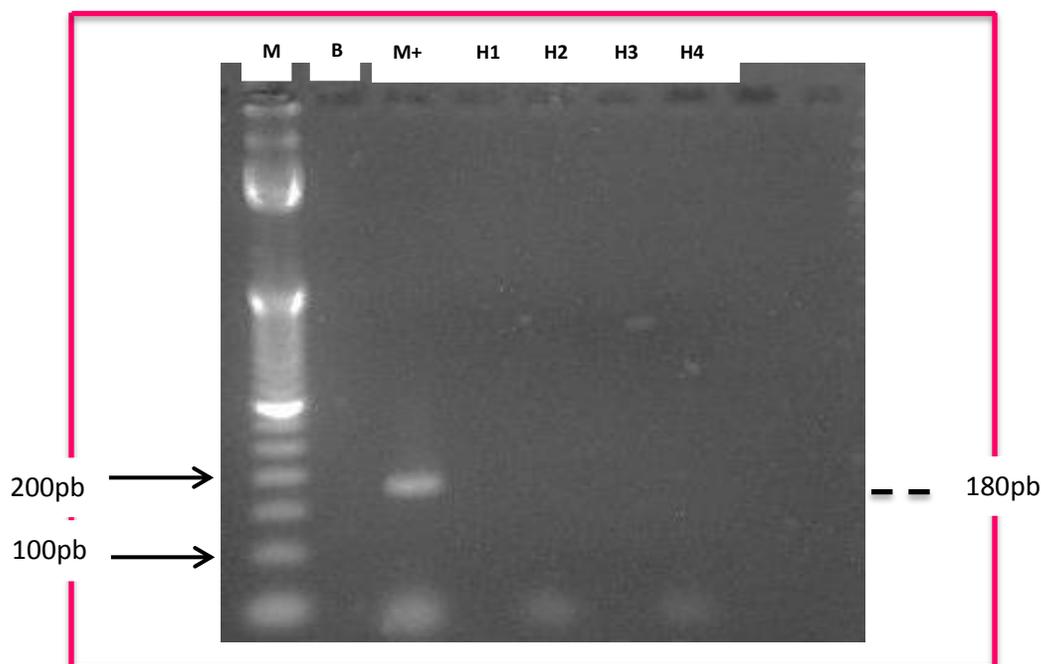


Figura 45. Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60 V para la amplificación del gen de T-NOS en plantas de cacao mediante PCR directa; (M) Marcador de Peso Molecular de 50 pb; (B) Blanco; (M+) Control Positivo Maíz Transgénico; (H1) Planta de Chiapas; (H2) Planta de vivero de Yautepec Morelos; (H3) Planta de Costa Chica Acapulco; (H4) Planta de Costa Grande Acapulco.

En la Figura 45 se evaluó el ADN de las muestras de las hojas de plantas de cacao (carriles H1, H2, H3 y H4) con los primers específicos de T-NOS, en la cual se observa que solo amplificó para el control positivo (carril M+) en 180pb, señalando que no se utilizó el terminador T-NOS de *Agrobacterium tumefaciens* para modificar genéticamente las muestras analizadas.



IDENTIFICACIÓN DE OGM EN FRUTOS DE CACAO (GRANOS) CON T-NOS

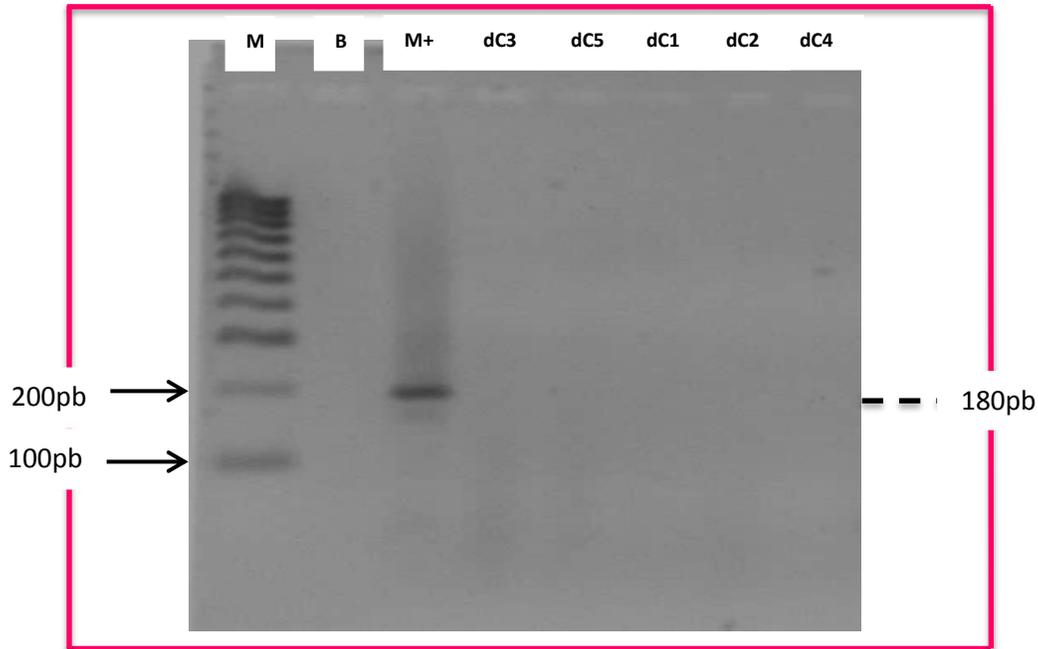


Figura 46. Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60 V para la amplificación del gen de T-NOS en granos de cacao mediante PCR directa; (M) Marcador de Peso Molecular de 100 pb; (B) Blanco; (M+) Control Positivo Maíz Transgénico; (dC3) Grano de Tlalnepantla; (dC5) Grano de Oaxaca; (dC1) Grano de Tabasco; (dC2) Grano de Mazatan Chiapas; (dC4) Grano de Chiapas.

En el siguiente gel (Figura 46) de agarosa al 3% se evaluaron las muestras de granos de cacao (carriles dC1, dC2, dC3, dC4 y dC5), en la cual se visualizó la presencia de un amplificado de 180pb, perteneciente a la muestra del control positivo (carril M+), garantizando que los granos no sufrieron alguna modificación genética con el terminador T-NOS.

En el siguiente gel (Figura 47) de agarosa al 3% se evaluó el ADN de algunas muestras de chocolates comercializados en México (carriles Ch Co y Ch H), así como de algunos chocolates artesanales (carriles dCh I, dCh Ca y Ch R), donde se observan 2 bandas de amplificación correspondientes a las muestras (carriles Ch R y M+) concordando en un amplificado de 180pb, demostrando la presencia del terminador T-NOS en la muestra analizada.



IDENTIFICACIÓN DE OGM EN PRODUCTOS COMERCIALIZADOS CON T-NOS

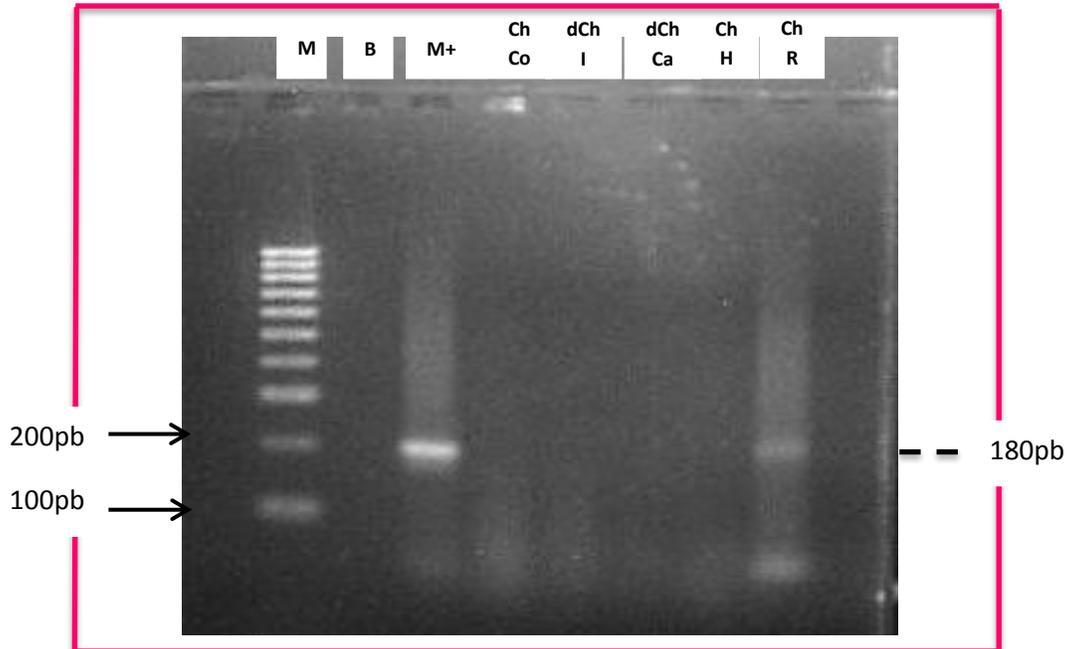


Figura 47. Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60 V para amplificación del gen T-NOS en chocolates mediante PCR directa; (M) Marcador de Peso Molecular de 100 pb; (B) Blanco; (M+) Control Positivo Maíz Transgénico; (Ch Co) Chocolate Colombiano “Casa Luker”; (dCh I) Chocolate La Ixtla; (dCh Ca) Chocolate Cazuela, Comal y Cacao; (Ch H) Chocolate Lindt “Hello my name is cookies”; (Ch R) Chocolate Ranek.

En la Figura 48 se analizaron algunas muestras de chocolates artesanales (carriles Ch y Ch X), así como algunas muestras de chocolates comercializados en el país (carriles Ch L, Ch T), obteniendo un amplificado de 180pb para el control positivo del maíz transgénico (carril M+), probando que en las muestras examinadas no existe la presencia del terminador T-NOS.

En la Figura 49 se observa el amplificado de la muestra de chocolate (carril dCh To), que es comercializado en México, el cual coincidió con el amplificado del control positivo (carril M+), que es de 180pb, que es cercano al del fragmento de amplificación de 200pb del marcador de peso molecular (carril M), probando que la muestra analizada revela la presencia del terminador T-NOS de *Agrobacterium tumefaciens*.

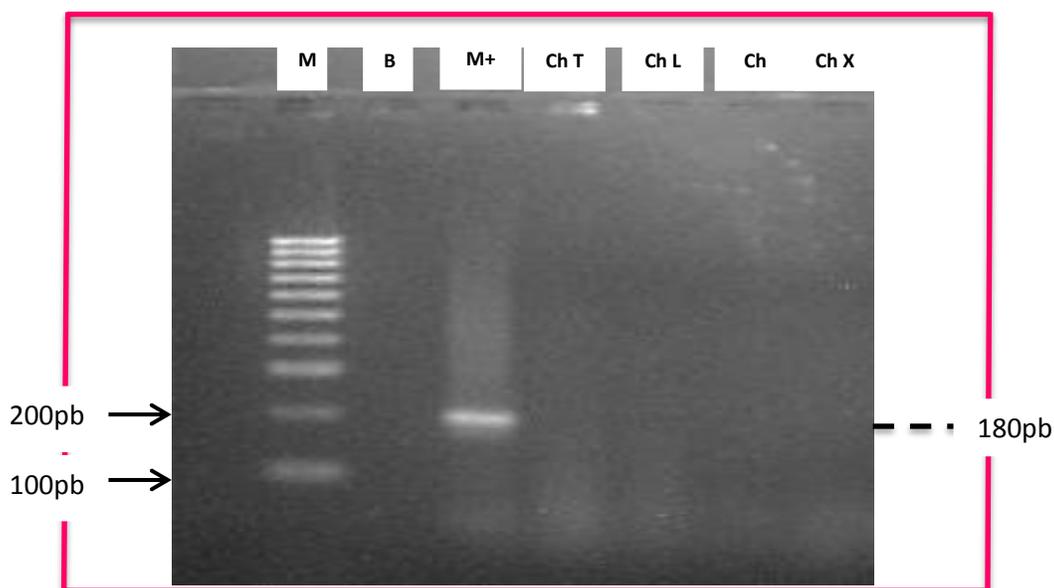


Figura 48. Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60 V para la amplificación del gen de T-NOS en Chocolates mediante PCR directa; (M) Marcador de Peso Molecular de 100 pb; (B) Blanco; (M+) Control Positivo Maíz Transgénico; (dChT) Chocolate Turin; (ChL) Chocolate Lindt mini eggs; (Ch) Chocolate Como el Origen; (ChX) Chocolate Xofia.

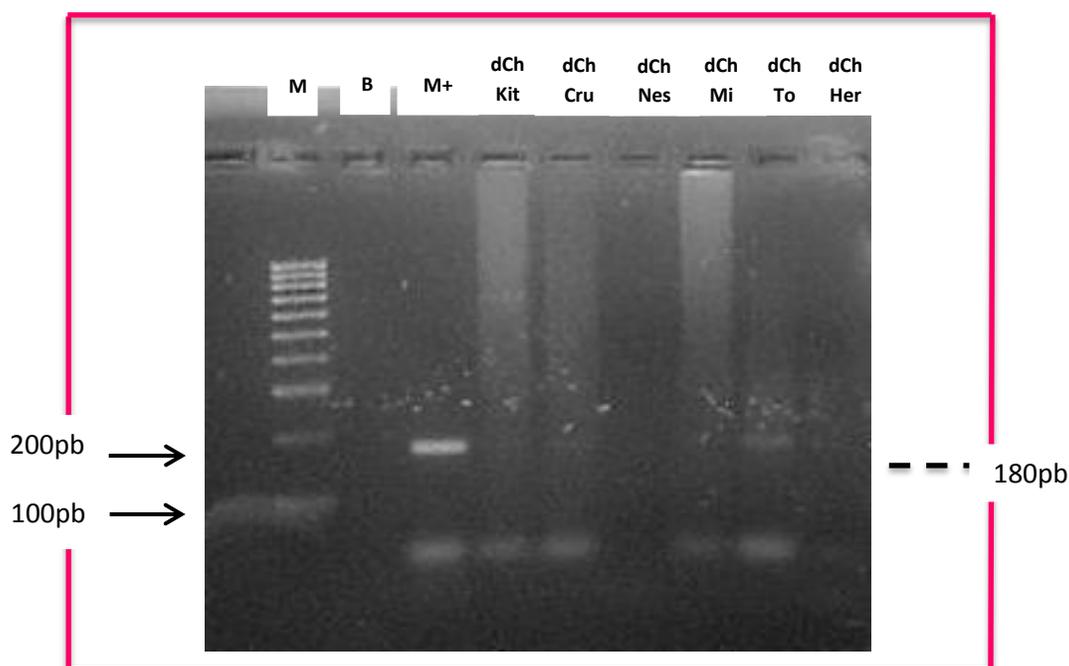


Figura 49. Electroforesis en gel de agarosa al 3% a 60 V para amplificación del gen T-NOS en chocolates mediante PCR directa; (M) Marcador de Peso Molecular de 100 pb; (B) Blanco; (M+) Control Positivo Maíz Transgénico; (dCh Kit) Chocolate Kit Kat; (dCh Cru) Chocolate Crunch; (dCh Nes) Chocolate Nesquik; (dCh Mi) Chocolate Milka Oreo (Alemania); (dCh To) Chocolate Tobleron (Suiza); (dCh Her) Chocolate Hersheys.



La amplificación de las muestras con CaMV y T-NOS no se debió exclusivamente al cacao presente en los chocolates puede ser que se debiera a otros ingredientes que contienen los chocolates como lecitina de soya, grasa vegetal y harinas, de los cuales se sabe que en estos cultivos se han aprobado para su comercialización la utilización de ciertas modificaciones genéticas. Algunos ejemplos de ingredientes y aditivos derivados de la soja, y por tanto ‘sospechosos’ de tener un origen transgénico, como son: harinas, aceites, etc (a menudo se ‘esconden’ detrás de la denominación aceites/grasas vegetales), emulgentes (lecitina–E322), mono y diglicéridos de ácidos grasos (E471) (Greenpeace, 2015).

El maíz, la soja o sus derivados industriales están presentes en más del 60 por ciento de los alimentos transformados, desde el chocolate hasta las patatas fritas, pasando por la margarina y los platos preparados (Greenpeace, 2015).

En algunos de los productos comercializados en nuestro país que amplificaron para el promotor CAMV y el terminador T-NOS, concuerdan con lo declarado por Greenpeace 2015, en la cual muestra una lista roja y una verde de algunas marcas propias que se adquieren en las grandes cadenas de distribución como supermercados. En la lista VERDE Incluye aquellos productos cuyos fabricantes han garantizado a Greenpeace que no utilizan transgénicos –ni sus derivados– en sus ingredientes o aditivos (Lindt & Sprüngli, Ferrero, Mondelez, etc). Mientras que la lista ROJA Incluye aquellos productos para los cuales Greenpeace no puede garantizar que no contengan transgénicos (Nestlé, Mylkybar, Crunch, Kit Kat, Nesquik, Dolca, etc). Sin embargo en lo experimentado se aseguró la presencia de transgénicos para Milka y Toblerone pertenecientes a la marca Mondelez y para un chocolate Lind de los 2 analizados (Lind mini Eggs). Así también en la guía roja presenta a Nesquik en el que no se garantiza la presencia de OGM, en el cual no se obtuvo un resultado positivo al experimentar, pero si se encontraron resultados positivos para Crunch y Kit Kat (Greenpeace, 2015).

Hay muy pocos artículos publicados sobre cacao transgénicos, en esta experimentación se demostró que hay alimentos de los que no se conoce que hayan sido modificados genéticamente y que ya estén en el mercado, como es el caso del cacao que es un símbolo cultural y gastronómico importante del país, por lo cual es importante que continúen las investigaciones sobre este y otros alimentos.



Finalmente, en la Tabla 16 y 17, se presenta un resumen de los resultados obtenidos en este trabajo para la presencia (✓) y/o ausencia (?) del promotor CAMV35S y del terminador T-NOS en cacao natural (hojas de plantas de cacao y granos de cacao), así como de productos comercializados en el país (chocolates).

**Tabla 16. Resumen de resultados de detección de OGM en cacao natural (plantas y granos).**

| NOMENCLATURA | MUESTRA DE CACAO                     | CAMV | T-NOS |
|--------------|--------------------------------------|------|-------|
| H1           | Hoja de planta de cacao de Chiapas   | ?    | ?     |
| H2           | Planta de vivero de Yautepec Morelos | ✓    | ?     |
| H3           | Planta de costa chica Acapulco       | ✓    | ?     |
| H4           | Planta de costa grande Acapulco      | ✓    | ?     |
| dC1          | Cacao de Tabasco                     | ?    | ?     |
| dC2          | Cacao de Mazatan Chiapas             | ✓    | ?     |
| dC3          | Cacao de Tlalnepantla                | ✓    | ?     |
| dC4          | Cacao de Chiapas                     | ✓    | ?     |
| dC5          | Cacao de Oaxaca                      | ✓    | ?     |

**Tabla 17. Resumen de resultados de OGM en productos comerciales que contienen cacao (chocolates).**

| NOMENCLATURA | MUESTRA DE CHOCOLATE                     | CAMV | T-NOS |
|--------------|--|------|-------|
| Ch           | Chocolate como el origen                 | ?    | ?     |
| Ch X         | Chocolate Xofia                          | ?    | ?     |
| Ch R         | Chocolate Ranek                          | ✓    | ✓     |
| dCh Ca       | Chocolate Cazuela, comal y cacao         | ?    | ?     |
| dCh I        | Chocolate La Ixtla                       | ?    | ?     |
| Ch L         | Chocolate Lindt mini eggs                | ✓    | ?     |
| dCh T        | Chocolate Turin                          | ?    | ?     |
| dCh Co       | Chocolate (Colombiano) Luker             | ?    | ?     |
| dCh H        | Chocolate Lindt hello my name is cookies | ?    | ?     |
| dCh To       | Chocolate Tobleron (Suiza)               | ✓    | ✓     |
| dCh Mi       | Chocolate Milka oreo (Alemania)          | ✓    | ?     |
| dCh Cru      | Chocolate Crunch                         | ✓    | ?     |
| dCh Kit      | Chocolate Kit Kat                        | ✓    | ?     |
| dCh He       | Chocolate Hersheys                       | ?    | ?     |
| dCh Nes      | Chocolate Nesquik                        | ?    | ?     |



## CONCLUSIONES

La metodología desarrollada así como la técnica empleada para la detección de presencia de transgénicos fue efectiva. Esta secuencia de pasos es aplicable para detectar transgenes que contengan el promotor 35SCaMV y el terminador T-NOS en todo producto natural de cacao, así como en productos alimenticios terminados que lo contengan.

Los “primers” diseñados para la identificación de *Theobroma cacao L.* no fueron específicos, sin embargo se obtuvieron amplificadores de 400pb para la identificación de esta especie.

Los primers utilizados del artículo de (Karamollaoglu *et al.*, 2009) para obtener los amplificadores de CAMV y T-NOS fueron específicos ya que amplificaron para maíz transgénico.

Se obtuvieron amplificadores mediante PCR con Master Mix® para las muestras de plantas de cacao y con PCR Directa para las muestras de frutos de cacao (granos) y productos procesados (chocolates).

De las 25 muestras analizadas, 24 amplificaron para cacao tradicional (*Theobroma cacao L.*) y éstas se evaluaron para la identificación de transgénicos. 3 muestras de las hojas de plantas de cacao (H2, H3, H4), 4 muestras de granos de cacao (C2, C3, C4, C5) y 6 muestras de productos comercializados (Ch L, Ch R, dCh Kit, dCh Cru, dCh Mi y dCh To) amplificaron para los genes de CaMV35S. Y solo 2 de las muestras (Ch R y dCh To) de productos comercializados amplificaron para los genes del terminador T-NOS.

En las muestra restantes no se encontró la presencia del promotor CaMV35S y el terminador T-NOS. Pese a que la mayoría de los cultivos transgénicos aprobados y comercializados utilizan este promotor y terminador, eso no significa que los productos sean libres de transgénicos, ya que en ocasiones se utilizan otros promotores y terminadores para expresar genes.

En México no está permitida la liberación de cacao genéticamente modificado, sin embargo los resultados de este trabajo indican que puede existir una propagación de material vegetal de plantas de cacao genéticamente modificado sin que se dé a conocer esta información, incumpliendo así con la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) que se encarga de regular las actividades de utilización de organismos genéticamente modificados, así como también con la normatividad vigente en materia de bioseguridad como lo es la NOM-001-SAG/BIO-2014 que exige el etiquetado de cualquier material vegetal propagativo para evitar desviaciones de uso y tener un control de trazabilidad. Así mismo, no se cumple con la NOM-164-SEMARNAT/SAGARPA-2013 al no existir reportes de resultados que demuestren la seguridad de estos organismos y en los cuales se mencionen los posibles riesgos al medio ambiente.



Cabe mencionar que en ningún producto analizado tanto en productos artesanales producidos en México, así como los comercializados en nuestro país como los precedentes de Alemania, Suiza, etc; presentó en la etiqueta la leyenda “libre de transgénicos”. Es importante que el consumidor esté informado, pues es el único que puede decidir qué es lo que está consumiendo, por lo que un etiquetado confiable es necesario y requerido.



---

## RECOMENDACIONES

Es necesario que se continúen realizando investigaciones aplicados en el tema de cacao ya que no hay mucha información sobre *Theobroma cacao L.* aplicado en Biología Molecular.

Ya que se ha comprobado la presencia de OGM en *Theobroma cacao L.* mediante el uso de CaMV35S y T-NOS, se podrían utilizar otros promotores y terminadores para descartar por completo la presencia o ausencia de OGM.

También se podría identificar el gen que se le está insertando a la planta de cacao para su mejoramiento.

Investigar otras técnicas para la extracción de ADN de plantas que elimine pigmentos, lípidos y proteínas para que no inhiban la PCR

Ocupar marcadores de peso molecular más pequeños para medir el tamaño correcto del amplificado.



## GLOSARIO

- **Ácidos nucleicos:** Son el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN), se consideran como polímeros de alto peso molecular, y se localizan principalmente en el núcleo de las células. Están constituidos por nucleótidos formados por una molécula de azúcar (ribosa para el ARN y desoxirribosa para ADN), una base orgánica nitrogenada (adenina, guanina, citosina y timina para el ADN y adenina, guanina, citosina y uracilo para el ARN), y un grupo fosfato.
- **Ácido desoxirribonucleico (ADN):** Molécula básica de la herencia. el ADN está constituido por un esqueleto de azúcar-fosfato, ubicado hacia afuera de la cadena, mientras que hacia el centro se presentan las purinas y pirimidinas. El esqueleto está formado por las uniones entre el radical fosfato y el carbono 3' de la molécula desoxirribosa y el carbono 5' de la siguiente. Las bases nitrogenadas se unen al carbono 1' del azúcar. De acuerdo al modelo de Watson y Crick, el ADN está formado por una doble hélice unida por puentes de hidrogeno entre pares de bases específicas (timina a adenina y citosina a guanina).
- **Ácido ribonucleico (ARN):** Cadena de polinucleótidos, caracterizado por estar compuesto por azúcar (ribosa). Las moléculas de ARN son cadenas simples y tienen bajos pesos moleculares a comparación con el ADN. Existen tres tipos de ARN: (1) ARN mensajero, (2) ARN ribosomal, (3) ARN de transferencia. Ácido orgánico, polímero de ribonucleótidos adenina, guanina, citosina y uracilo.
- **Amplificación:** Creación de numerosas copias de un segmento de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa.
- **Biotecnología:** Toda aplicación tecnológica que utilice recursos biológicos, organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos.
- **Biotecnología moderna:** Se entiende la aplicación de técnicas in vitro de ácido nucleico, incluidos el ácido desoxirribonucleico (ADN y ARN) recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u organismo, a la fusión de células más allá de la familia taxonómica, que supera las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o de la recombinación y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional, que se aplican para dar origen a organismos genéticamente modificados.
- **Desnaturalización:** Modificar la conformación nativa de un ácido nucleico o, más frecuentemente, de una proteína mediante procesos físicos o químicos. Normalmente este proceso se acompaña de la pérdida de la actividad metabólica.



- **Electroforesis:** Técnica de la biología molecular, de uso generalizado y de la que existen muchas variantes. Se utiliza para separar los componentes de mezclas complejas de macromoléculas. Para ello, las muestras se someten a un campo eléctrico aplicado a través de una matriz porosa; bajo tales condiciones, las moléculas migran a velocidades que dependen de sus cargas eléctricas y/o pesos moleculares.
- **Enzima:** Cualquiera de las sustancias proteicas elaboradas por las células vivas que intervienen en todas las reacciones químicas modificando su velocidad, por lo cual actúan como catalizadores biológicos.
- **Gen:** Unidad básica hereditaria, que se localiza en los cromosomas de las células y se duplican durante cada división celular; este mecanismo permite la transmisión de los caracteres hereditarios del organismo progenitor a sus descendientes.
- **Hibridación:** Apareamiento de dos hebra de ADN, a menudo de origen diferente, mediante el establecimiento de puentes de hidrogeno entre nucleótidos complementarios.
- **Microlitro ( $\mu\text{L}$ ):** Unidad de volumen equivalente a la millonésima parte de un litro, representada por el símbolo  $\mu\text{L}$ . Equivale a 1 milímetro cúbico.
- **Organismos genéticamente modificados (OGM):** Cualquier organismo vivo, con excepción de los seres humanos, que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna.
- **Par de bases (pb):** Las dos cadenas de una doble hélice de ácido nucleico se mantienen unidas mediante puentes de hidrogeno que se forman entre una purina y una pirimidina, una de cada cadena. La base A se empareja con la T en el ADN (con la U en el ARN); mientras que la G se empareja con la C tanto en el ADN como en el ARN. La longitud de una molécula de ácido nucleico se expresa generalmente por el número de pares de bases que contiene.
- **Primer o cebador:** Oligonucleótido de tamaño pequeño que, al hibridar con un molde de ADN de una hebra, le proporciona una estructura bicatenaria a partir de la cual, la ADN polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN para producir una molécula dúplex.
- **Promotor:** Región del ADN a la que se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción.



- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Una de las técnicas más utilizadas de la biología molecular que permite la producción de millones de copias (amplificación) de una secuencia específica de ADN, siempre que se conozca la secuencia de pares de bases de cada extremo del ADN diana.
- **Terminador:** Secuencia de ADN situada abajo inmediatamente después del segmento codificante de un gen y que es reconocida por la ARN polimerasa como una señal para detener la síntesis de ARNm.
- **Transgén:** Secuencia génica aislada que se utiliza para transformar un organismo. A menudo, pero no siempre, el transgén proviene de una especie distinta a la del receptor.



---

## REFERENCIAS

1. AgrobioMéxico -Aplicaciones y Beneficios de la Biotecnología Agrícola en México y en el Mundo. (2016a), *Marco regulatorio*. Recuperado de <http://www.agrobiomexico.org.mx/wp/wp-content/uploads/2016/10/MARCO-REGULATORIO.pdf>
2. AgrobioMéxico -Aplicaciones y Beneficios de la Biotecnología Agrícola en México y en el Mundo. (2016b), *Tipos de Cultivos GM Disponibles*. Recuperado de <http://www.agrobiomexico.org.mx/disponibles/>
3. AgrobioMéxico -Aplicaciones y Beneficios de la Biotecnología Agrícola en México y en el Mundo. (2016c), *Marco Regulatorio Internacional*. Recuperado de <http://www.agrobiomexico.org.mx/internacional/>
4. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2004). *Introducción a la Biología Celular*. New York, USA: Panamericana
5. ArgenBio -Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología (2017), *Cultivos transgénicos en el mundo. Distribución por país*. Recuperado de <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades&note=265>
6. Avendaño, A. C. H; Villarreal, F. J. M; Campos, R. E; Gallardo, M. R. A; Mendoza, L. A; Aguirre, M. J. F; Sandoval, E. A; Espinosa, Z. S. (2011). Diagnóstico del cacao en México. México: Universidad de Chapingo
7. Braudeau, J. (1970). *El cacao*. Barcelona, España: Blume
8. CAF-Banco de Desarrollo de America Latina. (2016). *Analizan desafíos para aumentar la competitividad del cacao en la región*. CAF. Recuperado de <https://www.caf.com/es/actualidad/noticias/2016/10/analizan-desafios-para-aumentarla-competitividad-del-cacao-en-la-region/>
9. CIBIOGEM- Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados. (2005). *Ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados*. Recuperado de: <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LBOGM.pdf>
10. Cofepris- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. (2013). *¿Qué es un organismo genéticamente modificado?*. Recuperado de <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/OGMS/Que-son-ogms-.aspx>



11. CONACYT- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. (2017a). *Ensayos de productos genéticamente modificados autorizados en México de 1988 a 2005, anual por cultivo, conforme la Ley Federal de Sanidad Vegetal (LFSV)*. Recuperado de: <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/ensayos-productos-autorizados-anual-cultivo-1988-2005>
12. CONACYT- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. (2017b). *Permisos de liberación al ambiente de OGMs en México de 2005 a 2017, por cultivo, conforme a la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM)*. Recuperado de: <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/permisos-por-cultivo-2005-2017>
13. CONACYT- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. (2017c). *Permisos de liberación al ambiente de OGMs emitidos en México de 2005 a 2017, por cultivo, conforme a la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM)*. Recuperado de: <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/permisos-2005-2017>
14. CONACYT- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. (2017d). *Permisos de liberación al ambiente de OGMs en México de 2005 a 2017, por tipo de solicitud, conforme a la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM)*. Recuperado de: <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/permisos-por-tipo-de-liberacion-2005-2017>
15. CONACYT- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. (2000). *Protocolo de cartagena sobre seguridad de la biotecnología del convenio sobre la diversidad biológica*. Recuperado de: <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/comunicacion/publicaciones/cartagena-protocol-es.pdf>
16. Cortazar M. A., y Silva R. E. (2004). *Métodos físico-químicos en biotecnología*. Intituto de Biotecnología UNAM. Recuperado de <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
17. Crawford E.(2015). Health benefits of chocolate bars directly correlates with percentage of cocoa. *Food Navigator USA*, 1. Recuperado de <http://www.scranton.edu/faculty/vinson/files/foodnavigator-usa.com.pdf>
18. De Guglielmo, C., Zoraya, M., y Fernández Da Silva, R. (2016). Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas. *Scielo*, Vol. XVIII (No. 2), 119-121. Doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61529



19. De la Cruz, L. E., Córdova, A. V., García, L. E., Bucio, G. A., Jaramillo, V. J.L., (2015). Manejo agronomico y caracterizacion socioeconomica del cacao en Comalcalco, Tabasco. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal Redalyc*. 17(1), 33-34.
20. Eguiarte, L., Souza, V., & Aguirre, X. (2007). *Ecología Molecular*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
21. Gardner, E. J., Simmons, M. J., Snustad, D. P. (2005). *Principios de Genética*. México: Limusa Wiley
22. González, V. (2015). *En México el consumo del chocolate inicia en Octubre*. Merca2.0. Recuperado de <http://www.merca2.0.com/en-mexico-el-consumo-de-chocolate-inicia-en-octubre->.
23. Greenpeace (2015). *Guía roja y verde de alimentos transgénicos*. Recuperado de [https://archivo-es.greenpeace.org/espana/Global/espana/2015/Report/transgenicos/GuiaRojaVerdeTransgenicos\\_5edicion\\_Actualizacion062015.pdf](https://archivo-es.greenpeace.org/espana/Global/espana/2015/Report/transgenicos/GuiaRojaVerdeTransgenicos_5edicion_Actualizacion062015.pdf)
24. Gutiérrez, G. D. F., Ruiz, M. R., & Xoconostle, C. B. (2015). *Estado actual de los cultivos genéticamente modificados en México y su contexto internacional*. México: Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
25. Hardy, F. (1960). *Manual de cacao*. Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas
26. Hernández R. P. y Gomez, R. A. (2012). Polymerase Chain Reaction: types, utilities and limitations. *Molecular Biology and Immunogenetics Research Group (BIOMIGEN), Animal Medicine and Reproduction Research Center (CIMRA)*, Recuperado de <https://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/polymerase-chain-reaction-types-utilities-and-limitations>
27. Holden, M. J., Levine, M., Scholdberg, T., Haynes, R. J., & Jenkins, G. R. (2009). The use of 35S and Tnos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials. *Springer*, 396. 2175-2179. Doi: 10.1007/s00216-009-3186-x
28. ISAAA - Servicio Internacional de Adquisición de Aplicaciones de Agrobiotecnología (2016). *This 2016 ISAAA Brief is an extension of the 20 Volumes of Annual Briefs (1996 to 2015) on global status of biotech/GM crops authored by Clive James, Founder & Emeritus Chairman of ISAAA*.



29. ISAAA - Servicio Internacional de Adquisición de Aplicaciones de Agrobiotecnología (2017). *Biotecnología agrícola: los cultivos transgénicos o genéticamente modificados alcanzaron las 185,1 millones de hectáreas en 2016 a nivel global*. Pekin. Recuperado de [http://www.argenbio.org/adc/uploads/ISAAA\\_2016/Gacetilla\\_prensa.pdf](http://www.argenbio.org/adc/uploads/ISAAA_2016/Gacetilla_prensa.pdf)
30. Karamollaoglu, I., Avni, O.H., Mutlu, M., (2009). QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (OGMs). *Biochemical Engineering Journal*, 44, 142-150. Doi:10.1016/j.bej.2018.11.011
31. León, J. (1987). *Botánica de los cultivos tropicales*. Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación de la Agricultura (IICA).
32. López, de la M. D. A., Sandoval, R. A. S. (2013). Electroforesis. Salazar, M. A., Sandoval, R. A., Armendáriz, B. J. (McGraw Hill). *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. (pp. 110-118).
33. López, M., Mallorquín, P., & Vega, M. (2003). *Tecnologías moleculares y Trazabilidad Alimentaria*. Genoma España sector agroalimentario, Recuperado de [http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/TRAZABILIDAD\\_ALIMENTARIA.pdf](http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/TRAZABILIDAD_ALIMENTARIA.pdf)
34. Luque C. J., & Herraéz S. Á. (2002). *Biología molecular e ingeniería genética, conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. España: Elsevier Science.
35. Maximova, S.N, Marell, J.P., Pishak, A.Y., Verica, J.A, & Guiltinan, M.J. (2005). Over-expression of a cacao class I chitinase gene in Theobroma cacao L. enhances resistance against the pathogen, Colletotrichum gloeosporioides. *Springer-Verlag*. 224: 740-749. Doi: 10.1007/s00425-005-0188-6
36. Microbial. (2009). La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR. Mitos y realidades. Newsletter Microbial, (3), 1. Recuperado de <http://studylib.es/doc/5190924/la-extracci%C3%B3n-y-purificaci%C3%B3n-del-adn-para-el-an%C3%A1lisis-por...>
37. Morales, de J. J., García, A., & Méndez, E. (2012). ¿Qué sabe usted acerca de...Cacao? *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas –Redalyc*, 43(4), 79-81.
38. Mota, C. M., Cuenca, P. J. B., Sipán, S. Ma. C. (2016). *Biología Molecular y Citogenética*. España: Paraninfo



39. Muñoz Rubio, J. (2004). *Alimentos transgenicos. Ciencia ambiente y mercado: un debate abierto*. México: Siglo XXI.
40. 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 [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5346453&fecha=28/05/2014](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5346453&fecha=28/05/2014)
41. 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 [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5328792&fecha=03/01/2014](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5328792&fecha=03/01/2014)
42. NMX-F-343-SCFI-2007. *Alimentos – Manteca de cacao-Especificaciones*. Recuperado de [https://avdiaz.files.wordpress.com/2008/11/proy-nmx-f-343manteca\\_cacao\\_comentarios\\_dgfa.pdf](https://avdiaz.files.wordpress.com/2008/11/proy-nmx-f-343manteca_cacao_comentarios_dgfa.pdf)
43. NMX-FF-103-SCFI-2003. *Productos agrícolas no industrializados - Cacao en grano (Theobroma Cacao L) – Especificaciones y métodos de prueba*. Recuperado de [http://2006-2012.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Lists/Instrumentos%20Tcnicos%20Normalizacin%20y%20Marcas%20Colecti/Attachments/74/NMX\\_CACAO.pdf](http://2006-2012.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Lists/Instrumentos%20Tcnicos%20Normalizacin%20y%20Marcas%20Colecti/Attachments/74/NMX_CACAO.pdf)
44. NORMA OFICIAL MEXICANA. NOM-186-SSA1/SCFI-2013. *Cacao, chocolate y productos similares, y derivados del cacao. Especificaciones sanitarias. Denominación comercial. Métodos de prueba*. Recuperado de [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5332832&fecha=17/02/2014](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5332832&fecha=17/02/2014)
45. Núñez, Cárdenas. L. (2011). Detección y ensayo de los Organismos Genéticamente Modificados. *Revista Cubana Alimentos Nutrición*, 21(2), 294.
46. OMS- Organización Mundial de la Salud (2005). *Biotecnología moderna de los alimentos, salud y desarrollo humano: estudio basado en evidencias*. Recuperado de [http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/biotech\\_sp.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/biotech_sp.pdf)
47. Patiño, G. (2017). *Insuficiente producción de cacao en México*. México Nueva Era. Recuperado de <http://mexiconuevaera.com/nacional/agropecuario/2017/10/25/insuficiente-produccion-de-cacao-en-mexico>.



48. Pengue, W. A. (2000). *Cultivos transgenicos*. Argentina: UNESCO.
49. Pierce, B. (2009). *Génética un enfoque conceptual*. Estados Unidos: Medica Panamericana.
50. Pérez, de C. A. M. (2011). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Departamento de Biotecnología. Universidad politecnica de valencia. Recuperado de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacción%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>
51. Rimache, A. M. (2008). *Cultivo del Cacao*. Perú: Macro EIRL
52. Rodriguez, S. I. P. & Barrera, S. H. A. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos decadas de su invención. *Ciencia UANL, VII(3)*, 324-329.
53. Rull, G., Mohn-Zain, Z. N., Shiel, J., Lundberg, M. H., Collier, D. J., Johnston, A., Warner, T. D., Corder, R. (2015). Effects of high flavanol dark chocolate on cardiovascular function and platelet aggregation. *ElSevier*, 71, 70. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2015.05.011>.
54. Sambrook, J., & Russel, D. (2001). *Molecular Cloning a laboratory manual*. E.U: Cold Spring Harbor Laboratory Pres. (1).
55. Sánchez Guillén , J. L. (2010). *Biología de 2° de bachillerato*. Asturias España: Oviedo.
56. Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentacion SAGARPA ,Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP. (2013). *Atlas Agrolimentario*. Recuperado de [http://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2013/AtlasAgroalimentario-2013](http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2013/AtlasAgroalimentario-2013).
57. Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentacion SAGARPA ,Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP. (2014). *Atlas Agrolimentario*. Recuperado de [http://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2014/AtlasAgroalimentario-2014](http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2014/AtlasAgroalimentario-2014).
58. Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentacion SAGARPA ,Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP. (2015). *Atlas Agrolimentario*. Recuperado de [http://nube.siap.gob.mx/publicaciones\\_siap/pag/2015/Atlas-Agroalimentario2015](http://nube.siap.gob.mx/publicaciones_siap/pag/2015/Atlas-Agroalimentario2015).



- 
59. Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentacion SAGARPA ,Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP. (2016). *Atlas Agrolimentario 2016*. D.F, México: SIAP.
60. Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentacion SAGARPA ,Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP. (2017). *Atlas Agrolimentario*. Recuperado de <http://online.pubhtml5.com/clsi/ibhs/>.
61. Schwab, K. J., De Leon, R., 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. *American Society for Microbiology*, 61(2), 531.
62. Tamay, d D. L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Medigraphic*, 2(2), 70-73.
63. Trinidad, S. M. (2008). *Plantas trasngénicas Biotecnología y alimentación*. UNED. Recuperado de [http://www2.uned.es/experto-biotecnologiaalimentos/TrabajosSelecc/ TrinidadSanchez.pdf](http://www2.uned.es/experto-biotecnologiaalimentos/TrabajosSelecc/TrinidadSanchez.pdf)
64. Univeristy of California Davis. (2007). Partnership for Plant Genomics Education. *Univeristy of California Davis*. E.U, California.
65. Villamil, Valente (2016). *Maíz y cacao... ¿muy mexicanos? En realidad son importados*. El Financiero. Recuperado de <http://www.elfinanciero.com.mx/economia/mexico-pierde-oportunidad-en-alimentos-emblema.html>.



## ANEXOS

### ANEXO 1

#### DISEÑO DE PRIMERS PARA THEOBROMA CACAO L.

1. Se buscó en NCBI en el apartado de Nucleotido el “Gi” del mRNA de *Theobroma cacao* que tuviera más pb.

Nucleotide ▼ theobroma cacao  
Create alert Advanced

Summary ▼ 20 per page ▼ Sort by Default order ▼

Send: ▼

Items: 161 to 180 of 48496

<< First < Prev Page 9 of 2425 Next > Last >>

- [PREDICTED: \*Theobroma cacao\* protein IQ-DOMAIN 1 \(LOC18586349\), transcript](#)  
161. [variant X1, mRNA](#)  
2,033 bp linear mRNA  
Accession: XM\_007009686.2 GI: 1063526823  
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- [PREDICTED: \*Theobroma cacao\* uncharacterized LOC18585987 \(LOC18585987\),](#)  
162. [mRNA](#)  
656 bp linear mRNA  
Accession: XM\_007009092.2 GI: [1063526822](#)  
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

2. Se buscó la página “Primer quest tool”. Se le dio clic al apartado que decía “Dowland sequence(s) using Genbank Accession ID” y se colocó el ID que se obtuvo de NCBI y el nombre científico del cacao, se le dio clic en “Get secuencia” y arrojó toda la secuencia de nucleótidos.



Es seguro | <https://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>

Order Menu Products & Services Support & Education Tools

## PrimerQuest Tool

Assay Design / Results

### Sequence Entry

Enter sequence(s) manually

Download sequence(s) using Genbank or Accession ID

NCBI ID#

```
>GI# 1063526822
TTGTGGGTTTCACATGTATTACCCCTTAAAGAAACCTTTTGGAGCTTCTTGTTTCACTATAAATTTTGAAGTTGAG
AAGTGTATTGCAATTTGAAGAAAAAATGAAGTACATCTGCTTTCGGTGTGTTGCTATT
CTGGCATTGCTGTGCTCAATATAGCAGAAAGGTGCTGGTGAAGTGGGAGATCCTCCCTGACAGGGAAGC
CTGGAAGTTGGCTCCTTGCAATGGCAGCAGGATTCGAATGCTCAAGTGTGACAGTTGCTGCCAGC
AGGTGAAGAAATGGCCAGAATC CAAGATGCCTCTGTGCTGTTATGCTTTCTAACACAGCTAAGAGTTCTG
GAGTCAAGCCAGAAATGCTGTACCAATCTAAACGCTGCAACATTCCTGATGTCCTGTGGGTTACAAAT
GTGGAGATTACACTTTGCCCTTGAACATGAAGGACCCAAGTCATGGTCCGGTGTGTGCCCTAACATTAG
```

Sequence Name

3. Se le dio clic en “PCR 2 primer”

### Sequence Entry

Enter sequence(s) manually

Download sequence(s) using Genbank or Accession ID

NCBI ID#

```
>GI# 1063526822
TTGTGGGTTTCACATGTATTACCCCTTAAAGAAACCTTTTGGAGCTTCTTGTTTCACTATAAATTTTGAAGTTGAG
AAGTGTATTGCAATTTGAAGAAAAAATGAAGTACATCTGCTTTCGGTGTGTTGCTATT
CTGGCATTGCTGTGCTCAATATAGCAGAAAGGTGCTGGTGAAGTGGGAGATCCTCCCTGACAGGGAAGC
CTGGAAGTTGGCTCCTTGCAATGGCAGCAGGATTCGAATGCTCAAGTGTGACAGTTGCTGCCAGC
AGGTGAAGAAATGGCCAGAATC CAAGATGCCTCTGTGCTGTTATGCTTTCTAACACAGCTAAGAGTTCTG
GAGTCAAGCCAGAAATGCTGTACCAATCTAAACGCTGCAACATTCCTGATGTCCTGTGGGTTACAAAT
GTGGAGATTACACTTTGCCCTTGAACATGAAGGACCCAAGTCATGGTCCGGTGTGTGCCCTAACATTAG
```

Sequence Name

Upload sequences in an Excel file

### Choose Your Design

4. El programa arroja 5 pares de primer, los cuales se revisaron para ver cuál era el más apto para su utilización. De los cuales el tercero fue el más apto en cuanto a longitud, Tm y % GC. Donde la longitud debe ser de entre 18 y 25 pb, la composición entre 40 – 50% de GC y el la pareja de primers la Tm no debe diferir en más de 2°C, debe estar entre 55 y 62°C.



## PrimerQuest Tool

Assay Design / **Results**

Assay Set Locations for theobroma cacao

Set 3 theobroma cacao

Amplicon Length: 266  
[View Assay Details](#)

|         | Start | Stop | Length | Tm | GC%  |
|---------|-------|------|--------|----|------|
| Forward | 319   | 340  | 21     | 62 | 47.6 |
| Reverse | 566   | 585  | 19     | 62 | 52.6 |

- Se dio clic en "View Assay Details". Se verifico que las cuatro bases nitrogenadas estuvieran distribuidas por toda la secuencia y que no hubiera regiones de poliC o poliG ya que estas promueven el reconocimiento no especifico.
- Así mismo también se verifico que en los extremos 3' de los primer hubiera C o G, debido a que los enlaces de hidrogeno son más fuertes entre G-C. , asi también se verifico que en la secuencia el primer reverso fuera recirproco.

## PrimerQuest Tool

Assay Design / Results / Help / About

theobroma cacao Assay Set 3 Details

[Back to Results](#)

**Parameter Set:** General PCR (Primers only)  
**Sequence Name:** theobroma cacao  
**Amplicon Length:** 266

|         | Start | Stop | Length | Tm | GC%  |
|---------|-------|------|--------|----|------|
| Forward | 319   | 340  | 21     | 62 | 47.6 |
| Reverse | 566   | 585  | 19     | 62 | 52.6 |

| Base | Sequence  |
|------|---|
| 1    | TTGTGGGTTTCACATGTATTACCCTTAAAGAAACCTTTTGGAGCTTCTTGTTCACATAAAATTTTGAAGTTGAGAAGTGTATGCATTGCAATATTGA   |
| 101  | AGAAAAAATAAATAAGTACATCTGCTTTCGGTGTGTTGCTATTCTGGGCATTGCTGTGCTCAATATAGCAGAAGGTGCTGTGAGTGTGGAG         |
| 201  | ATCATCCCCTGACAGGGAAGCCTGGAAGTTGGCTCCTTGTGCAATGGCAGCACAGGATTGGAATGCTCAAGTGTCTGACAGTTGCTGCCAGCAGTGAAG |
| 301  | AAAAATGGCCAGAAATCCAAGATGCCCTCTGTGCTGTATGCTTTCTAACACAGCTAAGAGTCTGGAGTCAAGCCAGAAATTGCTGCACCATTCCTAAC  |
| 401  | GCTGCAACATTCCTGATGCTCCTGTGGGTTACAAATGTGGAGATTACACTTTCCTTGAACATGAAGGACCCCAAGTCATGGTTCCCGGTGCTGTGCCT  |
| 501  | AACATTAGAAGTACCCTGTGTGCTGGATTTTATGCTTTTCTTAACTAGTTCATCTAGCTGATGAATTGACCGTGACATCTGGCTATTTGAATGATAAAT |
| 601  | AAAAAGCTTGTGTTTAGTTATCTTCTTATAACATTTTCTTATTGTCTCAGTTCTCA  |

- Para el primer frontal y reverso, se dio clic en "Hairpin" para checar que sus temperaturas de hibridación (Tm) de las orquideas no afectaban la Tm de los primers

### Tm de primer frontal



General Information # Bases 21

Run Date: 5/11/2017 2:00:55 AM

AGATGCCTCTGTGCTGTATG

Nucleotide Type: DNA

Sequence Type: linear

Temperature: 25 °C

Na Concentration: 50 mM

Mg Concentration: 0 mM

Suboptimality: 50 %

Max Foldings: 20

Start Position:

Stop Position:

Structures

| Structure Name | Image | $\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> ) | T <sub>M</sub> (°C) | $\Delta H$ (kcal.mole <sup>-1</sup> ) | $\Delta S$ (cal.K <sup>-1</sup> mole <sup>-1</sup> ) | Output |
|----------------|-------|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|--|--------|
| 1              |       | -0.27                                 | 28.7                | -22.3                                 | -73.88   | Ct Det |
| 2              |       | 0.28                                  | 20.5                | -18.2                                 | -61.98   | Ct Det |

Note:  $\Delta TFD$  Concentration is not taken into account

### Tm de primer reverso

Run Date: 5/11/2017 2:02:27 AM

GCCAGATGTCACGGTCAAT

Nucleotide Type: DNA

Sequence Type: linear

Temperature: 25 °C

Na Concentration: 50 mM

Mg Concentration: 0 mM

Suboptimality: 50 %

Max Foldings: 20

Start Position:

Stop Position:

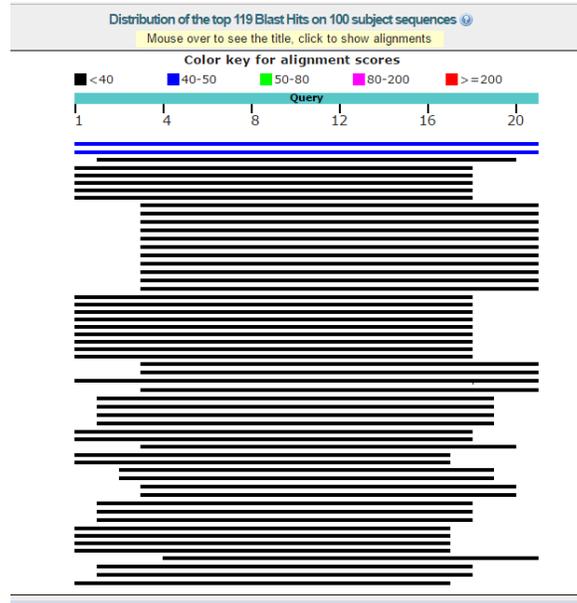
Structures

| Structure Name | Image | $\Delta G$ (kcal.mole <sup>-1</sup> ) | T <sub>M</sub> (°C) | $\Delta H$ (kcal.mole <sup>-1</sup> ) | $\Delta S$ (cal.K <sup>-1</sup> mole <sup>-1</sup> ) | Output |
|----------------|-------|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|--|--------|
| 1              |       | 0.47                                  | 18                  | -19.5                                 | -66.98   | Ct Det |
| 2              |       | 0.89                                  | 13                  | -21.3                                 | -74.43   | Ct Det |
| 3              |       | 1.04                                  | 10.5                | -20.3                                 | -71.56   | Ct Det |
| 4              |       | 1.23                                  | -1.8                | -12.4                                 | -45.7  | Ct Det |
| 5              |       | 1.34                                  | -5.1                | -11.9                                 | -44.4  | Ct Det |
| 6              |       | 1.34                                  | 1                   | -15.3                                 | -55.82   | Ct Det |

Note:  $\Delta TFD$  Concentration is not taken into account

- Para el primer frontal y reverso, se dio clic en "Blast". Para corroborar que los primer's sean específicos al cacao y ni a productos que pudieren contener los chocolates.

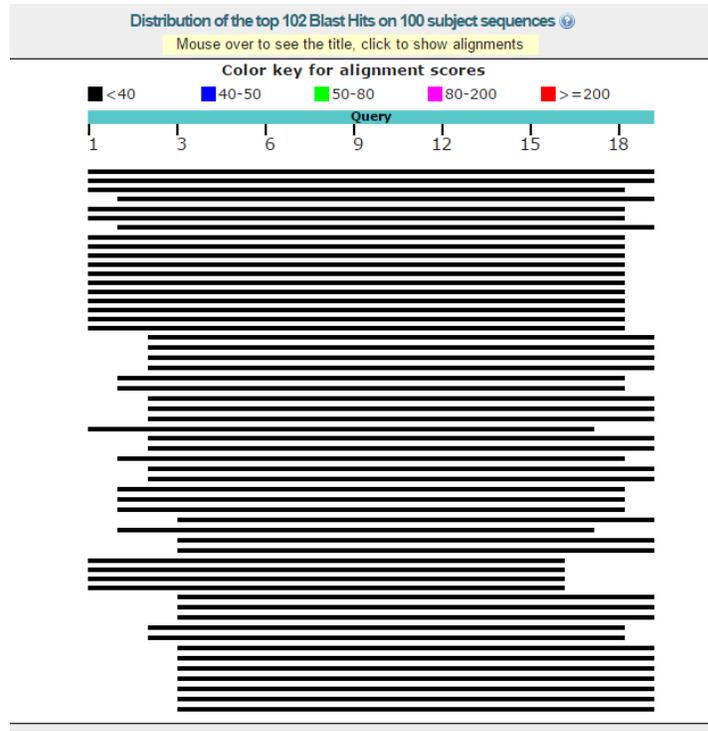
### Primer frontal



10. Se verifico que reconociera al 100% la especie tanto para el primer frontal como para el reverso.

| Description  | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession                                    |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|--|
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Theobroma cacao uncharacterized LOC18585987 (LOC18585987). mRNA  | 42.1      | 42.1        | 100%        | 0.060   | 100%  | <a href="#">gii1063526822 XM_007009092.2</a> |
| <input type="checkbox"/> Theobroma cacao genome assembly, chromosome X   | 42.1      | 42.1        | 100%        | 0.060   | 100%  | <a href="#">gii1042907812 IL1594797.1</a>    |
| <input type="checkbox"/> Zebrafish DNA sequence from clone CH211-22G2 in linkage group 16, complete sequence   | 38.2      | 38.2        | 90%         | 0.94    | 100%  | <a href="#">gii77681164 CR524828.12</a>      |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Oncorhynchus kisutch WD repeat and coiled-coil containing (wdcp), transcript variant X2, mRNA                        | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii1158926226 XM_020455453.1</a> |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Oncorhynchus kisutch WD repeat and coiled-coil containing (wdcp), transcript variant X1, mRNA                        | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii1158926224 XM_020455452.1</a> |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Oncorhynchus kisutch WD repeat and coiled-coil-containing protein-like (LOC109900982), transcript variant X3, mRNA   | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii1158895751 XM_020496931.1</a> |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Oncorhynchus kisutch WD repeat and coiled-coil-containing protein-like (LOC109900982), transcript variant X2, mRNA   | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii1158895749 XM_020496930.1</a> |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Oncorhynchus kisutch WD repeat and coiled-coil-containing protein-like (LOC109900982), transcript variant X1, mRNA   | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii1158895747 XM_020496929.1</a> |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Asparagus officinalis uncharacterized LOC109849939 (LOC109849939). mRNA  | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii1150729250 XM_020419833.1</a> |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Elaeis guineensis uncharacterized LOC105046334 (LOC105046334). mRNA  | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii1130662876 XM_010924894.2</a> |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Lupinus angustifolius putative lipid-transfer protein DIR1 (LOC109335054). mRNA                                      | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii1117477890 XM_019571097.1</a> |
| <input type="checkbox"/> Elaeis guineensis type 5 nonspecific lipid transfer protein LTP502 mRNA, complete cds   | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii1052473539 IKT381262.1</a>    |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Phoenix dactylifera uncharacterized LOC103704106 (LOC103704106). mRNA  | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii1052175282 XM_008787256.2</a> |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Phoenix dactylifera D-inositol 3-phosphate glycosyltransferase (LOC103704107). mRNA                                  | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii1052175281 XM_008787257.2</a> |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Gossypium arboreum putative lipid-transfer protein DIR1 (LOC108471007). mRNA   | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii1050610837 XM_017772561.1</a> |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Daucus carota subsp. sativus putative lipid-transfer protein DIR1 (LOC108213205). mRNA                               | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii1040859366 XM_017384977.1</a> |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Gossypium hirsutum putative lipid-transfer protein DIR1 (LOC107898842). mRNA   | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii1029032205 XM_016824401.1</a> |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Ziziphus jujuba putative lipid-transfer protein DIR1 (LOC107430687). mRNA  | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii1009157981 XM_016041554.1</a> |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Citrus sinensis hypothetical protein (LOC102613787). mRNA  | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii985460241 XM_006486372.2</a>  |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Salmo salar WD repeat and coiled-coil-containing protein C2orf44 homolog (LOC106571768), transcript variant X4, mRNA | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii929249055 XM_014145221.1</a>  |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Salmo salar WD repeat and coiled-coil-containing protein C2orf44 homolog (LOC106571768), transcript variant X3, mRNA | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii929249053 XM_014145220.1</a>  |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Salmo salar WD repeat and coiled-coil-containing protein C2orf44 homolog (LOC106571768), transcript variant X2, mRNA | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii929249051 XM_014145219.1</a>  |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Salmo salar WD repeat and coiled-coil-containing protein C2orf44 homolog (LOC106571768), transcript variant X1, mRNA | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii929249049 XM_014145218.1</a>  |
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Salmo salar chromosome ssa06 open reading frame, human C2orf44 (cssa06h2orf44), transcript variant X5, mRNA          | 36.2      | 36.2        | 85%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gii929100268 XM_014205711.1</a>  |

### Primer reverso



| Description   | max score | total score | query cover | E value | Ident | Accession                                    |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------|--|
| <input type="checkbox"/> PREDICTED: Theobroma cacao uncharacterized LOC18585987 (LOC18585987). mRNA | 38.2      | 38.2        | 100%        | 0.94    | 100%  | <a href="#">gil1063526822 XM_007009092.2</a> |
| <input type="checkbox"/> Theobroma cacao genome assembly, chromosome: X                             | 38.2      | 38.2        | 100%        | 0.94    | 100%  | <a href="#">gil1042907812 LT594797.1</a>     |
| <input type="checkbox"/> Bifidobacterium breve strain LMC520, complete genome                       | 36.2      | 36.2        | 94%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gil1143275817 CP019596.1</a>     |
| <input type="checkbox"/> Cladophialophora bantliana CBS 173.52 hypothetical protein partial mRNA    | 36.2      | 36.2        | 94%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gil1027056792 XM_016770360.1</a> |
| <input type="checkbox"/> Bifidobacterium breve strain BR3, complete genome                          | 36.2      | 36.2        | 94%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gil927301517 CP010413.1</a>      |
| <input type="checkbox"/> Bifidobacterium breve DSM 20213 = JCM 1192 DNA, complete genome            | 36.2      | 36.2        | 94%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gil781874447 AP012324.1</a>      |
| <input type="checkbox"/> Cladophialophora psammophila CBS 110553 hypothetical protein partial mRNA  | 36.2      | 36.2        | 94%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gil628352717 XM_007753025.1</a>  |
| <input type="checkbox"/> Bifidobacterium breve S27, complete genome                                 | 36.2      | 36.2        | 94%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gil585135449 CP006716.1</a>      |
| <input type="checkbox"/> Bifidobacterium breve 689b, complete genome                                | 36.2      | 36.2        | 94%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gil585133627 CP006715.1</a>      |
| <input type="checkbox"/> Bifidobacterium breve NCFB 2258, complete genome                           | 36.2      | 36.2        | 94%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gil585131792 CP006714.1</a>      |
| <input type="checkbox"/> Bifidobacterium breve JCM 7019, complete genome                            | 36.2      | 36.2        | 94%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gil585129876 CP006713.1</a>      |
| <input type="checkbox"/> Bifidobacterium breve JCM 7017, complete genome                            | 36.2      | 36.2        | 94%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gil585127787 CP006712.1</a>      |
| <input type="checkbox"/> Bifidobacterium breve 12L, complete genome                                 | 36.2      | 36.2        | 94%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gil585125438 CP006711.1</a>      |
| <input type="checkbox"/> Enterococcus mundtii QU 25 DNA, complete genome                            | 36.2      | 36.2        | 94%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gil558607752 AP013036.1</a>      |
| <input type="checkbox"/> Carnobacterium inhibens subsp. qilchinskyi strain WN1359, complete genome  | 36.2      | 36.2        | 94%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gil554508411 CP006812.1</a>      |
| <input type="checkbox"/> Bifidobacterium breve UCC2003, complete genome                             | 36.2      | 36.2        | 94%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gil339478266 CP000303.1</a>      |
| <input type="checkbox"/> Bifidobacterium breve ACS-071-V-Sch8b, complete genome                     | 36.2      | 36.2        | 94%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gil333109300 CP002743.1</a>      |
| <input type="checkbox"/> Carnobacterium sp. 17-4, complete genome                                   | 36.2      | 36.2        | 94%         | 3.7     | 100%  | <a href="#">gil328672706 CP002563.1</a>      |
| <input type="checkbox"/> Pseudomonas syringae pv. actinidiae strain CRAFRU 14.08, complete genome   | 34.2      | 34.2        | 89%         | 15      | 100%  | <a href="#">gil1154277018 CP019732.1</a>     |
| <input type="checkbox"/> Pseudomonas syringae pv. actinidiae strain CRAFRU 12.29, complete genome   | 34.2      | 34.2        | 89%         | 15      | 100%  | <a href="#">gil1154271121 CP019730.1</a>     |
| <input type="checkbox"/> Pseudomonas syringae pv. actinidiae strain NZ-47, complete genome          | 34.2      | 34.2        | 89%         | 15      | 100%  | <a href="#">gil1123403776 CP017009.1</a>     |
| <input type="checkbox"/> Pseudomonas syringae pv. actinidiae strain NZ-45, complete genome          | 34.2      | 34.2        | 89%         | 15      | 100%  | <a href="#">gil1123397914 CP017007.1</a>     |
| <input type="checkbox"/> Pseudomonas fluorescens strain CREA-C16 genome                             | 34.2      | 34.2        | 89%         | 15      | 100%  | <a href="#">gil1102519839 CP017951.1</a>     |
| <input type="checkbox"/> Pseudomonas Vancouverensis strain BS3656 genome assembly, chromosome: I    | 34.2      | 64.4        | 89%         | 15      | 100%  | <a href="#">gil1086083928 LT629803.1</a>     |

**ANEXO 2**



### CALCULO DE LA Tm PARA *THEOBROMA CACAO L.*

Para realizarla se utilizó la siguiente formula  $Tm = ((G+C)4 + (A+T)2) - 5$

**Para *Theobroma cacao L.***

**P.F** AGATGCCTCTGTGCTGTTATG

$$Tm = ((6+4)4 + (3+8)2) - 5 = 57^{\circ}C$$

**P.R** GCCAGATGTCACGGTCAAT

$$Tm = ((5+5)4 + (5+4)2) - 5 = 53^{\circ}C$$

Promedio= 55°C

### ANEXO 3

#### TM CALCULADA PARA PCR DIRECTA DE *THEOBROMA CACAO L.*

The screenshot shows the ThermoFisher Scientific website's Tm Calculator tool. The page includes a navigation bar with a search bar, 'Contacto', 'Sign In', 'Orden Rápida', and a shopping cart icon. Below the navigation bar are links for 'Popular', 'Aplicaciones y técnicas', 'Comprar todos los productos', 'Servicio y Soporte', 'About Us', and 'Cloud'. The breadcrumb trail reads: Home > Marcas > Thermo Scientific > Molecular Biology > Molecular Biology Resource Library > Molecular Biology Resource Library > Thermo Scientific Web Tools > Tm Calculator. The main heading is 'Tm Calculator'. A descriptive paragraph states: 'This application calculates the Tm of primers and estimates an appropriate annealing temperature when using different DNA polymerases. [How to use this calculator](#)'. An 'Important note' section advises: '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.' The interface is divided into two sections: '1. Select your DNA polymerase' and '2. Select input method'. In the first section, 'Platinum SuperFi DNA polymerase' is selected, with a note: '(Also select this option if using the SuperScript IV One-Step RT-PCR Kit)'. Other options are 'Phusion or Phire DNA polymerase' and 'Taq-based DNA polymerase'. In the second section, 'Single pair' is selected, with 'Batch' as an alternative option.



**ThermoFisher SCIENTIFIC** Search All Search Contacto Sign In Orden Rápida

3. Type or paste your sequence

Primer#1: 5'-AGATGCCTCTGTGCTGTTATG 21 nt: A=3.0 T=8.0 C=4.0 G=6.0 CG=47.62%

Primer#2: 5'-GCCAGATGTCACGGTCAAT 19 nt: A=5.0 T=4.0 C=5.0 G=5.0 CG=52.63%

4. PCR Conditions

Primer conc. 0.5 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 | AGATGCCTCTGTGCTGTTATG | 6443.3                 | 195100.0                          | 62.3  | Primer#2 | GCCAGATGTCACGGTCAAT | 5812.8                 | 185100.0                          | 64.2  | 62.3                     |

**TM CALCULADA PARA PCR DIRECTA DEL TERMINADOR T-NOS**

**ThermoFisher SCIENTIFIC** Search All Search Contacto Sign In 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 > Tm Calculator

## 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



**ThermoFisher SCIENTIFIC** Search All Search Contacto Sign In Orden Rápida

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%

4. PCR Conditions

Primer conc. 0.5 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 | GAATCCTGTTGCCGGTCTTG | 6115.0                 | 180500.0                          | 67.1  | Primer#2 | TTATCCTAGTTTGCGCGCTA | 6074.0                 | 182700.0                          | 62.7  | 62.7                     |

## ANEXO 4

### TM CALCULADA PARA PCR DIRECTA DEL PROMOTOR CAMV35S Y EL TERMINADOR T-NOS

**ThermoFisher SCIENTIFIC** Search All Search Contacto Sign In 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 > Tm Calculator

## 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'- 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   $\mu\text{M}$

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 | GCTCCTACAAATGCCATCA | 5716.8                 | 179700.0                          | 61.8  | Primer#2 | GGATAGTGGGATTGTGCGTC | 6244.1                 | 197000.0                          | 64.7  | 61.8                     |

$$Tm = \frac{(Tm \text{ TNOS}) + (Tm \text{ CAMV35S})}{2}$$

$$Tm = \frac{(62.7^{\circ}\text{C}) + (61.8^{\circ}\text{C})}{2} = 62.25^{\circ}\text{C}$$