



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Detección de mango (*Mangifera indica* L.) genéticamente
modificado en fruto fresco y procesados mediante la
reacción en cadena de la polimerasa”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

HERNÁNDEZ ANTONIO ALDO

ASESOR: Dr. José Francisco Montiel Sosa.

COASESOR: M. en M. Josefina Moreno Lara.

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

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

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



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 mango (*Mangifera indica* L.) genéticamente modificado en fruto fresco y procesados mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Que presenta el pasante: Aldo Hernández Antonio

Con número de cuenta: 312240259 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 20 de Noviembre de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
SECRETARIO	I.A. Miriam Alvarez Velasco	
1er. SUPLENTE	M. en C. Araceli Ulloa Saavedra	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	

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

LMCF/cga*

Un agradecimiento especial para **PIAPI** con proyecto “Aplicación de herramientas moleculares en el área agroalimentaria y diagnóstico de enfermedades mitocondriales” con la clave PIAPI1837, por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Un agradecimiento especial para **PAPIIT** con el proyecto “Asociación del fondo genético mitocondrial en enfermedades mitocondriales de la población mexicana” con la clave IN226419, por el apoyo brindado para la realización de este trabajo de tesis.

Gracias a la UNAM por haberme adoptado en sus brazos desde la preparatoria en su plantel de CCH-N y darme así las herramientas necesarias para poder elegir mi carrera profesional, mi rumbo en la vida y el camino que decidí elegir.

Me encuentro completamente agradecido y comprometido con mi institución, la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, que me mostró una nueva forma de ver la vida y así me atrapó en sus raíces de conocimiento, se convirtió en mi segunda casa. Gracias a la institución que me otorgó sus instalaciones y servicios, en donde me presentó a los mejores profesores, que me mostraron el mundo desde la mirada de diversas disciplinas del conocimiento.

Gracias al esfuerzo de mi mamá “bichi” que día a día me muestra el amor a la vida, la importancia de la familia, la magnitud de su amor.

Gracias a mi padre “Pa” que me orienta con la rectitud, la disciplina, el esfuerzo duro, los sacrificios y el respeto.

Gracias a mis hermanos, los “gordos, pachi’s, colis” que siempre me mostraron su apoyo, amor y confianza, me muestran nuevas maneras de ver la vida y me guían.

Gracias a mis cuñadas y sobrinos, que me fortalecen y regeneran las energías de seguir con el legado. Sé que en ellas cuento con mas que familia, como hermanas.

Gracias totales a la familia Gómez López, que me acogió en sus brazos, me dieron la oportunidad de compartir experiencias inigualables y me enseñaron una nueva y diferente vertiente en el camino de la vida. Los quiero, aprecio y admiro.

Gracias a la “chaparrita”, mi karateca favorita, que me acompañó durante toda esta travesía en los buenos y malos momentos, quien me mostro una de las mejores formas de vivir, quien me otorgó su tiempo, amistad y cariño.

Gracias a todos mis camaradas que me otorgaron su amistad y sus buenos deseos. La amistad es uno de los mejores regalos que pude compartir con ustedes y que siempre llevare en mis recuerdos, con todos ustedes tengo experiencias y gratos momentos que compartir.

Mis agradecimientos y respeto a los profesores: Francisco Montiel, Susana Patricia Miranda Castro, **Mayra Vaelly Coronel Flores**, **Josefina Moreno** y **Ana Elvia Sánchez**, que me guiaron durante mi último semestre en la facultad, gracias infinitas por la paciencia, el apoyo, la dedicación, el tiempo y consejos para que este proyecto resultara lo mejor posible.

Gracias a mis profesores y sinodales por su valioso tiempo y apoyo para que este trabajo de tesis se complemente satisfactoriamente: Dr. José Francisco Montiel Sosa, M. en C. Tais Nopal Guerrero, I.A. Miriam Álvarez Velazco, M. en C. Araceli Ulloa Saavedra y Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García.

ÍNDICE

Índice de figuras.	iii
Índice de tablas.	vi
Resumen.	1
Introducción.	2
CAPÍTULO 1: GENERALIDADES	4
1.1 Origen.	4
1.1.1 Taxonomía.	7
1.1.2 Variedades.	9
1.1.3 Biología	12
1.1.4 Importancia	15
1.1.5 El mango en México y el mundo.....	17
1.2 Mango Genéticamente Modificado (GM).	23
1.2.1 Definición	23
1.2.2 Tecnología del DNA Recombinante.	24
1.2.3 Transgénesis de interés para mango.....	27
1.2.4 Promotores CaMV35S y <i>Arabidopsis thaliana</i> y el terminador T-Nos.....	28
1.2.5 Técnicas de detección de organismos genéticamente modificados (OGM).....	32
1.2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	37
1.2.7 Ventajas y desventajas de los OGM	45
1.3 Situación del mango GM en México y el mundo	51
1.3.1 Normatividad y etiquetado	55
1.3.2 Bioseguridad internacional	56
1.3.3 Bioseguridad nacional	57
1.3.4 Leyes y normatividad nacional	57
1.3.5 Etiquetado de OGM	58
1.3.6 Etiquetado en la Unión Europea.....	59
1.3.7 Etiquetado en Estados Unidos	59
1.3.8 Etiquetado en México	60

2	CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	61
2.1	Justificación	61
2.2	Cuadro Metodológico	63
2.3	Descripción de cuadro metodológico	64
2.3.1	Objetivo general	64
2.3.2	Objetivo particular 1	64
2.3.3	Objetivo particular 2	64
2.3.4	Objetivo particular 3	65
2.3.5	Objetivo particular 4	65
2.4	Materiales y Métodos	66
2.4.1	Material biológico	66
2.4.2	Diseño de primers o cebadores	68
2.4.3	Extracción de ADN	69
2.4.4	Cuantificación de ADN	71
2.4.5	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	73
2.5	Electroforesis	80
2.5.1	Electroforesis en gel de agarosa (3% para PCR y 1% para integridad molecular)	80
3	CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
3.1	Objetivo particular 1	83
3.2	Objetivo particular 2	83
3.3	Objetivo particular 3	94
3.4	Objetivo particular 4	102
	Conclusión	117
	Referencias	119
	Anexos	124
	1). Disolución.	124
	2). Cálculos para preparación de muestras PCR.	124
	3). Selección de primers para Mango.	126
	4). Selección de primers para los promotores CaMV35S y <i>Arabidopsis thaliana</i> y el terminador T-Nos	132

Índice de figuras.

Figura 1. Morfología del mango fresco (Vincent, 2012).	8
Figura 2. Estructuras representativas de compuestos fenólicos comunes en <i>M. indica</i> (Pierson et al., 2014).	13
Figura 3. Evolución de la producción mundial de mango en toneladas (CNUCED, 2016). ..	18
Figura 4. Representación de obtención de ADN recombinante (Ortega et al., 2013).	25
Figura 5. ¿Cómo se transforma una planta? Método de <i>Agrobacterium</i> y cañón de partículas (Chipeels y Savada, 2013).	31
Figura 6. Proceso de detección de OGM en alimentos. (Markoulatos, 2004).	33
Figura 7. Representación esquemática de un evento transgénico tipo. De arriba hacia abajo se muestran las estrategias de detección e identificación por PCR en grado creciente de especificidad. Las flechas horizontales indican la ubicación de los cebadores (Holst, 2013). ..	35
Figura 8. PCR, la reacción en cadena de la polimerasa, (Journal Of Visualized Experiments, 2014).	40
Figura 9. Mapa de los cultivos modificados genéticamente en el mundo, (Conocer la agricultura y la ganadería.com, 2015).	53
Figura 10. Gráfico de programa de PCR para muestras de mango.	77
Figura 11. Gráfico de programa de PCR para muestras de promotor CaMV35S y terminador T-nos.	78
Figura 12. Gráfico de programa de PCR para muestras de promotor <i>Arabidopsis thaliana</i> . ..	79
Figura 13. Gel de agarosa al 3% a 60 V, control positivo de primers de mango. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo (mango).	85
Figura 14. Gel de agarosa al 3% a 60 V para prueba de especificidad de primers de mango. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo (mango), (Tri) trigo, (Soy) soya, (Pim) pimiento, (Res) bobino, (Cer) cerdo, (Pez) pescado.	86
Figura 15. Gel de agarosa al 2.5% a 65 V para prueba de control positivo de primers de CaMV35S. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo (CaMV35S).	88
Figura 16. Gel de agarosa al 2.5% a 65 V para prueba de control positivo de primers de T-nos. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo (T-nos).	89
Figura 17. Gel de agarosa al 1.5% a 90 V para prueba de control positivo de primers de <i>Arabidopsis thaliana</i> . (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo (<i>Arabidopsis thaliana</i>).	90
Figura 18. Gel de agarosa al 2.5% a 65 V, especificidad de primers del promotor CaMV35S. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo, (MNTr) maíz no transgénico, (Can) canola y (Ara) <i>Arabidopsis thaliana</i>	91

- Figura 19. Gel de agarosa al 2.5% a 65 V, especificidad de primers del terminador T-nos. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo, (MNTr) maíz no transgénico, (Can) canola y (Ara) *Arabidopsis thaliana*. 92
- Figura 20. Gel de agarosa al 1.5% a 90 V, especificidad de primers del promotor *Arabidopsis thaliana*. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo, (MTr) maíz transgénico, (MNTr) maíz no transgénico y (Can) canola. 93
- Figura 21. Gel de agarosa al 3% a 60 V, para la identificación de mango en frutos fresco por PCR. (MP) marcador de peso molecular 100 pb, (B) blanco, (C+) control positivo para mango, (MF1) mango Ataulfo, (MF2) mango Manila, (MF3) mango Paraíso, (MF4) mango Ataulfo mini, (MF5) mango Ataulfo. 96
- Figura 22. Gel de agarosa al 3% a 60 V, para la identificación de mango en frutos fresco por PCR. (MP) marcador de peso molecular 100 pb, (B) blanco, (C+) control positivo para mango, (MF6) mango Manila, (MF7) mango Paraíso, (MF8) mango Ataulfo, (MF9) mango Manila, (MF10) mango Ataulfo mini. 97
- Figura 23. Gel de agarosa al 3% a 60 V, para la identificación de mango en productos procesados por PCR. (MP) marcador de peso molecular 100 pb, (B) blanco, (C+) control positivo para mango, (MP1) Topping de frutas, (MP2) Mango congelado, (MP3) néctar de mango orgánico. 99
- Figura 24. Gel de agarosa al 3% a 60 V, para la identificación de mango en productos procesados por PCR. (MP) marcador de peso molecular 100 pb, (B) blanco, (C+) control positivo para mango, (MP4) vinagreta de mango, (MP5) aderezo de mango thai, (MP6) mango deshidratado, (MP7) salsa de mango y (MP8) mermelada de mango..... 100
- Figura 25. Gel de agarosa al 3% a 60 V, identificación de mango en productos procesados. (MP) marcador de peso molecular 100 pb, (B) blanco, (C+) control positivo para mango, (MP9) calpico de mango, (MP10) soda de mango. 101
- Figura 26. Gel de agarosa al 2.5% a 65V, detección del promotor CaMV35S en cinco muestras de mango fresco. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: maíz transgénico, (MF1) mango Ataulfo, (MF2) mango Manila, (MF3) Mango paraíso, (MF4) mango Ataulfo mini, (MF5) mango Ataulfo..... 103
- Figura 27. Gel de agarosa al 2.5% a 65V para la detección del promotor CaMV35S en cinco muestras de mango fresco. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: maíz transgénico, (MF6) mango Manila, (MF7) mango Paraíso, (MF8) mango Ataulfo, (MF9) mango Manila y (MF10) mango Ataulfo mini. 104
- Figura 28. Gel de agarosa al 2.5% a 65V para la detección del promotor CaMV35S en cinco muestras de productos procesados. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: maíz transgénico, (MP1) topping de frutas natura planet, (MP2) mango congelado great value, (MP3) Néctar de mango orgánico campo vivo, (MP4) vinagreta de mango extra special y (MP5) aderezo de mango thai vegeta listos. 105
- Figura 29. Gel de agarosa al 2.5% a 65V para la detección del promotor CaMV35S en cinco muestras de productos procesados. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: maíz transgénico, (MP6) mango deshidratado a granel, (MP7) salsa de mango

la virgen, (MP8) mermelada de mango de la costa, (MP9) calpico de mango calpis y (MP10) soda de mango sangil.	106
Figura 30. Gel de agarosa al 2.5% a 65V para la detección del terminador T-nos en cinco muestras de productos procesados. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: maíz transgénico, (MF1) mango Ataulfo, (MF2) mango Manila, (MF3) Mango paraíso, (MF4) mango Ataulfo mini, (MF5) mango Ataulfo.	107
Figura 31. Gel de agarosa al 2.5% a 65V para la detección del terminador T-nos en cinco muestras de mango fresco. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: maíz transgénico, (MF6) mango Manila, (MF7) mango Paraíso, (MF8) mango Ataulfo, (MF9) mango Manila y (MF10) mango Ataulfo mini.	108
Figura 32. Gel de agarosa al 2.5% a 65V para la detección del terminador T-nos en seis muestras de productos procesados. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: maíz transgénico, (MP1) topping de frutas natura planet, (MP2) mango congelado great value, (MP3) Néctar de mango orgánico campo vivo, (MP4) vinagreta de mango extra special, (MP5) aderezo de mango thai vegeta listos y (MP6) mango deshidratado a granel.	109
Figura 33. Gel de agarosa al 2.5% a 65V para la detección del terminador T-nos en cuatro muestras de productos procesados. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: maíz transgénico, (MP7) salsa de mango la virgen, (MP8) mermelada de mango de la costa, (MP9) calpico de mango calpis y (MP10) soda de mango sangil.	110
Figura 34. Gel de agarosa al 1.5% a 90V para la detección del promotor <i>Arabidopsis thaliana</i> en cinco muestras de mango fresco. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: <i>Arabidopsis thaliana</i> , (MF1) mango Ataulfo, (MF2) mango Manila, (MF3) Mango paraíso, (MF4) mango Ataulfo mini, (MF5) mango Ataulfo.	111
Figura 35. Gel de agarosa al 1.5% a 90V para la detección del promotor <i>Arabidopsis thaliana</i> en cinco muestras de mango fresco. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: <i>Arabidopsis thaliana</i> , (MF6) mango Manila, (MF7) mango Paraíso, (MF8) mango Ataulfo, (MF9) mango Manila y (MF10) mango Ataulfo.	112
Figura 36. Gel de agarosa al 1.5% a 90V para la detección del promotor <i>Arabidopsis thaliana</i> en cinco muestras de productos procesados. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: <i>Arabidopsis thaliana</i> , (MP1) topping de frutas natura planet, (MP2) mango congelado great value, (MP3) Néctar de mango orgánico campo vivo, (MP4) vinagreta de mango extra special y (MP5) aderezo de mango thai vegeta listos.	113
Figura 37. Gel de agarosa al 1.5% a 90V para la detección del promotor <i>Arabidopsis thaliana</i> en cinco muestras de productos procesados. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: <i>Arabidopsis thaliana</i> , (MP6) mango deshidratado a granel, (MP7) salsa de mango la virgen, (MP8) mermelada de mango de la costa, (MP9) calpico de mango calpis y (MP10) soda de mango sangil.	114

Índice de tablas.

Tabla 1. Variedades de mango en México.....	10
Tabla 2. Composición nutrimental promedio de pulpa de mango (x100g).	15
Tabla 3. Estimación porcentual de producción y exportaciones en México hasta el 2030. ...	17
Tabla 4. A) Primeros diez países productores de mango (Ton), B) Primeros diez países exportadores de mango (Ton).....	18
Tabla 5. Unidades de producción con cultivo de mango, superficie plantada y cosechada por principales entidades federativas.....	20
Tabla 6. Estrategias de mercado de exportación de México.	21
Tabla 7. Países que siembran cultivos transgénicos a nivel comercial.	52
Tabla 8. Características de origen y rotulado para productos procesados de mango.	66
Tabla 9. Características de origen y rotulado para productos frescos de mango.	67
Tabla 10. Primers seleccionados para PCR.	68
Tabla 11. Cantidades de componentes para agregar por cada muestra: A) Kit Master Mix, B) Kit PCR directa.	76
Tabla 12 Concentración y pureza de muestras de ADN para especificidad de primers de mango.	84
Tabla 13. Concentración y pureza de muestras de ADN para especificidad de primers del promotor CaMV35S.....	87
Tabla 14. Concentración y pureza de muestras de ADN de frutos frescos.....	95
Tabla 15. Concentración y pureza de muestras de ADN de productos comerciales que contienen mango.	98
Tabla 16. Resumen de resultados de la detección de OGM en mango fresco.....	115
Tabla 17. Resumen de resultados de la detección de OGM en productos comerciales que contienen mango.....	116

Resumen.

El mango es uno de los cultivos alimenticios más importantes de México y es ampliamente consumido por personas de todos los grupos de edad, sin embargo, es vulnerable a defectos indeseables que se pudieran originar desde su cosecha y todos los trayectos que conlleva hasta la adquisición por el consumidor. La introducción de características apropiadas mediante ingeniería genética para la resistencia biótica y tolerancia abiótica a las plantas de mango puede reducir las pérdidas que se producen debido a plagas y enfermedades, así mismo, se puede proporcionar una mayor calidad nutritiva, contribuyendo a una alimentación balanceada.

El objetivo principal de este trabajo fue aplicar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando primers de los promotores CaMV35S y *Arabidopsis thaliana* y del terminador T-nos para detectar mango modificado genéticamente.

Se analizaron 10 muestras de mango fresco de distintas variedades y procedencia, así como 10 muestras de productos comerciales que contienen mango en su composición. Por medio de programas bioinformáticos se diseñaron primers específicos para mango. Para los promotores de *Arabidopsis thaliana* y CaMV35S, así como el terminador T-nos se seleccionaron bibliográficamente. La extracción de ADN de las muestras se llevó a cabo empleando el protocolo clásico de Sambrook (2012), con modificaciones experimentales. Se realizó PCR para la identificación de mango en las muestras y para detectar organismos genéticamente modificados.

En los resultados se obtuvieron tres mangos frescos transgénicos y tres productos procesados comerciales que contenían mango modificado genéticamente, de las cuales, ninguna declara la presencia de material transgénico en su etiqueta. Se concluye que en algunos mangos frescos y productos procesados existe la presencia de organismos genéticamente modificados.

Introducción.

Una alternativa para el desarrollo económico de México es el aprovechamiento y explotación racional de las especies domesticadas de animales y plantas. En este sentido, el cultivo y la producción de mango (*Mangifera indica L.*) constituye un pilar del desarrollo social y económico de las regiones tropicales y subtropicales de la República Mexicana, debido a que es fuente generadora de empleos y por la captación significativa de divisas, derivada de la explotación de las múltiples variedades que se cultivan.

Actualmente México se perfila como el principal país exportador de mango (*Mangifera indica L.*) a nivel mundial con 297,295 toneladas anuales, así como quinto productor después de India, China, Tailandia e Indonesia con 1,760,588 toneladas cosechadas por año (SAGARPA, 2017), lo cual representa el 0.87% del PIB agrícola nacional, ya que se produce en 26 de los 32 estados del país; destacando por su producción los estados ubicados en la costa occidental (INEGI, 2007).

El mango tiene la característica de ser un producto altamente perecedero y por lo tanto con corta vida de almacenamiento, por lo que debe ser consumido en un período corto después de su cosecha; sin embargo, entre los principales problemas que enfrenta la industria del mango se encuentra en primer lugar el control de enfermedades (Rivera *et al.*, 2010). Las cuantiosas pérdidas económicas en el cultivo de mango, demanda la generación de nuevas líneas mejoradas resistentes.

La biotecnología mediada por la ingeniería genética tiene potencial para contrarrestar problemas durante la producción del mango, así mismo se ha estudiado según Rivera (2006) la talla del árbol (Mediante la introducción del gen rol C en plantas transgénicas de mango, donde es posible generar plantas de menor tamaño), control de la maduración de frutos (realizado mediante la introducción de genes de la ACC oxidasa), control de insectos (con genes Bt y proteínas insecticidas X-endotoxinas), así como el propio control de enfermedades (con genes de defensa magaininas, quitinasas, defensinas y glucanasas que confieren resistencia contra daños ocasionados por bacterias y hongos).

Esta investigación se encuentra enfocada específicamente a la detección de mango modificado genéticamente en variedades de mango fresco y en productos que lo contengan empleando uno de los métodos más sensibles utilizados en la actualidad: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dicho método permite la amplificación in vitro de secuencias específicas de nucleótidos por medio de iniciadores. Generalmente para plantas transgénicas se utilizan iniciadores que detecten las secuencias utilizadas para la inserción del transgen en el genoma de la planta. Tal es el caso del promotor CaMV35S del virus del mosaico de la coliflor, el terminador T-nos de la nopalina sintetasa y el promotor *Arabidopsis thaliana* para el gen AtSUC2.

En países europeos, el etiquetado de productos derivados de organismos genéticamente modificados es obligatorio cuando contiene más del 1% del contenido modificado. Aunque en México y en la mayoría de los países no es obligatorio el etiquetado de productos transgénicos, la comercialización internacional exige rastreabilidad de los productos que se importan o exportan, así mismo el etiquetado de los productos es prescindible, ya que cada consumidor tiene el derecho de elegir los productos que va a consumir.

CAPÍTULO 1: GENERALIDADES

1.1 Origen.

El mango, pudo haberse originado en la zona comprendida entre Assam –India- y la antigua Birmania –Myanmar- (donde aún existen poblaciones silvestres), pero también puede ser nativo de las laderas bajas del Himalaya o incluso de zonas cercanas a Nepal o Bután, en donde fue domesticado y se expandió rápidamente en los países vecinos y de forma intensiva en el sudeste asiático, adaptándose a distintas condiciones ambientales y exhibiendo una considerable diversidad genética, a partir de los siglos IV ó V a. C por monjes budistas (INEGI, 2007).

Este fruto se cultiva desde hace más de 6 000 años, por lo que es considerado como el fruto tropical más antiguo cultivado por el hombre. Las sagradas escrituras en Sánscrito, las leyendas y el folklore hindú, 2000 años a.c., se refieren a él como de origen antiguo; y desde entonces el árbol de mango ha sido objeto de gran veneración en la India y sus frutos constituyen un artículo estimado como comestible a través de los tiempos (CNUCED, 2016).

A pesar de no ser un cultivo nativo del continente americano ha llegado a ocupar un lugar primordial en su producción y consumo, ha sido plantado a través de todo el trópico: de semiárido a húmedo y subtrópico., Se ha naturalizado en muchas de las áreas en donde ha sido introducido. En un principio, la propagación del mango se realizaba utilizando semillas, lo que daba frutos de tamaño pequeño, con mucha fibra y con un pronunciado sabor indeseable; a pesar de esto, es uno de los árboles frutales más populares a través de su área de distribución (Parrotta, 1993).

Tras la apertura de las rutas comerciales marítimas en el siglo XVI, los portugueses introdujeron el mango, primero al continente africano y después a las costas de Brasil, en América; y de ahí al resto del continente americano llegando a las costas del Golfo de México (estado de Veracruz de Ignacio de la Llave) en el siglo XVII procedente de la isla de Barbados. Del mismo modo, los españoles introdujeron este cultivo a sus colonias tropicales del continente americano por medio del tráfico por el océano Pacífico entre las Filipinas y la costa oeste de México entre los siglos XV y XVI (INEGI, 2007).

Por el año de 1950, viveristas particulares introdujeron germoplasmas de algunos cultivares petacones obtenidos en Florida, Estados Unidos; los que se distribuyeron en los estados del Pacífico, Centro y Norte, y posteriormente por la región tropical de México. Estos cultivares fueron: Haden, Tommy Atkins, Kent, Keitt, Irwin y Zill (INEGI, 2007).

En 1960, el mango era poco conocido entre los consumidores fuera de la zona tropical. Es en años recientes cuando el mango se posicionó como fruta fresca y como producto procesado en el mercado global. El aumento de la producción del mango en las áreas no productoras tradicionales es notable, se incluyen partes de Asia, África del oeste, Australia, Sudamérica y México (Parrotta, 1993).

De acuerdo con los resultados del VIII Censo Agrícola, Ganadero y Forestal (2007), las mejores zonas productoras se han establecido a lo largo de la franja costera del Océano Pacífico y en menor proporción en la zona del Golfo de México.

La multiplicación mediante injertos de variedades monoembriónicas no se desarrolló sí no hasta el siglo XIX, dando lugar a las variedades antillanas como Julie, Amelie, Divine, etc; que se introdujeron en el África occidental. Los mangos comercializados suelen proceder por lo general de una hibridación libre o controlada de variedades originales poliembriónicas o monoembriónicas, cuyas características cruzadas permiten obtener frutas que corresponden a las necesidades del mercado (INEGI, 2007).

Durante el siglo XX se han realizado importantes trabajos de investigación y selección que han dado como resultado la producción de la variedad haden, procedente de la variedad mulgoba en la India, obtenida mediante un injerto en yema. Tras ésta, aparecieron otras muchas variedades que actualmente están muy extendidas en todo el mundo. El cultivo del mango es más favorable en la zona intertropical, pero, recientemente, se ha desarrollado en regiones periféricas como la cuenca mediterránea, donde prospera en Israel, Egipto, Marruecos y España (Meran *et al.*, 2017).

El mango fresco dependió durante mucho tiempo del comercio local, incluso regional, debido a su carácter perecedero. No empezó a comercializarse más allá hasta después de la segunda guerra mundial, paralelamente al desarrollo del transporte aéreo. El transporte marítimo refrigerado de los años 1980 y 1990 incrementó los flujos de mango hacia América del norte y Europa, principales centros de consumo (INEGI, 2007).

1.1.1 Taxonomía.

El mango es indudablemente la especie de mayor importancia de la familia *Anacardiaceae*, tanto por su distribución mundial como por su importancia económica (quinto fruto de consumo mundial y tercero entre los tropicales después del plátano y la naranja). De acuerdo a su clasificación taxonómica, el árbol de mango pertenece a la clase: Dicotiledónea; subclase: Rosidae; orden: Sapindales; suborden: Anacardineae; género: *Mangifera* y especie: *Indica* (INEGI, 2007).

La mayoría de las plantas pertenecientes a la familia del mango son tropicales, entre ellas se ubican las del género *Spondia* (comúnmente conocida como ciruela mexicana). Dentro de la familia del mango, se encuentran también algunos frutos que se consumen secos como el marañón, cuyo nombre científico es *Anacardium occidentale* y el pistache, *Pistacia vera* (CNUCED, 2016).

El árbol de mango se caracteriza por su gran altura, puede medir hasta 25 metros, lo que dificulta el manejo y la cosecha del fruto. Si se prolonga su crecimiento, da como resultado bajos rendimientos de la producción, por lo que la selección de variedades de baja altura y el establecimiento de cultivos con árboles enanos o semi enanos es muy importante para mejorar la producción y facilitar la cosecha (Meran *et al.*, 2017).

El crecimiento de la fruta es sigmoide y continúa hasta la maduración, aunque su velocidad de crecimiento disminuye en la etapa final. El fruto es una drupa aplanada, cuya forma varía de redonda a ovalada oblonga, presenta longitudes de 5 a 30 centímetros, la cáscara es amarilla, anaranjada o verde con chapeos de colores que pueden ser de rojo claro a morado oscuro. Cabe señalar que el pico es una característica muy distintiva del fruto; es una pequeña proyección cónica desarrollada en el extremo de la fruta (INEGI, 2007).

En la figura 1 se esquematiza la morfología del mango fresco descrita por Vincent (2012), en donde se muestran los perfiles principales de medida para el mango.

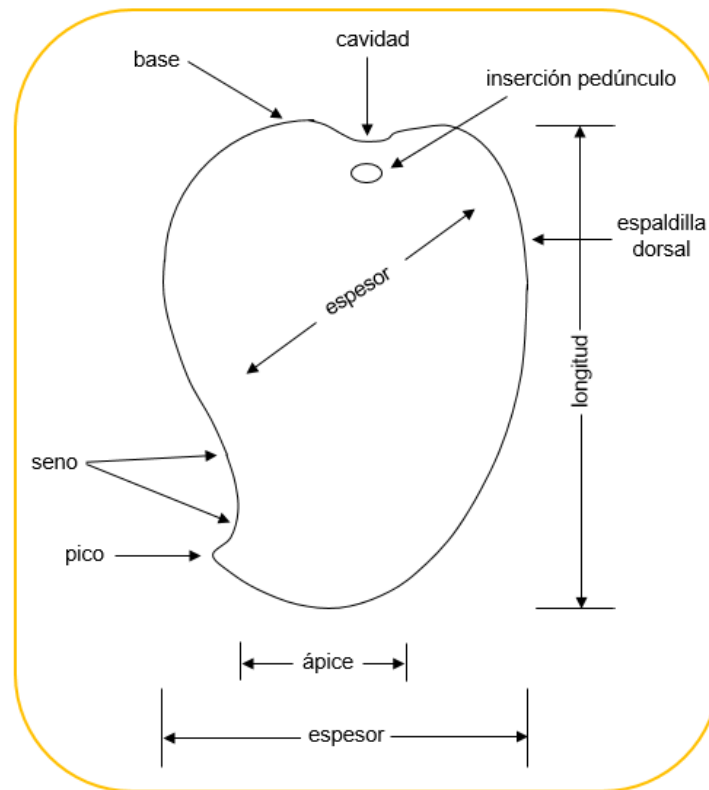


Figura 1. Morfología del mango fresco (Vincent, 2012).

La cáscara (exocarpio) es lisa con lenticelas en forma de pequeñas manchas corchosas circulares, blancas, amarillas y hasta cafés (depende del estado de madurez). La pulpa (también llamada mesocarpio) va de amarilla a anaranjada y ocupa de 65.0 a 85.0% del peso total de la fruta. La semilla (endocarpio) es grande y está cubierta con una capa fibrosa, delgada y dura. La mayoría de las especies de la familia se caracterizan por su alto contenido de resina (SAGARPA, 2017).

Debido a que en el desarrollo y en la calidad influyen varios factores, el fruto del mismo cultivar puede desarrollarse de manera diferente y presentar características distintas en cada región donde se cultiva. Cabe señalar que las variaciones de las condiciones ambientales también

pueden influir en la madurez y en la calidad del fruto. El género *Mangifera* comprende aproximadamente 50 especies nativas del sureste de Asia o las islas circundantes, excepto una, *Mangifera* africana. Cabe destacar que sólo de 3 a 4 especies del grupo producen frutas comestibles; sin embargo, muchas de las otras pueden ser de un valor potencial para fines de mejoramiento (Shah, 2010).

1.1.2 Variedades.

El carácter poliembriónico y monoembriónico del mango crea una cierta inestabilidad varietal. La polinización libre de los árboles puede provocar nuevas variedades. Una misma cepa puede declinarse en múltiples tipos de mango según el lugar de cultivo. Se han clasificado miles de tipos o variedades, sin olvidar que un mismo tipo o variedad puede llamarse de diferentes formas según el país (CNUCED, 2016).

En México, las variedades de mango que se cultivan son: Ataulfo, Haden, Tommy Atkins, Irwing, Keitt, Kent, Manila, Palmer, Sensation, y Van Dyke. En el país las variedades de mango cambian con poca frecuencia en las entidades federativas, aun cuando las condiciones climáticas, edafológicas y económicas varían. Como resultado del proceso de selección y mejoramiento que se ha llevado a cabo, existen numerosas variedades de mango con importancia comercial desarrolladas en distintas partes del mundo (INEGI, 2007).

En la tabla 1 se muestran las principales variedades comerciales de mango en México, donde según la SAGARPA (2017) en el estado de Guerrero, las principales variedades de mango que se cultivan y aprovechan para el comercio son: la variedad Tommy Atkins y Ataulfo.

Tabla 1. Variedades de mango en México.

Variedad	Generalidades	Fotografía
Tommy Atkins	Variedad de Florida de tamaño mediano a grande (450-700 g), aspecto ovalado y ápice redondeado. La coloración es verde y rojiza, con numerosas lenticelas grandes de color verde amarillento. La pulpa es anaranjada, jugosa y fibrosa. Es una variedad productiva y bastante resistente. Su calidad gustativa es media. Está muy extendida en América Latina.	
Kent	Variedad de Florida de gran tamaño (hasta 800 g) y aspecto redondo. Su coloración es verde rojizo con algunas zonas de color amarillo anaranjado, aunque varía considerablemente según las zonas de producción. La pulpa es firme y de color amarillo anaranjado. Su piel es poco espesa y resistente. Es una variedad productiva y resistente con una buena calidad gustativa. Se trata de una variedad de temporada producida en la mayoría de países exportadores de América Latina y África.	
Keitt	Variedad de Florida de tamaño mediano a grande (500-700 g) y aspecto oblongo. Su coloración es verde amarillento rosado, con tonos pastel y numerosas lenticelas amarillas. La pulpa es anaranjada, jugosa y firme, con fibras finas poco molestas. Tiene una buena calidad gustativa. Es una variedad productiva de final de temporada. Está muy repartida en América Latina y África.	
Palmer	De tamaño mediano a grande (450-700 g), forma alargada y oblonga y con un ligero pico apical. Su coloración varía de rojo a morado. La piel es espesa y resistente. La pulpa es de color amarillo anaranjado y su calidad gustativa satisfactoria. Se trata de una variedad bastante productiva y de finales de temporada.	

Amelie	Variedad de las Antillas de tamaño mediano (300-600 g), aspecto redondeado y con un pico más o menos marcado. Su coloración es verde anaranjado. La pulpa es de color naranja intenso, sin fibras y tierna. Tiene una buena calidad gustativa. Se trata de una variedad precoz y de temporada.	
Valencia	Variedad de tamaño mediano a grande (400-700 g) y aspecto alargado. Su coloración es verde amarillento con tonos anaranjados. La pulpa es amarillo anaranjado. Tiene una buena calidad gustativa y es bastante precoz.	
Haden	Variedad de Florida de tamaño mediano (350-550 g) y aspecto redondo. Su coloración es amarillo y roja, con lenticelas. Es poco productiva. La pulpa es amarillo anaranjado y un poco acidulada. Tiene una buena calidad gustativa.	
Ataulfo	El fruto es de color amarillo, resistente al manejo, su peso aproximado es de 200 a 370 gramos y presenta muy poca fibra. El primer árbol de esta variedad creció de manera natural en los alrededores de Tapachula, Chiapas; se desconocen los progenitores. Es la variedad más nueva en el mercado de exportación, tiene muy buena aceptación por su excelente calidad, sobre todo entre los latinos y asiáticos.	

Fuente: CNUCED, 2016.

En el país han surgido nuevos clones: en Veracruz de Ignacio de la Llave, el Manila por su mayor rendimiento; en Chiapas, el Edward, que es poco alternante, de cosecha temprana y excelente calidad, sin fibra y moderadamente resistente a la enfermedad antracnosis. En Sinaloa destacan el Ah-Ping y Osteen; esta última variedad es intermedia, ya que se cosecha de julio a agosto y sus frutos son amarillo-naranja con chapeo púrpura (SAGARPA, 2017).

Otra variedad atractiva para el mercado de exportación es la Van Dyke, que se cosecha entre julio y agosto, produce frutos con peso de 250 a 500 gramos; son de excelente sabor y color atractivo, con base amarilla y chapeo rojizo. La pulpa es firme, jugosa y con poca fibra. Es de producción elevada a regular; sin embargo, el fruto presenta un desorden fisiológico semejante a la que ocurre en la variedad Tommy Atkins. Estas nuevas variedades se pueden aprovechar en el contexto estatal con la intención de mejorar la calidad del producto dirigido al mercado externo sin dejar a un lado el interno, que en los últimos años ha venido creciendo sobre todo en los estados del norte del país (INEGI, 2007).

1.1.3 Biología

Como menciona Meran (2017), se ha descrito una gran variedad de compuestos químicos en *Mangifera indica*; entre estos, los polifenoles (flavonoides, xantonas y ácidos fenólicos) que son los tipos de compuestos más abundantes, así como el ácido gálico, catequinas, quercetina, kaempferol, ácido protocatecúico, ácido elágico, propil y galato de metilo, ramnetina y antocianinas son los principales compuestos polifenólicos reportados.

Mangiferin es un compuesto polifenólico bien conocido que ha sido ampliamente estudiado por sus numerosas propiedades biológicas. Las cantidades de diferentes polifenoles en el mango dependen de la parte y variedad del mango. Se ha demostrado que las propiedades antioxidantes son las principales propiedades biológicas de casi todos los polifenoles de *M. indica*; el ácido ascórbico y el ácido deshidroascórbico (forma oxidada del ácido ascórbico) son otros dos polifenoles comunes que se encuentran (Meran *et al.*, 2017).

El color amarillo brillante de la cáscara y la carne de la fruta de *M. indica* se debe a la presencia de carotenoides; así como los compuestos principales reportados para el aroma del mango son 3-careno, limoneno, α -pineno, p -cimeno, acetaldehído, etanol y hexanal Moreno *et al* (2010). Biológicamente son muy buenos captadores de radicales libres; se ha informado de que

los carotenoides se biosintetizan en la fruta y la concentración de carotenoides aumenta con la maduración, de esta forma los β - caroteno, luteoxantina, violaxantina, neoxantina, zeaxantina y criptoxantina son los principales carotenoides que se encuentran en la carne y cáscara de la fruta. Entre estos, el β - caroteno es el más abundante, (SAGARPA, 2017).

En la figura 2 se esquematizan las principales estructuras representativas de compuestos fenólicos en variedades de *Mangifera indica*. L, destacando la mangiferina y el ácido galico.

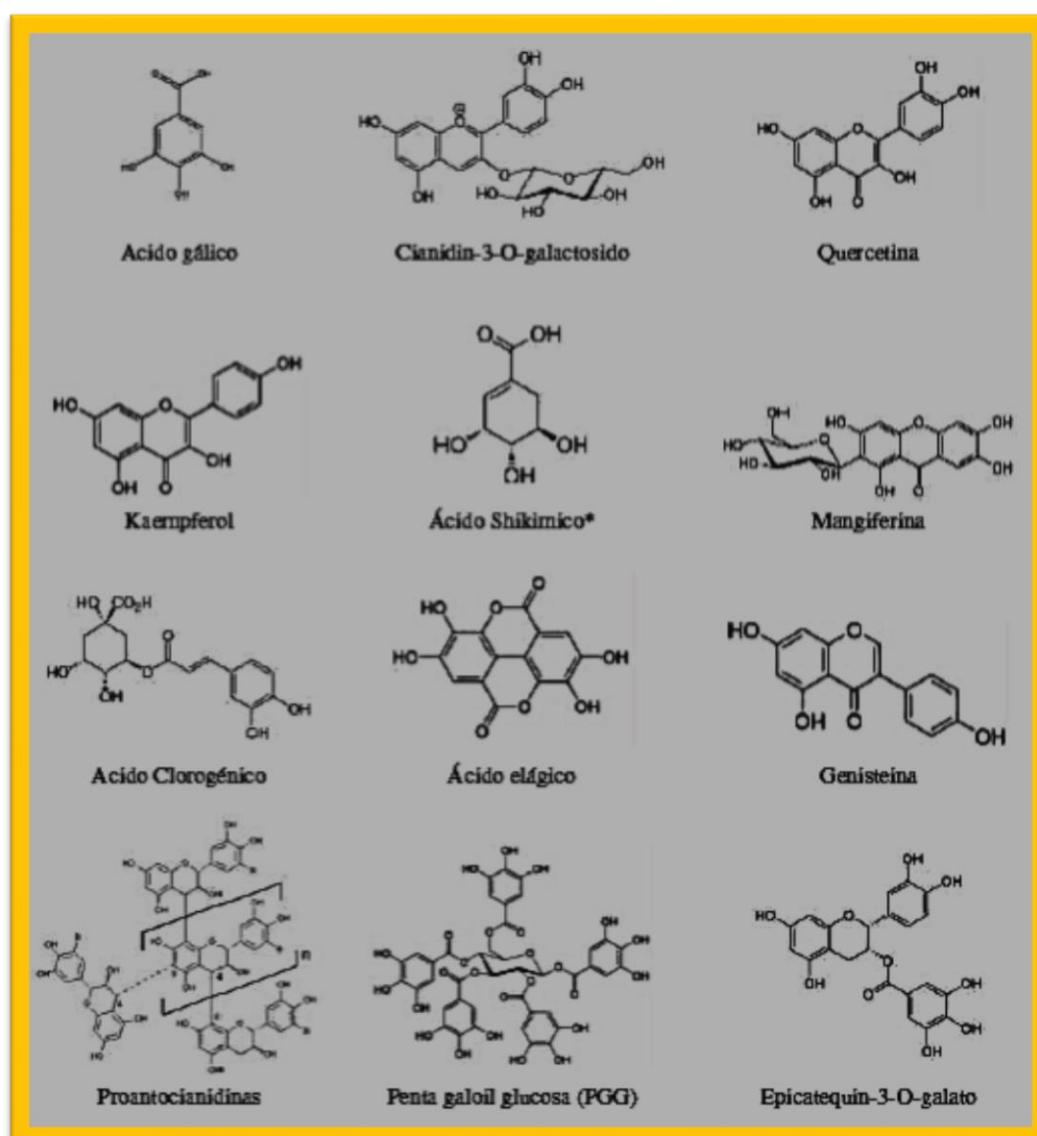


Figura 2. Estructuras representativas de compuestos fenólicos comunes en *M. indica* (Pierson *et al.*, 2014).

Se informa que *M. indica* contiene varios terpenoides, entre ellos: ocimeno, terpinoleno, mirceno o limoneno; estos terpenoides son volátiles y se involucran dentro de la combinación de compuestos responsables del aroma en *M. indica*. Lupeol y lupeollinoleate son otros dos triterpenoides comunes que se encuentran en el mango. Los gallotanines (taninos hidrolizables) son otra clase de compuestos químicos que se encuentran en la corteza, las hojas, el grano y la pulpa de fruta (Shah *et al.*, 2010).

También se ha informado la presencia de tocoferoles, entre los que destaca el alfa-tocoferol, el beta-tocoferol y la gamma-tocoferol, los cuales se encuentran comúnmente en los tocoferoles en la cáscara y la carne de la fruta. Los lípidos resorcinólicos (lípidos fenólicos) son otra clase de compuestos naturales que se encuentran. El aislamiento de una amplia gama de lípidos resorcinólicos con diferentes propiedades biológicas se ha informado de las cáscaras de fruta, la carne y la corteza de *M. indica* (Meran *et al.*, 2017).

El mango no solo es rico en estos nutrientes, sino que además tienen altos contenidos de otros fitoquímicos que no son nutrientes y confieren un beneficio a la salud; razón por la cual su consumo es esencial para que el organismo humano funcione en forma adecuada. Dicho lo anterior, sus componentes funcionales se pueden agrupar en dos principales grupos: El primero, caracterizado por ingredientes funcionales nutritivos (como los mencionados en la Tabla 2) y el segundo: que se complementa entre ingredientes funcionales no nutritivos como la fibra dietaria o compuestos fenólicos, entre otros. En lo que a compuestos fenólicos y vitaminas se refiere, distintos factores genéticos y ambientales modifican su cantidad en el mango: condiciones de cultivo, el estado de maduración del fruto, exposición a la luz por mencionar solo algunos ejemplos. Sin embargo, es posible encontrar un perfil de estructuras químicas bastante homogéneo entre diversas variedades de mango (Wall *et al.*, 2015).

En la tabla 2 se esquematizan los macronutrientes y micronutrientes característicos de *Mangifera indica L.*

Tabla 2. Composición nutrimental promedio de pulpa de mango (x100g).

Macronutrientes (g)		Minerales (mg)		Vitaminas (mg)			
Agua	83.5	Ca	11	AA	36.4	A (EqR)	54
Proteína	0.8	Fe	0.16	Tiamina	0.03	A (IU)	1082
Grasa	0.4	Mg	10	Riboflavina	0.04	E	0.9
CHOS	15.0	P	14	Niacina	0.67	K (µg)	4.2
Fibra	1.6	K	168	B6	0.12	D (µg)	0
Azúcares	13.7	Na	1	Folatos (µg)	43	B12 (µg)	0
Energía (Kcal)	60	Zn	0.09				

Fuente: Wall *et al.*, 2015.

1.1.4 Importancia

Su consumo no se limita al fruto fresco, ya que es posible encontrarlo en presentaciones variadas de jugos, helados, dulces, mermeladas y conservas, entre otros; de la misma forma industrialmente se procesa en pulpa, encurtidos y productos congelados principalmente. El mango es considerado como una fruta particularmente saludable debido a su elevado contenido de agua (83.5%), por lo que diversifica una agradable forma de hidratarse (SAGARPA. 2017).

El mango es un alimento funcional con valor agregado que ha sido subestimado en el terreno de la prevención a la salud. Su cáscara resulta una excelente fuente no solo de compuestos fenólicos sino también de fibra igual o mejor que lo ya reportado en la literatura científica formal para el caso de su pulpa. Como parte de una alimentación balanceada y funcional, de mango completo (cáscara + pulpa) podría tener mucho mejores beneficios que el consumo individual de pulpa mínimamente procesada. Ahora bien, como fuentes de compuestos nutraceuticos, ambas poseen un perfil específico para el tratamiento de patologías de forma diferencial. Establecer procesos eficientes para el procesamiento del mango y para la extracción

de estos compuestos bioactivos tanto de la cascara como de la pulpa es una ardua, pero retribuable labor, por el potencial nutracéutico que estas materias primas representan (Wall *et al.*, 2015).

La producción de mango, desde hace algunos años, ha adquirido importancia en la economía del país. El cultivo de mango, desde la década de los años 80, registra un importante crecimiento; no obstante, la falta de organización e inversión ha originado que países latinoamericanos se posicionen en el mejor mercado del mundo: Estados Unidos (INEGI, 2007).

Por otra parte, la ubicación geográfica de las regiones costeras del país permite casi de manera natural obtener rendimientos aceptables del cultivo de mango, esto favorece su crecimiento y la exportación a diferentes países del mundo. El mango se produce en 26 de los 32 estados del país; destacan por su producción los estados ubicados en la costa occidental, que incluye parte de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán de Ocampo, Guerrero, Oaxaca y una porción de Chiapas; actualmente se satisface el 100% de los requerimientos nacionales con producción interna; así mismo las importaciones mundiales han aumentado 34.75% en la última década lo que ha generado un incremento en las exportaciones mexicanas, principalmente con destinos a Estados Unidos y Canadá (INEGI, 2007).

En la tabla 3 se esquematiza una estimación de producción y exportaciones de mango en México de 2016 al 2030.

Tabla 3. Estimación porcentual de producción y exportaciones en México hasta el 2030.

AÑO/PERIODO	ESTIMACIONES**				CRECIMIENTO ACUMULADO**				CRECIMIENTO PROMEDIO ANUAL**	
	2016	2018	2024	2030	2003-2016	2016-2018	2016-2024	2016-2030	2003-2016	2016-2030
Producción potencial*** (millones de toneladas)	1.89	2.00	2.35	2.69	38.60%	6.10%	17.25%	42.69%	2.54%	2.40%
Exportaciones (millones de toneladas)	0.36	0.44	0.67	0.89	65.13%	22.09%	52.64%	148.23%	3.93%	6.25%
Valor de exportaciones (millones de dólares a precios de 2016)	377.39	460.74	703.30	936.79						

Fuente: SAGARPA, 2017.

Estas entidades contribuyen de manera importante en la producción de mango, ya que aportan un volumen de producción significativo para el mercado nacional e internacional. En México, el consumo de mango registra incrementos importantes durante los últimos años; durante el periodo 1991 a 1997, el consumo se incrementó 15%, a un ritmo de crecimiento de 2.4% anual. Se cree que en el país existe gran potencial para incrementar el consumo per cápita de mango, actualmente es superior a los 12 kilos por persona (SAGARPA, 2017).

1.1.5 El mango en México y el mundo

El mango se encuentra, con algo más de 43 millones de toneladas, en octava posición de las frutas más producidas en todo el mundo. Su producción incrementó de un 75 % entre los años 2000 y 2013.

En la figura 3 se muestra el gráfico de la producción mundial de mango hasta el 2013, en donde se representan hasta 45 millones de toneladas anuales.

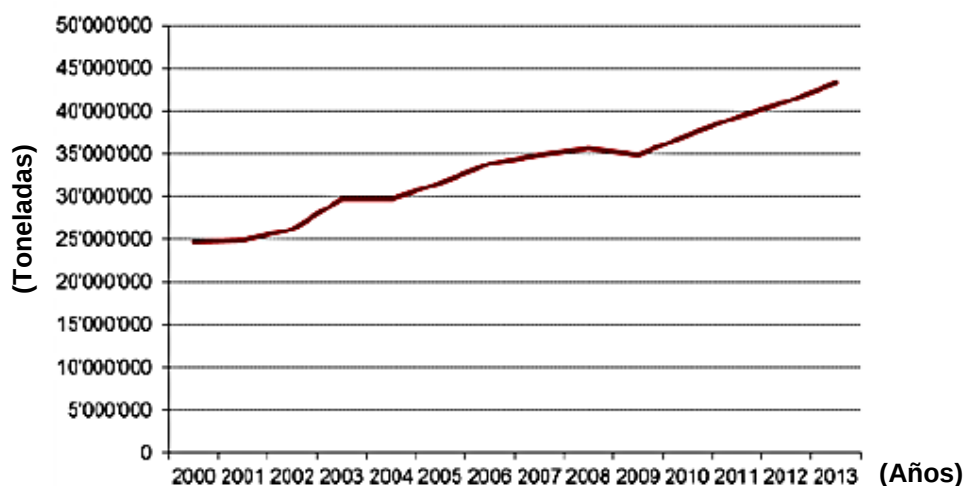


Figura 3. Evolución de la producción mundial de mango en toneladas (CNUCED, 2016).

Aunque muy repartido en la zona intertropical, la producción está concentrada en algunos países. Los primeros diez países productores producen cerca de un 77 % del volumen mundial; Asia abarca el 72 % de la producción mundial total, seguida de África, con un 17 %, y América Latina, con un 10 %. En la siguiente tabla se muestran los principales países productores y exportadores de mango hasta 2016 (CNUCED, 2016).

Tabla 4. A) Primeros diez países productores de mango (Ton), B) Primeros diez países exportadores de mango (Ton).

India	16 196 000
China	4 400 000
Tailandia	2 985 530
Indonesia	2 376 339
México	1 760 588
Pakistán	1 680 388
Brasil	1 175 735
Bangladesh	945 059
Nigeria	860 000
Egipto	786 528

A)

México	297 295
India	214 640
Tailandia	196 441
Brasil	127 132
Pakistán	101 164
Perú	99 790
Ecuador	60 139
Yemen	43 467
Filipinas	24 076
Egipto	19 564

B)

Fuente: CNUCED, 2016.

Aunque los principales países exportadores, a excepción de China, forman parte de los principales productores, muchos países productores modestos desempeñan un papel importante en el comercio internacional como, por ejemplo: Israel, Puerto Rico y República Dominicana. Los primeros diez países exportadores representan cerca del 80 % de los intercambios mundiales. La importancia de las diferentes regiones de producción en el comercio no refleja necesariamente su peso en producción. Los países de Asia sólo comprenden un 46 % de las exportaciones mundiales; en el caso de África, son de sólo un 3 %. Sin embargo, los países latinoamericanos, cuya producción sólo representa un 10 % del total mundial, abarcan un 48 % de los intercambios internacionales (Fresh Plaza, 2018).

Es difícil calcular la importancia del sector del mango transformado. No existen datos estadísticos o éstos agrupan a menudo productos procedentes del mango (puré, zumo, etc.) con productos procedentes de otras frutas. No obstante, se pueden mencionar algunos aspectos. A parte del mango deshidratado, para el cual se estima que las importaciones europeas son de alrededor de 3 400 toneladas, los productos transformados a base de mango son principalmente conservas, purés congelados y néctares. Los principales productores de pulpa congelada son la India, Filipinas, Tailandia y México. China, el Perú y Brasil intervienen en cantidades aparentemente menos importantes. Además de la pulpa congelada, Tailandia orienta una parte de su producción a las conservas. El volumen transformado producido a base de mango parece crecer desde el año 2000, con una aceleración entre los años 2006 y 2010 (CNUCED, 2016).

Según los resultados del Censo Agropecuario 2007, en el país existen 61 512 unidades de producción con cultivo de mango, que en conjunto registran 223 162 hectáreas de superficie plantada; de éstas, 89.8% (200 489.2 hectáreas) se encuentran en producción. El volumen cosechado en ese mismo año es de 2 334 762.7 toneladas.

Así mismo en el interior del país, destaca por la cantidad de unidades de producción con cultivo de mango, el estado de Guerrero (13 967), seguido de Veracruz de Ignacio de la Llave (9 336) y Chiapas (8 443), estas tres entidades federativas concentran 5 de cada 10 unidades de producción existentes en el país. De esta forma Nayarit, Guerrero y Chiapas son las entidades federativas con mayor superficie plantada y en producción, juntas concentran 44.4 y 43.1% de las hectáreas registradas con cultivo de mango del país, respectivamente. En cuanto al volumen cosechado, sobresalen Michoacán de Ocampo con 381 939.8 toneladas, Nayarit con 367 527.8, seguido de Guerrero con 300 292.3 toneladas cosechadas, estas entidades aportan casi la mitad (45.0%) de la producción nacional de mango. De las entidades seleccionadas, el menor número de unidades de producción se registra en Baja California Sur (604); este estado aporta el 5.4% de la producción total del país (SAGARPA, 2017).

En el siguiente recuadro se muestran los principales estados de la república mexicana con producción de cultivo de mango y superficie plantada-cosechada hasta 2007.

Tabla 5. Unidades de producción con cultivo de mango, superficie plantada y cosechada por principales entidades federativas.

Entidad federativa	Unidades de producción	Superficie (hectáreas)		Volumen cosechado (toneladas)
		Plantada	En producción	
Estados Unidos Mexicanos	61 512	223 162.0	200 489.2	2 334 762.7
Guerrero	13 967	30 957.2	27 157.6	300 292.3
Veracruz de Ignacio de la Llave	9 336	20 825.0	19 749.3	210 003.3
Chiapas	8 443	29 601.0	26 519.6	287 009.6
Nayarit	6 965	38 548.5	32 782.8	367 527.8
Oaxaca	5 015	15 389.6	13 421.4	147 045.0
Michoacán de Ocampo	4 049	25 570.6	23 538.6	381 939.8
Sinaloa	2 933	27 044.1	24 837.6	290 921.1
Campeche	2 023	3 321.9	3 001.7	32 440.9
Jalisco	1 467	6 995.4	6 065.4	67 243.0
Yucatán	984	684.6	599.9	6 113.8

Fuente: INEGI, 2007.



La SAGARPA (2017) promueve algunas estrategias para maximizar el desarrollo de los cultivos de mango:

- Instrumentar un parque tecnológico integral para la producción de mango.
- Minimizar la estacionalidad y desarrollar nuevas variedades.
- Elaborar estudios de mercado del producto fresco, así como de los subproductos del mango en el mercado nacional e internacional.
- Instrumentar un plan de producción integral para incrementar el consumo de mango y fomentar la diversificación de mercados.
- Impulsar la poda mecanizada para incrementar el rendimiento por hectárea y reducir el costo de producción.
- Realiza campañas fitosanitarias para las áreas comerciales en contra de la mosca de la fruta y la escama blanca.
- Promover asesoría técnica profesional con enfoque de redes de innovación.
- Implementar un sistema de reducción de riesgos de contaminación orientado hacia las buenas prácticas agrícolas y buenas prácticas de manufactura del mango.

En la tabla 6 se muestran las principales estrategias de mercado que ha planteado México para fortalecer las exportaciones.

Tabla 6. Estrategias de mercado de exportación de México.

ESTRATEGIA	PAÍS(ES)	¿CÓMO?
CONSOLIDAR	Estados Unidos, Canadá y Japón	Se sugiere fortalecer el comercio libre de arancel mediante el TLCJM con Japón y en el marco de la renegociación del TLCAN, ofreciendo producto de alta calidad, mediante el desarrollo de esquemas de protección de propiedad intelectual y diferenciación de mercados, así como acceder a los segmentos de mayor precio y promover el reconocimiento del mango Ataulfo del Soconusco, Chiapas, como producto distintivo de México en estos países.
EXPANDIR	Estados miembros de la Unión Europea, ⁴ AELC y AP	Se propone incrementar el flujo de exportación con estos países, así como solicitar el reconocimiento de la denominación de origen. Lo mismo en el caso de Reino Unido dada su salida de la Unión Europea y la eventual negociación de un TLC.
DESARROLLAR	Vietnam y Corea del Sur	Se recomienda solicitar reducciones arancelarias para la exportación, ya sea a través de la negociación del denominado TPP 11, de su incorporación a la Alianza del Pacífico como Estados asociados o con base en un TLC bilateral.

Fuente: SAGARPA, 2017.



Las exportaciones mundiales ilustran el dinamismo de este producto. Gracias a una producción muy superior a los intercambios, las ventas deberían continuar creciendo en los próximos años. Las importaciones en grandes centros de consumo como América del Norte, Europa y los países asiáticos siguen aumentando, incluso si se percibe una disminución desde hace algunos años. Algunos países, como los del este de Europa y Rusia, constituyen reservas de consumo que podrían desarrollarse con el aumento del nivel de vida. Además, el comercio regional intracontinental, todavía poco explotado, presenta posibilidades. Se están desarrollando intercambios entre países sudamericanos, africanos y asiáticos, aunque con lentitud. La estacionalidad de la producción favorece este tipo de intercambios, así como los tratados regionales como el MERCOSUR, la ASEAN o la CEDEAO (CNUCED, 2016).

Sin embargo, muchos países productores no consiguen comercializar su producción por falta de infraestructuras logísticas y comerciales, lo que supone una pérdida no despreciable de productos. Por último, el sector de la transformación representa un eje interesante para tratar el importante volumen de productos frescos que no se comercializa. A pesar de que el producto no es adecuado para todo tipo de transformación debido a su gran proporción de materia seca, la industria alimentaria está en crecimiento y puede ser una salida atractiva que, además, elimine el aspecto estacional de la producción (CNUCED, 2016).



1.2 Mango Genéticamente Modificado (GM).

1.2.1 Definición

Un organismo transgénico es un organismo genéticamente modificado que lleva incorporado uno o más genes provenientes de una especie diferente a la suya. Cualquier ser vivo al cual se le haya modificado su genoma, al añadir, eliminar, inactivar o sustituir algún gen se le denomina como Organismo genéticamente modificado (OGM), este término se reserva solo en casos en que se haya producido una modificación planificada y realizada empleando técnicas de Ingeniería Genética (Ortega *et al.*, 2013).

El término “alimento transgénico” hace referencia a aquel que deriva de un organismo transgénico o genéticamente modificado. En su sentido más amplio, un alimento puede ser transgénico porque está formado en gran parte por materiales derivados de un OGM, o bien porque en su fabricación se emplearon materias primas GM (levaduras, bacterias, etc), o ingredientes que provienen de OGM (aceites, aminoácidos, ácidos orgánicos, enzimas, jarabes, almidón, lecitina, entre otras) (Levitus, 2008).

Los cultivos transgénicos comercializados hasta el momento, y que son utilizados en la industria alimentaria, han sido modificados genéticamente en dos rasgos principales: la resistencia a insectos y la tolerancia a herbicidas, y en los últimos años se han obtenido plantas transgénicas con la intención de producir alimentos que sean mejores que los convencionales en su composición nutricional, proteínas o vitaminas (Milani, 2014).



1.2.2 Tecnología del DNA Recombinante.

La tecnología del ADN recombinante es un conjunto de técnicas moleculares para localizar, aislar, alterar y estudiar segmentos de ADN, Pierce (2009). El término recombinante se utiliza porque a menudo el objetivo es combinar ADN de fuentes distintas. La tecnología de ADN recombinante también es denominada con frecuencia como ingeniería genética o clonación de genes. Estas técnicas son metodologías ligeramente diferentes que están interrelacionadas (Pierce, 2009).

Los procedimientos básicos del ADN recombinante de acuerdo con Cultek (2009) son:

1. Los fragmentos de ADN se generan utilizando unas enzimas de restricción, que reconocen y cortan las moléculas de ADN por secuencias nucleotídicas específicas.
2. Los fragmentos producidos mediante la digestión con enzimas de restricción se unen a otras moléculas de ADN que sirven de vectores. Los vectores pueden replicarse autónomamente en una célula hospedadora y facilitan la manipulación de la molécula de ADN recombinante recién creada.
3. La molécula de ADN recombinante, formada por un vector que lleva un segmento de ADN insertado, se transfiere a una célula huésped. Dentro de esta célula, la molécula de ADN recombinante se replica, produciendo docenas de copias idénticas conocidas como “clones”.
4. Al replicarse las células huésped, las células descendientes heredan el ADN recombinante, creándose una población de células idénticas, que llevan todas las secuencias clonadas.
5. Los segmentos de ADN clonados pueden recuperarse de las células huésped, purificarse y analizarse.

Potencialmente, el ADN clonado puede transcribirse, su ARNm puede traducirse, y el producto génico puede aislarse y examinarse.

En la figura 4 se representa la obtención de ADN recombinante, en donde se lleva a cabo la inserción de un fragmento de ADN en un plásmido e introducción del plásmido recombinante en una célula bacteriana. Las bacterias que contienen el plásmido se seleccionan haciéndolas crecer en un medio que contenga un antibiótico; de esa forma solo sobrevivirán las bacterias portadoras del plásmido (Ortega *et al.*, 2013).

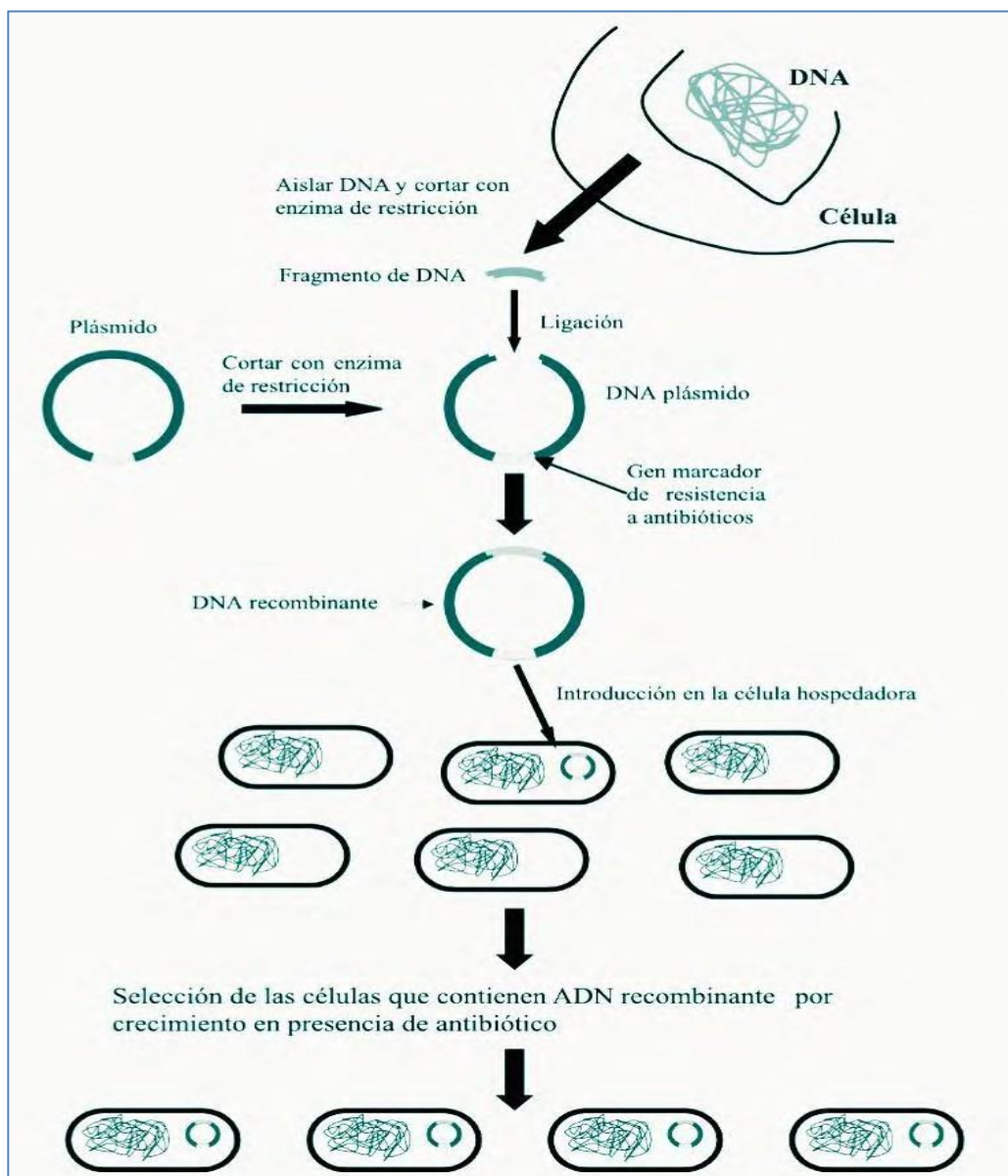


Figura 4. Representación de obtención de ADN recombinante (Ortega *et al.*, 2013).



1.2.2.1 Enzimas de restricción.

El desarrollo fundamental que posibilitó la tecnología del ADN recombinante fue el descubrimiento, a fines de la década de 1960, del plásmido de ADN y las enzimas de restricción (endonucleasas de restricción). El plásmido de ADN es una forma circular de ADN autorreplicante que los científicos pueden manipular para transportar y clonar otros trozos de ADN. Las enzimas de restricción, reconocen y establecen cortes en las cadenas dobles del ADN en secuencias de nucleótidos específicas. Estas enzimas son producidas en forma natural por las bacterias, que las utilizan en la defensa contra los virus (Thieman y Palladino, 2010).

1.2.2.2 Vectores de clonación.

Como menciona Pierce (2009), un vector de clonación es una molécula de ADN replicante y estable a la cual puede adherirse un fragmento de ADN ajeno para introducirlo en una célula.

Un vector de clonación eficaz tiene tres características importantes:

- I. Un origen de replicación, que asegura que el vector se reproduzca dentro de la célula.
- II. Marcadores de selección, que permiten seleccionar o identificar todas las células que contiene el vector.
- III. Uno o más sitios de restricción únicos dentro de los cuales puede insertarse un fragmento de ADN.

Los sitios de restricción utilizados para la clonación deben ser únicos; si un vector se corta en múltiples sitios de reconocimiento y genera varias piezas de ADN, no habrá manera de que estas piezas vuelvan a reunirse después en el orden correcto (Pierce, 2009).

1.2.3 Transgénesis de interés para mango.

De esta forma, como describe Rivera (2006), se han buscado soluciones para atender problemáticas relacionadas al manejo industrial del mango y se han obtenido resultados positivos, por ejemplo:

- Alternancia. Se ha reportado que la actividad en el meristemo de la flor del gen LEAFY de *Arabidopsis thaliana* causó inicio en la floración en álamo transgénico, por lo que puede ser posible sobrellevar los problemas de alternancia utilizando este gen bajo un apropiado promotor de desarrollo.
- Talla del árbol. Mediante la introducción del gen *rolC* en plantas transgénicas de mango es posible generar plantas de menor tamaño. El gen *rolC* de *Agrobacterium rhizogenes* ha sido reportado con potencial para el control del tamaño de árbol y generar plantas pequeñas.
- Control de la maduración de frutos. Esto puede ser realizado mediante la utilización de estrategias del antisentido con genes tal como la ACC oxidasa con promotores dirigidos para su expresión en fruto.
- Control de enfermedades. La transformación genética del mango con genes de defensa (defensinas y magaininas) así como los genes de quitinasas y glucanasas podrán conferir resistencia contra enfermedades ocasionada por bacterias y hongos.
- Control de insectos. Es posible realizar la transformación genética del mango con algunos de los genes Bt y las proteínas insecticidas X-endotoxinas, las cuales han sido utilizadas para el control de insectos en varias plantas.
- Selección de genotipos. Mediante el uso de los marcadores de ADN es posible seleccionar genotipos especiales los cuales servirían para reducir el número de cruces utilizadas en los procedimientos tradicionales para mejorar características específicas.

Como menciona Rivera (2006), la transformación de embriones de mango con el gen *J1* de chile pimienta, el ensayo *in vitro* reveló que al igual que el fungicida comercial benomilo (control positivo), el extracto proteico obtenido de los tejidos transformados, logró inhibir el crecimiento de los hongos de *C. gloeosporioides*, *A. niger* y *Fusarium* sp., formando un halo de inhibición del crecimiento micelial, el cual no se presentaba en los tejidos sin transformar.

1.2.4 Promotores CaMV35S y *Arabidopsis thaliana* y el terminador T-Nos.

Con frecuencia para expresar el transgen en una planta este se coloca detrás de un promotor, que permite su transcripción. La mayoría de las veces se usa el promotor CaMV35S y terminador T-Nos, del virus mosaico de coliflor y de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* del gen de la nopalina sintetasa respectivamente. Ambos, CaMV35S y T-Nos, son ampliamente utilizados para construir plantas transgénicas y la amplificación de estas secuencias específicas en un alimento ya que se genera una abundante producción de la proteína transgénica en una amplia variedad de situaciones, sin necesidad de conocer la secuencia específica del gen introducido, la presencia de estos nos indica que está fabricado o contiene una planta transgénica (Ortega *et al.*, 2013).

El promotor para el gen AtSUC2 de *Arabidopsis thaliana* se caracteriza por regularizar el etileno, responsable de la modulación del crecimiento y desarrollo de las plantas; Este se produce en la mayoría de los órganos de las plantas, aunque la tasa de producción depende del tipo de tejido y del estado del desarrollo. La producción de etileno es autocatalítica ya que el fruto sintetiza más etileno para mantener niveles elevados durante la maduración, así pues, se utiliza el gen AtSUC2 como inhibidor de compuestos relacionados a la maduración del mango (Camacho 2007).



El análisis funcional de un promotor requiere del conocimiento de secuencias de nucleótidos en la región regulatoria; una buena visión de esta construcción es realizada bajo tres aspectos: (a) El sujeto promotor tiene la función de análisis; (b) se reporta un gen; (c) se señala el término de la transcripción (Tagu y Moussard, 2006).

Las técnicas de ingeniería genética y el uso de nuevos conocimientos científicos permiten modificar los organismos mediante intervenciones precisas, rápidas y controladas. Incluso, es posible transferir a las plantas información genética de organismos no emparentados.

En la actualidad esta metodología es aplicada rutinariamente y son muchos los esfuerzos y los recursos que se invierten con el objetivo de optimizar las técnicas para trasladarlas a diferentes especies vegetales. La transformación genética ha sido adoptada como un método para mejorar o introducir nuevas características, y para entender el funcionamiento de las plantas. La transformación de plantas depende de la introducción estable de los transgenes dentro del genoma vegetal (Griffiths *et al.*, 2012).

Con el objeto de hacer más fácil y eficiente la transferencia de ADN hacia células o tejidos vegetales, se han desarrollado diferentes métodos de transformación genética. Estos métodos según Levitus (2008) se dividen en:

- a) Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*: un vector biológico que participa de la transferencia.
- b) Métodos de transformación genética directos: por distintos mecanismos físicos se introduce el ADN en la célula.

Agrobacterium tumefaciens: Es un “ingeniero genético” por naturaleza, siendo el método más difundido para la transformación genética de plantas y la representación se puede observar en la figura 5 de lado izquierdo, *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria que vive en el suelo e infecta a un amplio rango de plantas. Esta bacteria tiene como blanco de infección a las



heridas en el tallo o raíces de la planta inmediatamente sobre el nivel del suelo, donde ataca a las células, causando su proliferación y formación de tumores. Esta enfermedad se conoce como “agalla de la corona” (Levitus *et al.*, 2008).

El desarrollo de los tumores se debe a que *Agrobacterium* tiene la capacidad de transferir parte de su propio material genético a la planta hospedante. La capacidad patogénica de esta bacteria se asocia a la presencia de plásmidos Ti (inductor de tumor) (Levitus *et al.*; 2008).

Se ha demostrado que un fragmento de estos plásmidos, llamado ADN-T (ADN de transferencia), es transferido a la célula vegetal donde se integra al ADN cromosómico de la planta. La transferencia de ADN es inducida por la expresión de unos genes llamados “vir” que se encuentran en el plásmido Ti por fuera de la secuencia que se transfiere. Dentro del ADN-T se encuentran genes bacterianos que intervienen en la síntesis de fitohormonas que causan la proliferación celular. También genes que participan de la síntesis de una serie de compuestos denominados opinas, los que son secretados y utilizados como nutrientes por *Agrobacterium*. De esta forma la bacteria redirige genéticamente el metabolismo de la planta para su propio beneficio (Levitus *et al.*, 2008).

Un método físico directo es la biobalística, representado en la figura 5 de lado derecho. Esta técnica consiste en el disparo de partículas de oro o tungsteno, de aproximadamente 1µm de tamaño y que tienen aglomerado el ADN foráneo, sobre células, tejidos u órganos vegetales. Los disparos se producen mediante presión de helio o mediante descarga eléctrica de alto voltaje. Los proyectiles alcanzan velocidades de varios cientos de metros por segundo que les permiten atravesar la pared celular y las membranas, lo que hace posible que el ADN que transportan, se manifieste en el genoma de las células vegetales (Siari, 2012).

A continuación, se esquematiza brevemente las etapas de transformación de una célula vegetal por el método de *Agrobacterium* y cañón de partículas.

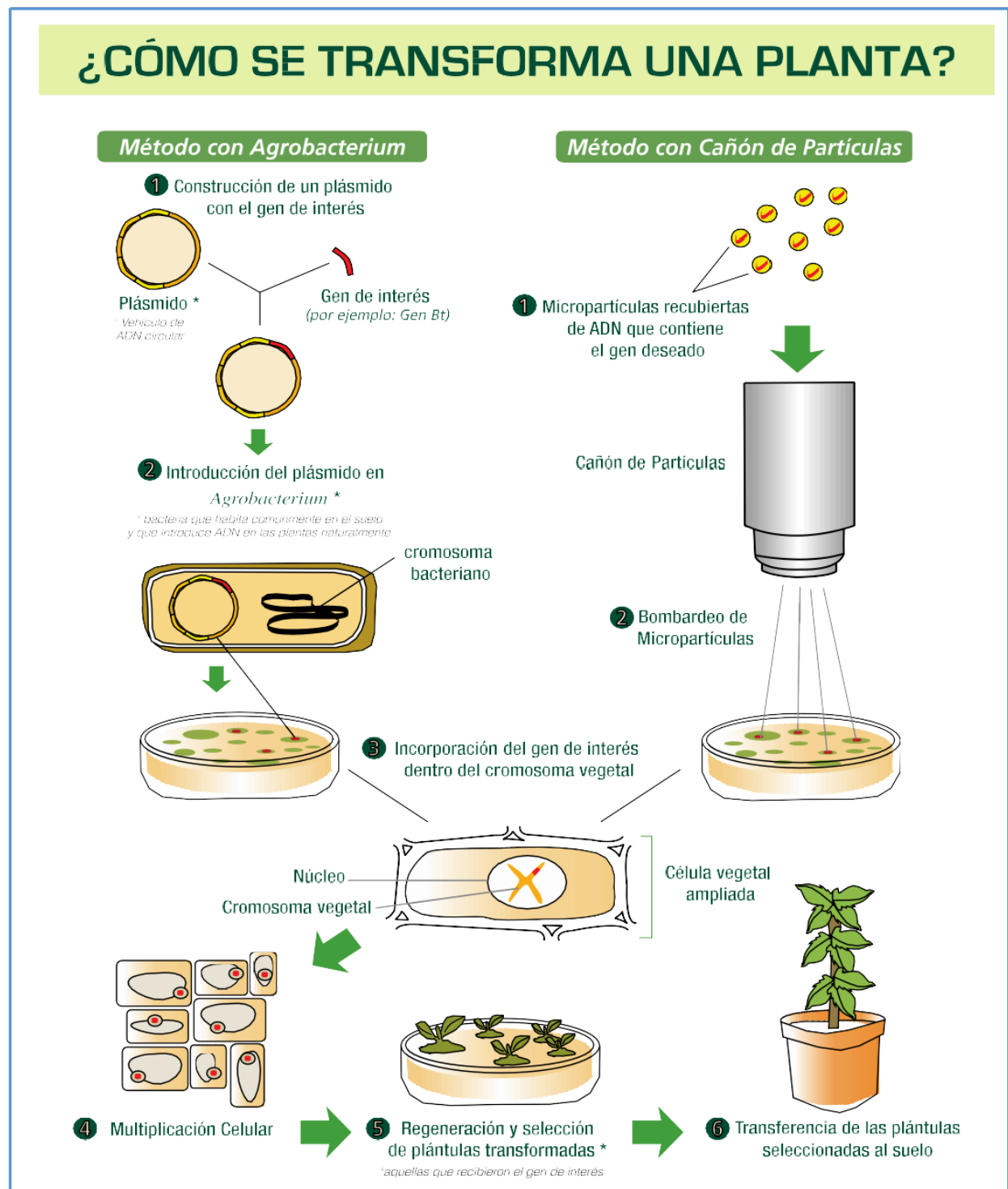


Figura 5. ¿Cómo se transforma una planta? Método de *Agrobacterium* y cañón de partículas (Chipeels y Savada, 2013).

1.2.5 Técnicas de detección de organismos genéticamente modificados (OGM).

La base de todas las técnicas descritas para la detección de OGM consiste en evidenciar las diferencias entre la variedad no modificada y la variedad modificada, en este caso, la introducción de nuevas características en las plantas transgénicas. Esto puede realizarse detectando el ADN transgénico insertado, detectando la nueva proteína expresada, o en el caso de que la proteína actúe como enzima, utilizando el análisis químico para detectar el producto de la acción enzimática (Cárdenas, 2011).

Existen dos métodos comúnmente utilizados para detectar modificaciones genéticas en plantas; uno de ellos es el conocido ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), con el que se estudia la presencia de proteínas específicas, explotando la especificidad de la unión entre el antígeno expresado y un anticuerpo diana; el otro mayormente utilizado es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), basada en la detección de secuencias de ADN insertadas en el genoma de la planta. Estos métodos indican si hay o no, presencia de OGM en la muestra y también pueden dar una estimación de su contenido (Giménez *et al.*, 2003).

El uso de la técnica de ELISA para la detección de OGM muchas veces se encuentra limitado por el bajo contenido de proteínas expresadas por el transgén, o por la degradación de las mismas durante el procesamiento del alimento. Sin embargo, los métodos basados en ADN resultan ser más específicos y sensibles (Giménez *et al.*, 2003).

La PCR permite la amplificación selectiva de segmentos específicos de ADN presentes con baja frecuencia, en una mezcla conteniendo otras secuencias de ADN. Mientras que los alimentos crudos pueden identificarse fácilmente como GM, la detección es más difícil cuando éstos se encuentran procesados; los alimentos procesados contienen ADN degradado y sustancias que interfieren incluso con la reacción de PCR. Aunque la PCR funciona con trozos

relativamente pequeños de ADN, cuanto más procesado esté el alimento, más difícil será la detección del transgén (Querici *et al.*, 2010).

Es posible diferenciar tres etapas en el proceso de detección de OGM en alimentos. La primera etapa consiste en la detección cualitativa o rastreo de OGM (*screening* de OGM), cuyo fin es evidenciar la presencia o ausencia de material GM en una muestra. Para ello, se buscan secuencias comunes entre distintos eventos transgénicos, de modo de abarcar la mayor cantidad de los OGM liberados.

La segunda etapa es la de identificación, cuyo objetivo es determinar específicamente cuál o cuáles son los eventos que están presentes, de modo de descifrar si se trata de eventos aprobados o no aprobados.

La tercera etapa consiste en la cuantificación, cuyo propósito es determinar el contenido porcentual de OGM en el alimento, para evaluar si requiere o no el etiquetado (Figura 6) (Markoulatos, 2004).

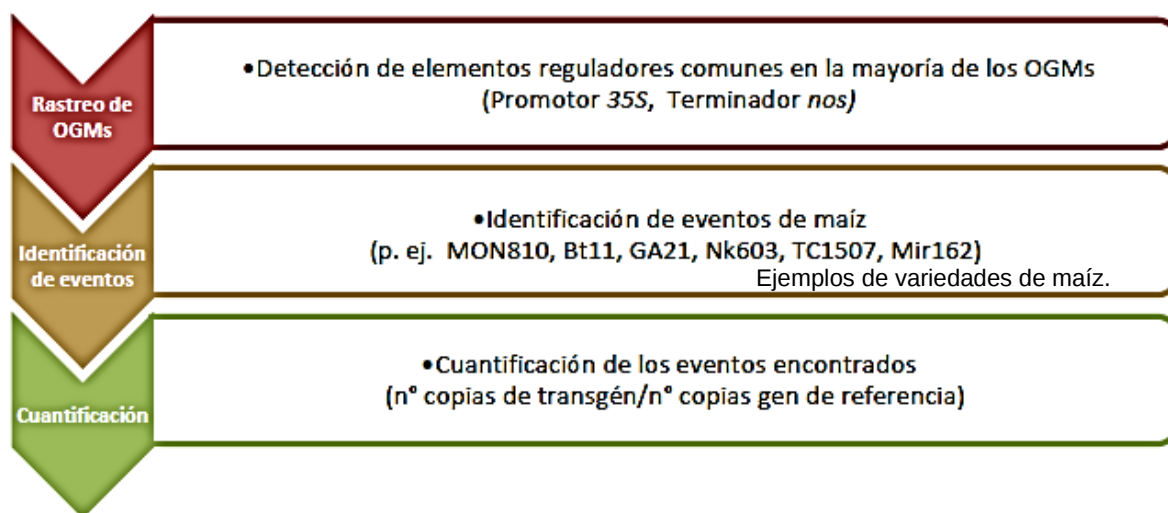


Figura 6. Proceso de detección de OGM en alimentos. (Markoulatos, 2004).

1.2.5.1 Métodos cualitativos de detección de OGM por PCR

Existen varios niveles de especificidad para el análisis de detección de transgenes por PCR, dependiendo del blanco al cual están dirigidos los cebadores (Figura 7). En grado creciente de especificidad se encuentran las siguientes estrategias de detección: rastreo de OGM (*screening*), detección específica de gen, detección específica de construcción y detección específica de evento. La diferencia entre ellas reside en la secuencia diana a la cual se unen los cebadores dentro de la construcción del transgén (o *cassette* de expresión). Estas pueden ser: el *promotor*, un *gen introducido*, el *terminador*, o la unión entre dos de estos elementos (Levitus *et al.*, 2008).

El elemento *promotor* sirve como una señal de comienzo para la expresión génica y, por consiguiente, para la producción de la proteína de interés. El *gen introducido* codifica para una proteína nueva que confiere a la planta cierta característica de interés (p. ej. el gen de la proteína *cry1AB* para la resistencia a insectos). Los genes introducidos pueden existir naturalmente o pueden ser totalmente sintéticos. La *secuencia terminadora* es la señal de finalización para la expresión de la proteína de interés (aproximadamente el 70% de las plantas transgénicas liberadas, tienen en su construcción al terminador del gen de la enzima *nopalina sintasa* de *Agrobacterium tumefaciens*) (Levitus, 2008). A su vez, otros elementos pueden estar presentes en una construcción transgénica. Por lo general, su propósito es controlar y estabilizar la función del gen para asegurar la presencia de la construcción en el OGM, o para facilitar la combinación de los diversos elementos en el constructo (Holst *et al.*, 2013).

Debe tenerse en cuenta que estos elementos pueden originarse a partir de organismos de tipo salvaje, pueden estar presentes en más de una copia y en más de un evento transgénico; incluso pueden ser combinados de una manera similar en más de un OGM. De este modo, la elección del método debe ajustarse a la finalidad del análisis (Anklam *et al.*, 2012).

En la figura 7 se presenta una representación esquemática de un evento transgénico, en donde se muestran las estrategias de detección en grado decreciente de especialidad y ubicación de cebadores.



Figura 7. Representación esquemática de un evento transgénico tipo. De arriba hacia abajo se muestran las estrategias de detección e identificación por PCR en grado creciente de especificidad. Las flechas horizontales indican la ubicación de los cebadores (Holst, 2013).

1.2.5.2 Estrategia de rastreo (*screening*) de OGM

En el primer nivel de especificidad, se encuentra el rastreo o *screening de OGM*, que es capaz de detectar a la mayoría de los eventos transgénicos autorizados actualmente. El mismo se basa en la detección de las secuencias de control, como promotores y terminadores, que flanquean al gen que se introducirá en la planta. Dentro de las secuencias reguladoras más utilizadas, se encuentra el promotor CaMV35S y el terminador T-Nos. Este tipo de aproximación no sirve para determinar específicamente los eventos transgénicos, sino que establece en primera instancia, si la muestra contiene o no rastros de material genéticamente modificado. Si bien tienen la ventaja de poder detectar la presencia de varios eventos en un solo ensayo, no existe un único rastreo que detecte a todos los OGM, debido a que existen eventos que poseen promotores y terminadores distintos a los mencionados (p. ej., Promotor FMV del virus del mosaico del higo y el terminador t-HSP17 de la proteína de *heat shock* del trigo). Son métodos



cualitativos, cuya sensibilidad suele estar en el entorno del 0,01% de material GM (Griffiths *et al.*, 2012).

1.2.5.3 Estrategia específica de gen.

En el segundo nivel de especificidad tenemos a la estrategia *específica de gen* o de característica (*trait-specific*). Estas toman como blanco a los genes activos del transgén, como el gen *cry1Ab* de los eventos de maíz MON810 y Bt11, o el *pat* del evento Bt11. Las mismas dan información sobre las características fenotípicas de un OGM, o la posible presencia de un grupo de eventos con cierta característica en una muestra. Sin embargo, no son aptas para identificar cuál es el evento específico presente, ya que el gen buscado puede haber sido utilizado en varios OGM diferentes (p. ej., el gen de resistencia a lepidópteros en los eventos de maíz MON810 y Bt11) (Griffiths *et al.*, 2012).

1.2.5.4 Estrategia específica de construcción

Este tipo de aproximación toma como blanco a secuencias de unión dentro de la construcción del transgén, por ejemplo, al borde entre el promotor y el gen, o entre el gen y el terminador. Mediante esta estrategia se acotan las posibilidades de encontrar numerosos eventos, pero sigue siendo menos específica que el método de identificación *evento específico* ya que existen varios OGM que comparten las mismas construcciones (Griffiths *et al.*, 2012).

1.2.5.5 Estrategia específica de evento

Por último, la estrategia evento específica permite identificar un único evento de transformación. Son las que logran mayor especificidad ya que tienen como blanco de detección a la secuencia comprendida en el sitio de unión entre el ADN transgénico y el genoma del huésped, que es único para cada evento de transformación (Griffiths *et al.*, 2012).

A pesar de la especificidad, estos métodos tienen algunas limitaciones. Existen cruzamientos entre líneas de plantas GM diseñadas para generar eventos apilados (*stacked*) en la descendencia, que se consideran como nuevos eventos transgénicos. Estos métodos son

incapaces de distinguir entre un evento apilado, por ejemplo, el evento MON810 x NK603, y la mezcla de los OGM parentales MON810 y NK603 (Holst, 2008).

1.2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los métodos analíticos basados en la detección de ADN suelen emplearse cuando el alimento ha sido procesado o tratado fisicoquímicamente (calor, presión, etc.), ya que las proteínas pueden haberse desnaturalizado o degradado en el proceso, y los métodos analíticos por análisis de proteínas se ven afectados por estos cambios. El ADN, en cambio, puede haberse fragmentado durante el procesado en trozos pequeños, pero esto no implica que no puedan ser detectados. A pesar de que el ADN también sufre degradación durante procesos por calor, por ejemplo, en el caso del procesado de enlatados, es aún posible obtener pequeños fragmentos con suficientes diferencias de secuencias como para hacer posible la diferencia entre especies cercanas. El ADN utilizado en la identificación de especies es generalmente ADN mitocondrial, aunque también se utilizan secuencias de ADN procedentes de genes. Ambos tipos de secuencias cumplen con las características necesarias al estar presentes en todas las especies y presentar una gran variabilidad entre las mismas, por tal razón pueden ser utilizados como indicativos de especie (López *et al.*, 2003).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (López *et al.*, 2003).

Generalmente los elementos fundamentales para promover la reacción en cadena de la polimerasa enlistan al templado o molde ADN, la enzima, los oligonucleótidos (cebadores o primers), los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina),

el ión magnesio (Mg^{+}), una solución amortiguadora o buffer y H_2O libre de nucleasas; todos estos componentes interactúan bajo condiciones específicas en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Usualmente los termocicladores son los equipos en donde se realiza la reacción, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada ciclo. Al final de la reacción, para corroborar si ha amplificado la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

1.2.6.1 Componentes de la PCR

El elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. Para entrar en contexto, es importante recordar que la molécula de ADN está formada por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina) que es complementaria con la base de otras cadenas, de tal forma, que el ADN se estructura en una doble hélice. La complementariedad entre las bases está dada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, generando estabilidad a la doble hélice, la carga eléctrica del ADN es negativa y está dada por los grupos fosfatos. En la PCR, el templado son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Por su parte, la polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. La enzima más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas. El rasgo que distingue a esta enzima bacteriana de otras polimerasas de otros organismos es su capacidad para mantener su funcionalidad a



temperaturas altas, por lo que se le considere una enzima termoestable, también hay otras enzimas que se utilizan como la Vent, obtenida de la bacteria *Thermococcus litoralis* (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Los primers son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño oscila entre 18-25 pares de bases y la concentración de G-C se recomienda que oscile entre 40-60 % de la secuencia. Sí se ignoran estas consideraciones, existe la posibilidad de la formación de dímeros de primers, es decir, de productos inespecíficos; esto repercutiría en el rendimiento de la reacción, así como en la especificidad del producto esperado. Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada «front» y otra «reverse»; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (como sucede endógenamente); con la finalidad de garantizar la formación de un complejo estable entre el templado y los primers. Hoy en día existen programas bioinformáticos para el diseño de primers con alta especificidad, por lo que se evita la formación de productos inesperados. Incluso, existen laboratorios de biología molecular que se dedican al diseño, síntesis y validación para garantizar su especificidad, facilitando el trabajo al usuario, ya que sólo deberá elegir la pareja de primer's de su interés (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Por su parte, los dNTP's son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, por ello es importante que su concentración sea la adecuada ya que de lo contrario pueden comprometer la función de la Taq polimerasa. Normalmente, se utilizan a una concentración que oscila entre 0.2 a 1.0 mM. El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8);

usualmente es común utilizar buffers de composición distinta que son de fácil acceso (López *et al.*, 2003).

Es fundamental la presencia de cationes divalentes, generalmente, el magnesio ($MgCl_2$) es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, ya que forman un complejo soluble con los dNTP's y estimulan la actividad enzimática, además aumentan la temperatura de fusión (T_f) con la interacción cebador / ADN molde (con lo que estabilizan la interacción entre las dos cadenas); por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa; regularmente su concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM. Finalmente, el agua a utilizar en la reacción se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

1.2.6.2 Etapas de la PCR

Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión mostradas en la figura 8.

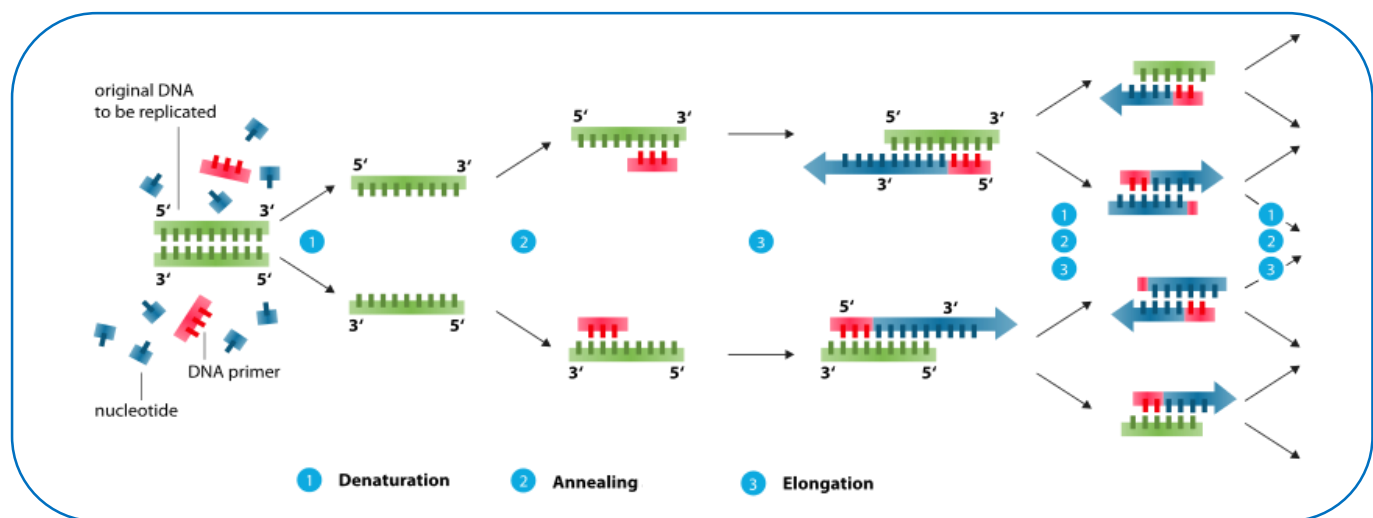


Figura 8. PCR, la reacción en cadena de la polimerasa, (Journal Of Visualized Experiments, 2014).



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

Hibridación. En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 55-62 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Extensión. En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado las ampliaciones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) (Tamay de Dios *et al.*, 2013).



1.2.6.3 Ventajas de la PCR

- ✓ Rapidez y sencillez de uso: La PCR permite clonar ADN en pocas horas, utilizando equipos relativamente poco sofisticados. Una reacción de PCR típica consiste en 30 ciclos de desnaturalización, síntesis y reasociación. Cada ciclo dura por lo general de 3 a 5 minutos y se utiliza un termociclador que lleva un microprocesador para programar los cambios de temperaturas y el número de ciclos deseado. Esto supera ampliamente el tiempo requerido para la clonación en células, que suele ser de semanas, o incluso meses (UNED, 2000).
- ✓ Sensibilidad: La PCR puede amplificar secuencias a partir de cantidades ínfimas de ADN diana, incluso a partir de ADN contenido en una sola célula. Esta elevada sensibilidad ha permitido el desarrollo de nuevos métodos para el estudio de la patogénesis molecular y la aparición de numerosas aplicaciones (ciencia forense, diagnóstico, estudios de paleontología molecular, etc) donde las muestras pueden contener muy pocas células. Sin embargo, el hecho de que el método tenga una sensibilidad tan elevada significa también que se deben extremar las precauciones para evitar la contaminación de la muestra con ADN extraño (UNED, 2000).
- ✓ Robustez: La PCR permite la amplificación de secuencias específicas de material que contiene ADN muy degradado, o incluido en un medio que hace problemática su purificación convencional. Esto hace que el método resulte muy adecuado para estudios de antropología y paleontología molecular, por ejemplo, para el análisis de ADN recuperado de individuos momificados y para intentar identificar ADN de muestras fósiles que contengan mínimas concentraciones de células. El método se ha empleado con éxito también para la amplificación de ADN de muestras de tejidos fijadas con formol, lo cual ha tenido importantes aplicaciones en patología molecular (UNED, 2000).



1.2.6.4 Desventajas de la PCR

- ✓ Necesidad de disponer de información sobre la secuencia del ADN diana: Para poder construir oligonucleótidos específicos que actúen como cebadores para la amplificación selectiva de una secuencia particular de ADN se necesita disponer de alguna información previa sobre la propia secuencia a amplificar. Esto implica, por regla general, que la región de interés ya haya sido parcialmente caracterizada, a menudo mediante la aplicación de métodos de clonación basados en sistemas celulares. Sin embargo, y para casos concretos, se han desarrollado varias técnicas que reducen o incluso hacen desaparecer esta necesidad de disponer de información previa sobre la secuencia del ADN diana (UNED, 2000).
- ✓ Tamaño corto de los productos de la PCR: Una desventaja clara de la PCR como método de clonación de ADN ha sido el tamaño de las secuencias de ADN que permite clonar. A diferencia de la clonación de ADN en células, donde pueden clonarse secuencias de hasta 2 Mb, la información de que se dispone sobre la mayor parte de secuencias clonadas por PCR sitúa el tamaño de los fragmentos clonados entre 1 y 5 Kb, tendiendo hacia el extremo inferior. Los fragmentos pequeños se amplifican muy fácilmente, pero conforme aumenta su tamaño se hace más difícil obtener una amplificación eficiente. En la actualidad sin embargo ya es posible amplificar secuencias por PCR de tamaños entre 20 y 40 Kb (UNED, 2000).
- ✓ Peligro de contaminación: La facilidad con que se amplifica el ADN exige evitar el peligro de contaminación inherente al poder multiplicador de la reacción. En un tubo en el que se ha realizado una reacción de PCR hay tal cantidad de ADN, que al salir caliente del termociclador y abrir este, el vapor alcanza el ambiente del laboratorio, por lo que fuentes externas de corrientes de aire podrían perjudicar la reacción, así como su valoración posterior (UNED, 2000).



1.2.6.5 Aplicaciones de la PCR

Durante los últimos años, la PCR se ha convertido en una herramienta importante para analizar el genoma humano. Además de generar cantidades grandes de templado para secuenciar, la PCR se ha utilizado para el mapeo de cromosomas y para analizar cambios grandes y pequeños en estructura cromosómica. Por ejemplo, la PCR ha hecho posible:

- ✓ Usar las secuencias repetidas en el genoma como marcadores genéticos.
- ✓ Generar sondas de hibridación específicas para cromosoma.
- ✓ Estudiar la evolución de las secuencias de un gen y los efectos de variabilidad de la secuencia en la función del cromosoma.
- ✓ Amplificar e identificar las secuencias blanco *in situ*.
- ✓ Simplificar muchos de los experimentos de ingeniería genética.
- ✓ Permitir ampliar estudios de expresión genética.
- ✓ Secuenciación directa de secuencias amplificadas.
- ✓ Detección de mutaciones.
- ✓ Seguimiento de la efectividad de tratamiento de enfermedades.
- ✓ Diagnósticos de enfermedades genéticas e infecciosas.
- ✓ En ciencia forense: identificación de restos biológicos, determinación de paternidad, pruebas periciales en criminalística.
- ✓ En arqueología y paleontología.

(AMGEM, 2016)

1.2.7 Ventajas y desventajas de los OGM

Una vez que los primeros alimentos modificados genéticamente empezaron a ser comercializados, se generó una polémica de grandes proporciones entre ecólogos y biólogos por un lado y biotecnólogos por el otro.

Los ecólogos y biólogos señalan que la introducción de genes de especies no relacionadas no es lo mismo que el mejoramiento tradicional, pues se saltan barreras naturales y se crean combinaciones que no existen en la naturaleza, dando lugar a individuos “artificiales”, que violan las leyes naturales que impiden el cruzamiento entre organismos biológicamente diferentes. Así mismo indican que el cultivo de plantas transformadas y los derivados de los OGM entrañan serios riesgos para el medio ambiente y la salud humana (Sánchez, 2003).

Por su parte los biotecnólogos señalan que la Ingeniería Genética es una técnica precisa, pues se introduce ADN bien caracterizado, mientras que en el mejoramiento tradicional se transfiere el carácter buscado junto con mucho material genético sin caracterizar, del que se desconocen sus impactos, por otro lado añaden que la mayoría de los alimentos que consumimos hoy han sido radicalmente modificados a través de los años por selección deliberada o por mutaciones accidentales y que los avances logrados en las últimas décadas colocan a la humanidad en el umbral de una revolución alimentaria sin precedentes, que permitirá resolver los problemas del hambre y el agotamiento de la superficie disponible para agricultura (Sánchez, 2003).

La disputa está gobernada por intereses económicos y políticos. La investigación biotecnológica está concentrada en unos pocos países industrializados y la mayor parte de la misma está financiada por compañías transnacionales que pretenden monopolizar el mercado de los productos transgénicos a través de patentes y de contratos de compra anual de semilla, no permitiendo a los agricultores la siembra de la semilla producida por ellos mismos. Así mismo, estas compañías están tratando de evitar que los gobiernos impongan restricciones al



empleo y consumo de los OGM y de sus productos, restricciones derivadas de preocupaciones sanitarias y ambientales (Levitus *et al.*, 2008).

Un aspecto curioso de este debate es que los críticos más radicales, que vociferan en contra de los alimentos genéticamente modificados, no los perturba el hecho de que muchos productos farmacéuticos de uso muy difundido (tales como la insulina, la hormona de crecimiento y otros más) también son producto de los OGM (Feldman *et al.*, 2000).

1.2.7.1 Beneficios de los OGM

Los datos preliminares relacionados con el uso de los cultivos transgénicos de “primera generación” señalan que las características adquiridas les permiten incrementar la productividad a nivel de campo, bien sea reduciendo los insumos requeridos o aumentando los rendimientos (Rodríguez y Gonzales, 2007).

El caso más conocido y polémico es el transgen *Bt*. Se ha estimado que el rendimiento del maíz con el gen *Bt* fue mayor que el del maíz “normal” hasta en un 8% y la disminución en la aplicación de insecticidas en papa se redujo hasta en un 40%. Esta reducción en el uso de insecticidas originó, como era de esperarse, mayores utilidades para los agricultores. Otro beneficio implícito fue la reducción de las sustancias tóxicas aplicadas al medio ambiente (Rodríguez y Gonzales, 2007).

Otro ejemplo muy bien conocido es el que otorga resistencia a los herbicidas como glifosato, han tenido muy buena aceptación entre los agricultores debido a que, por lo general, una sola aplicación el herbicida es suficiente para lograr un control eficiente de las malezas de hoja ancha, reduciendo considerablemente el número de aplicaciones que se hacen rutinariamente (Rodríguez y Gonzales, 2007).

A pesar de que los defensores de los cultivos resistentes a herbicidas aseguran que éstos abaratan los costos al posibilitar el uso de herbicidas de amplio espectro (bromoxynil,

sulfonilurea, imidazolinones, glifosato, entre otros), que por su potencia requieren de menos aspersiones para ejercer un control adecuado de las malezas y que, además, se descomponen relativamente rápido en el suelo, existe evidencia de que el empleo de estos herbicidas genera tolerancia de las malezas. Esto crea un círculo vicioso en el que se necesitarían crear nuevas variedades resistentes a productos cada vez más potentes, para obtener un control de malezas adecuado (Shand, 2011).

Los cultivos transgénicos de “segunda generación” se concentran en proveer mejores cualidades nutricionales y/o industriales. Las variedades con mayor valor nutricional son especialmente valiosas para los países en vías de desarrollo, debido a la carencia alimentaria que sufren millones de personas, pero también son atractivas para los países desarrollados, pues reducen el consumo de grasas, proteínas y almidones poco saludables. Los animales también serán beneficiados por el aumento del valor nutricional de forrajes y granos, contribuyendo también a aumentar la tasa de conversión de alimentos y, por ende, a una disminución de la cantidad de alimento que el animal necesita y los desechos que produciría (Rodríguez y Gonzales, 2007).

Otros posibles beneficios del empleo de la ingeniería genética son la obtención de alimentos con más vitaminas, minerales y proteínas y con menores contenidos de grasas; producción de ácidos grasos específicos para uso alimenticio o industrial; cultivos más resistentes al ataque de patógenos o insectos disminuyendo la necesidad de emplear productos químicos, lo que supone un ahorro económico y menor daño al medio ambiente; mayor tiempo de conservación de frutos y verduras, aumento de la producción; disminución de los costos de producción; preservación de la biodiversidad natural y desarrollo de cultivos tolerantes a la sequía y el estrés (Altieri, 1999).

1.2.7.2 Riesgos asociados con los OGM

En la actualidad hay un consenso virtual de que los alimentos derivados de la Biotecnología no plantean nuevos riesgos por el simple hecho de haber sido obtenidos por estas técnicas, pero la palabra transgénico provoca ciertas reacciones negativas en la sociedad ante el riesgo de lo desconocido (Feldman *et al.*, 2000).

Los opositores resaltan la amenaza del aumento de enfermedades ocasionadas por un incremento en la resistencia a los antibióticos de amplio espectro que se han utilizado como “genes marcadores”, es decir, genes que permiten conocer cuáles células han sido transformadas en las primeras fases de los experimentos, a pesar de que estos genes no se expresan. Así, por ejemplo, el maíz modificado tiene el gen de la beta-lactamasa que confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Se temía que si estos genes estaban en altas concentraciones, se acumularían en el organismo causando resistencia a los antibióticos (Feldman *et al.*, 2000).

Se ha señalado también el riesgo de que las personas sufran reacciones alérgicas al ingerir alimentos genéticamente modificados que contengan proteínas alérgicas de fuentes externas. Así, por ejemplo, personas alérgicas a la nuez del Brasil pueden sufrir una reacción alérgica después de consumir soya transgénica a la que se le ha insertado un gen de la nuez del Brasil o personas alérgicas al pescado pueden desarrollar alergias al consumir fresas resistentes a las heladas por llevar incorporado un gen de un pez que viven en aguas árticas a bajas temperaturas (Sánchez, 2003).

Para que una proteína sea un alérgeno, la persona debe estar expuesta a ella en múltiples ocasiones y por períodos relativamente largos; la proteína debe estar presente en altos porcentajes en relación con la proteína total y debe ser digerida muy lentamente (Sánchez, 2003).



Se ha señalado que alimentos conocidos y que son transformados pueden convertirse en tóxicos debido a la adición de un nuevo gen y porque el gen extraño puede insertarse en medio de un gen que evita la producción de toxinas. Las posibilidades de que un alimento transgénico sea alérgeno son insignificantes debido a las rigurosas pruebas de inocuidad a las que son sometidos los alimentos nuevos (Altieri, 1999).

También se ha señalado la posibilidad de desarrollo de resistencia a antibióticos en animales que consumen grandes cantidades de soya y maíz transformados, ocasionando que los antibióticos se tornen ineficaces, incrementando el costo de mantener la salud de los animales. Así mismo, se menciona la posibilidad de que esta posible resistencia adquirida en los animales hacia los antibióticos pueda pasar a los consumidores de productos de origen animal (Torres 2012).

Como menciona Sánchez (2003) los OGM no han estado en el mercado el tiempo suficiente para evaluar estas posibilidades, por lo que es prematuro concluir que la cuestión ha sido resuelta. Así mismo, como no se han presentado problemas al respecto y ya no se utilizan genes marcadores que confieren resistencia a antibióticos, no es probable que se presente en el futuro.

Otro aspecto de los OGM que ha suscitado mucha polémica son las repercusiones ambientales. Un riesgo, que se presenta también con las plantas mejoradas por los métodos tradicionales, es el desarrollo de resistencia por parte de las plagas a las toxinas introducidas en el cultivo (Sánchez, 2003).

Feldman (2000) señala el riesgo que la resistencia de los herbicidas pueda pasar de los cultivos transgénicos a especies silvestres o cultivadas y producir “supermalezas”, obligando a los agricultores a utilizar herbicidas más fuertes y quizás más nocivos para el ambiente. Esta preocupación está justificada en las zonas de origen de los cultivos, dado que las plantas

transgénicas pueden cruzarse con especies silvestres y transmitir los caracteres de resistencia a herbicidas o de tolerancia a condiciones ambientales adversas.

La pérdida de biodiversidad es otro riesgo que se ha señalado ante el uso de las variedades transgénicas, pero este riesgo no es mayor que el de las variedades mejoradas tradicionalmente. Así mismo, se teme el efecto que los genes de origen viral puedan tener en las plantas transformadas mediante la incorporación del gen de la proteína del virus cápside (Feldman 2000).

En general, ha habido una aceptación tácita de los OGM en los Estados Unidos, mientras que en Europa no ha resultado igual. Esta diferencia de opiniones se debe a que los estadounidenses confían en el gobierno para protegerlos de productos alimentarios nocivos, mientras que los sistemas de supervisión europeos son vistos con desconfianza, especialmente porque han tenido grandes fallas en detectar la importancia de algunos problemas graves para posteriormente restarle importancia, como sucedió con el brote de la enfermedad de las “vacas locas” en Inglaterra y los pollos contaminados con dioxina en Bélgica (Villalobos, 2008).

1.2.7.3 Posibles beneficios de los OGM para los países en desarrollo

Millones de personas de los países en desarrollo, que carecen de alimentos para subsistir o de dinero suficiente para adquirirlos, se podrán beneficiar grandemente de toda tecnología que pueda incrementar la producción agrícola, reducir los costos mediante una reducción del uso de plaguicidas, mejorar la calidad de los alimentos mediante una mayor concentración de aceites o almidones, y permitir la utilización de grandes superficies desaprovechadas, como los suelos ácidos o salinizados por el exceso de riego o fertilizantes y otras características que hagan que las condiciones ambientales sean hostiles para el desarrollo de los cultivos. Así mismo se beneficiarían al obtener alimentos con mayor valor nutricional para aliviar la desnutrición (Giménez *et al.*, 2003).

Se podría deducir que hay claros indicios de que la próxima generación de cultivos transgénicos se orientara en forma prioritaria a liberar organismos que beneficien al consumidor, a través de productos de mayor calidad nutricional, conocidos como cultivos biofortificados. Asociado a la mejora nutrimental de los productos, la ingeniería genética permitirá el aumento de los rendimientos para contribuir a la seguridad alimentaria por medio del mejoramiento genético para la tolerancia a estrés abiótico como sequía, salinidad, metales pesados, acidez del suelo y resistencia a altas y bajas temperaturas (Villalobos, 2008).

La historia de la agricultura nos enseña que las enfermedades de las plantas, las plagas de insectos y las malezas se volvieron más severas con el desarrollo del monocultivo, y que los cultivos manejados intensivamente y manipulados genéticamente pronto pierden su diversidad genética. Dado estos hechos, no hay razón para creer que la resistencia a los cultivos transgénicos no evolucionará entre los insectos, malezas y patógenos como ha sucedido con los plaguicidas. No importa qué estrategias de manejo de resistencia se usen, las plagas se adaptarán y superarán las barreras agronómicas. Las enfermedades y las plagas siempre han sido amplificadas por los cambios hacia la agricultura homogénea (Altieri, 1999).

1.3 Situación del mango GM en México y el mundo

Los cultivos y alimentos transgénicos, uno de los grupos más importantes de organismos genéticamente modificados (OGM) son un producto reciente en el mercado mundial: a partir de 1996 se comenzaron a sembrar libremente en Estados Unidos. En la actualidad, la práctica totalidad de la superficie sembrada con transgénicos en el mundo está ocupada por cuatro cultivos, en su mayor parte destinados a la producción de piensos compuestos para la ganadería intensiva y otros usos industriales: soja (60% del total de cultivos MG), maíz (23%) algodón (11%) y colza (6%), que se siembran a nivel comercial en varios países: Estados Unidos, Argentina, Brasil, Canadá, India, China, Paraguay y Sudáfrica. Las transformaciones genéticas presentes en estas variedades comerciales son básicamente dos: aquellos que tienen

incorporada la resistencia a un herbicida, que ocupan el 73% de la superficie cultivada, seguidos de las variedades insecticidas Bt (18%) y de las variedades con ambas características (8%) (Trigo, 2009).

En el siguiente recuadro se muestran los principales países con hectáreas cultivadas de semillas transgénicas a nivel mundial hasta 2009.

Tabla 7. Países que siembran cultivos transgénicos a nivel comercial.

País	Millones de hectáreas	Cultivo
EUA	54.6	Soya, maíz, algodón, canola, calabaza, papaya, alfalfa
Argentina	18.0	Soya, maíz, algodón
Brasil	11.5	Soya, algodón
Canadá	6.1	Canola, maíz, soya
India	3.8	Algodón
China	3.5	Algodón
Paraguay	2.0	Soya
Sudáfrica	1.4	Maíz, soya, algodón

Fuente: Trigo, 2009

El primer alimento transgénico que salió a la venta en EE UU, por ejemplo, fue el tomate Flavr Savr, un “tomate larga vida”, con un proceso de maduración retardada que facilita su almacenamiento y su transporte a grandes distancias. Todo un invento para una producción de alimentos globalizada -que sin embargo fracasó por resultar demasiado delicado para soportar unas labores mecanizadas de cosecha y envasado. Gran parte de la investigación biotecnológica reciente se orienta asimismo al desarrollo de mejoras cualitativas (menos calorías, menos colesterol, etc.) (Trigo, 2009).

Los datos más difundidos sobre superficie de cultivos transgénicos son los aportados por los informes anuales del Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas, (ISAAA), un organismo privado creado por instituciones y empresas

cuyo objetivo es extender el uso de la biotecnología en países de desarrollo. Según el informe del ISAAA correspondiente a 2004, el cultivo mundial ha aumentado un 20% con respecto a 2003, alcanzando una superficie de 81 millones de hectáreas repartidas en un total de 17 países, y equivale al 25% de la superficie global de estos cultivos (Ecologitas en acción.org, 2010).

En la figura 9 se muestra un panorama mundial de los principales países productores y hectáreas sembradas de cultivos transgénicos hasta 2015.

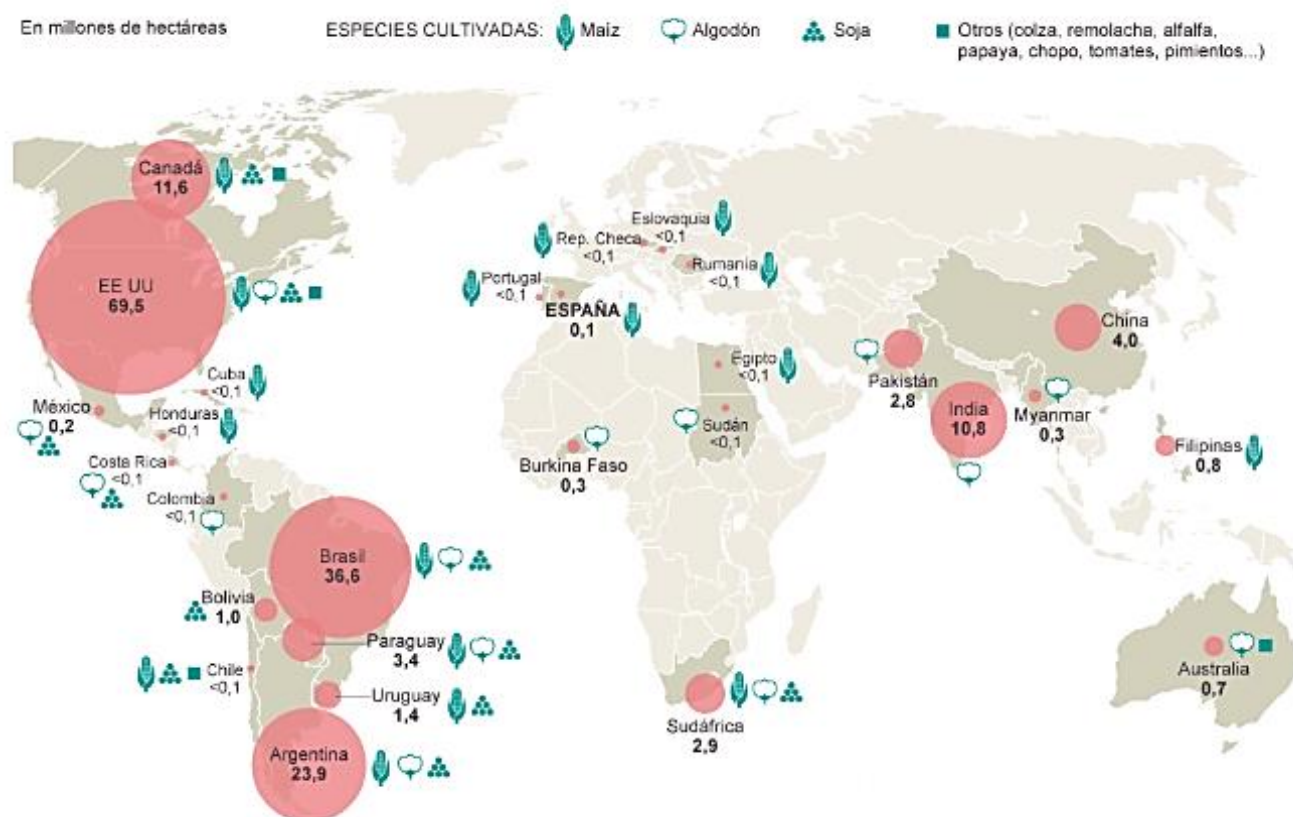


Figura 9. Mapa de los cultivos modificados genéticamente en el mundo, (Conocer la agricultura y la ganadería.com, 2015).



El mayor productor de cultivos MG en el mundo sigue siendo Estados Unidos, cuya superficie de transgénicos supone el 69% del total mundial. Le sigue Argentina, con un 20% de la superficie mundial de cultivos transgénicos.

En México hasta el 2006 se han emitido autorizaciones a 31 transgénicos de maíz, soya, papa, canola, jitomate, algodón y alfalfa. En teoría, ningún transgénico distinto a éstos puede ser vendido o usado legalmente para consumo humano en nuestro país, si bien la realidad es que ninguna autoridad mexicana se ocupa de verificar qué tipo de transgénicos importados están entrando a nuestro país (Trigo, 2009).

El maíz y la soya se están usando ya como ingredientes para los alimentos industriales como los chocolates, conservas, pan, margarinas, aceites vegetales, leches, helados, alimentos infantiles, mayonesas, harinas, etc. La soya transgénica está presente en más del 60% de los productos elaborados con soya como grasas vegetales, aceites, harinas, lecitinas, etcétera. En el caso del maíz transgénico se encuentra en más del 50% de los productos elaborados con maíz en forma de harinas, aceites, almidón o el alta fructuosa que tanto importa México de los Estados Unidos para sustituir al azúcar en muchos productos industriales. No es coincidencia que los más de 60 ingenios azucareros del país (dos de ellos en Chiapas) se encuentren en crisis y que los Estados Unidos se niegue a introducir a su país el excedente del azúcar mexicano violando así el Tratado de Libre Comercio con América del Norte (TLCAN) (Castro y Zinn 2001).

En México se ha permitido la liberación al ambiente a nivel experimental de varios cultivos transgénicos desde 1988 a la fecha. Entre estos se encuentran: soya, algodón, calabaza, alfalfa, papaya, plátano, tomate y papa entre otros. A su vez la Secretaría de Salud ha evaluado varios productos provenientes de organismos transgénicos respecto a su toxicidad, niveles de nutrición e inocuidad y ha aprobado a varios de estos, los cuales incluyen semillas o granos por



ejemplo de maíz. Así mismo está aprobada la utilización de Organismos Genéticamente Modificados como materia prima para elaborar alimentos procesados que se han dado desde 1995 hasta la fecha. La autorización que emite la COFEPRIS, conforme al artículo 97 de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados incluye tanto a los organismos transgénicos (como por ejemplo granos) como a los productos que los contengan y los productos derivados de los mismos (CONACYT, 2014).

1.3.1 Normatividad y etiquetado

La creación de Organismos Genéticamente Modificados por la biotecnología moderna ha motivado un gran debate a nivel mundial. Si bien los mismos fueron elaborados con el fin de mejorar la calidad e incrementar la cantidad de los alimentos, se ha generado una gran preocupación respecto de los posibles efectos o riesgos que podrían representar para la salud humana y el medio ambiente. Esta discusión ha sido iniciada a nivel internacional especialmente desde la vigencia del Convenio de Diversidad Biológica y del Protocolo de Cartagena, que han fomentado el desarrollo de estudios cada vez más importantes respecto a los posibles impactos y efectos de estos organismos. La preocupación deriva fundamentalmente de la falta de certeza en torno a los efectos que puede generar el uso masivo de esta tecnología (García, 2010).

Es por este impacto potencial que se hace necesario adoptar una actitud cautelosa y determinada para incluir al ambiente nuevos cultivos transgénicos, y es por ello, que se han establecido distintos instrumentos a nivel internacional para controlar su liberación (García 2010).



Debido al gran auge de los OGM y de la gran controversia que existe en relación con ellos, resulta de suma importancia el conocimiento en materia de bioseguridad tanto a nivel internacional como nacional. La bioseguridad implica las políticas y procedimientos adoptados para garantizar la segura aplicación de la biotecnología en salud y ambiente relacionados a los OGM. Esto a través de la evaluación de posibles riesgos asociados a ellos (Rodríguez y Gonzales, 2007).

1.3.2 Bioseguridad internacional

A nivel internacional se tiene establecido el Protocolo de Cartagena cuyo objetivo es garantizar que la transferencia, manipulación y uso de OGM entre naciones se haga de manera segura, es decir, observando los posibles efectos en el ambiente y en la salud humana. Así estableció el “Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología” (BCH por sus siglas en inglés), que se encargan de orientar a la población en general, así como de las evaluaciones y decisiones relacionadas con los OGM. De esta manera garantiza que se tenga la información necesaria para la evaluación del OGM (CONABIO, 2007).

Aunado al protocolo de Cartagena, existen organizaciones involucradas con varios aspectos relacionados con los OGM. Por mencionar, la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (IPPC) que evalúa los riesgos de las plagas vegetales, la Organización Norteamericana de Protección de Plantas (NAPPO) que desarrolla normas sobre los requisitos para autorizar plantas GM en países miembros, la Comisión del Codex Alimentarius para la seguridad alimentaria y la salud del consumidor, entre otras (CONABIO, 2007).



1.3.3 Bioseguridad nacional

El convenio adoptado a nivel internacional por México está asentado en el Decreto Promulgatorio del Protocolo de Cartagena, el cual se creó en el 2003. En este decreto se declara la aceptación de dicho protocolo con la firma del presidente de la república en ese entonces (Vicente Fox) e incluye la aceptación por parte del Senado. Su objetivo es implementar y acordar los puntos determinados en el Protocolo, CONABIO (2007). Durante los años 2002 a 2005 se llevó a cabo el proyecto “México: Fortalecimiento de la capacidad nacional para la implementación del Protocolo de Cartagena sobre la Bioseguridad”. Este proyecto fue diseñado por el CIBIOGEM y apoyado por el Fondo para el Medio Ambiente Mundial (GEF) y el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD). El objetivo del proyecto se enfocó en el fortalecimiento de la capacidad nacional en bioseguridad (CONABIO, 2007). CIBIOGEM (Comisión Intersecretarial de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados) es el organismo responsable de la bioseguridad en México desde 1999. La comisión fue formalmente establecida en el 2000 (SENASICA, 2016).

1.3.4 Leyes y normatividad nacional

Como elemento central para la bioseguridad esta la aplicación de medidas en materia de protección al ambiente y a la salud, en esta última ya sea humana, animal y vegetal.

Las normas relativas a la salud humana están contempladas en la Ley General de Salud.

Con respecto a la salud animal y vegetal se tiene la Ley Federal de Sanidad Vegetal, la Ley sobre Producción, Certificación y Comercio de Semillas, la Ley de Desarrollo Rural Sustentable, la NOM-056-FITO-1995.

Para la protección al ambiente se tiene la Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable, la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente.



Finalmente, con el objeto de englobar en una ley el aspecto de bioseguridad, en 2005 se aprobó la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, la cual es específica para el tema de bioseguridad en relación con los OGM, contemplando todos los aspectos citados (salud humana, vegetal, animal y protección al ambiente) (Acevedo, 2009).

La primera norma para regular los OGM's fue la Norma Oficial Mexicana NOM-056-FITO-1995 por la que se establecieron los requisitos fitosanitarios para la movilización nacional, importación y establecimiento de pruebas de campo de organismos manipulados mediante la aplicación de ingeniería genética (SENASICA, 2016).

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

1.3.5 Etiquetado de OGM

La información que debe ser suministrada al consumidor se encuentra regida por ley en la mayoría de los países, de manera que los ingredientes de los alimentos deben coincidir exactamente con lo descrito en las etiquetas. Cualquier etiquetado tiene como objetivo ofrecer información sobre el producto, que de otro modo no sería posible identificar a simple vista. El motivo principal del etiquetado reside en poder “informar a los consumidores y permitirles ejercer su elección”, (CONABIO, 2007). En más de 60 países se ha introducido una legislación específica para el control de la producción de los OGM y de los alimentos que los contienen. No obstante, las disposiciones respecto al etiquetado de los mismos difieren considerablemente. En algunos países el etiquetado de OGM es de carácter obligatorio,



mientras que en otros es simplemente voluntario, o no constituye un requisito exigible (García *et al.*, 2010).

1.3.6 Etiquetado en la Unión Europea

En la Unión Europea, todos los países han desarrollado reglamentaciones para controlar la seguridad alimentaria. En particular, los alimentos derivados de OGM se encuentran regulados por el Reglamento (CE) N° 1829/2003 sobre “Alimentos y piensos modificados genéticamente” y por el Reglamento (CE) N° 1830/2003 relativo a la “Trazabilidad y el etiquetado de los Organismos Genéticamente Modificados” (Shand, 2011).

En ellos se establece que los alimentos genéticamente modificados deben etiquetarse si difieren de sus respectivos no-GM, en características tales como la composición, valor nutritivo o uso propuesto. Un nuevo alimento o ingrediente GM ya no se considera como equivalente a otro existente no-GM, si la proteína o el ADN transgénico puede ser detectado. Los mismos disponen que todos los productos que contengan OGM, consistan en OGM o estén producidos a partir de OGM, deben ir etiquetados como tales. No obstante, no se exige el etiquetado a los alimentos que incluyan OGM en una proporción no superior al 0,9% (de los ingredientes individualmente considerados) (Shand, 2011).

Actualmente en la Unión Europea, los productos GM se examinan más rigurosamente que aquellos procedentes de otros métodos de generación de nuevas variedades. Esto no se debe necesariamente a que presentan riesgos mayores, sino que se trata de un plan de precaución hasta que se haya ganado mayor experiencia en el uso de la tecnología (Robinson, 2011).

1.3.7 Etiquetado en Estados Unidos

En los EEUU las reglamentaciones no requieren actualmente el etiquetado obligatorio ni la separación de cultivos y productos modificados genéticamente. La organización responsable de la reglamentación de la seguridad alimentaria, incluida la seguridad alimentaria de las

nuevas variedades de plantas, aditivos alimentarios y agentes de procesado, es la *Food and Drug Administration* (FDA). Ésta tiene en cuenta el etiquetado de los alimentos derivados de nuevas variedades de plantas, pero no tiene requisitos de etiquetado especiales para los alimentos GM. Se considera que estos últimos no son diferentes de otros alimentos (son “sustancialmente equivalentes”) y, por lo tanto, no presentan algún motivo de preocupación distinto o mayor, que los alimentos desarrollados mediante la mejora vegetal tradicional. Los requisitos de etiquetado que se aplican a los alimentos en general, se aplican también a los alimentos GM. Bajo esta legislación, la introducción de un transgén en un cultivo no daría lugar a la necesidad de evaluar el alimento, a no ser que el gen introducido en la variedad codifique para un producto que nunca antes había sido componente de otro alimento. Si el alimento fuera modificado de esa manera, constituiría un alimento nuevo y requeriría permiso reglamentario (Robinson, 2011).

1.3.8 Etiquetado en México

Según la SAGARPA (2014), actualmente México ha establecido la NORMA Oficial Mexicana NOM-001-SAG/BIO-2014, que establece las especificaciones generales de etiquetado de organismos genéticamente modificados que sean semillas o material vegetativo destinados a siembra, cultivo y producción agrícola. La cual pretende establecer las especificaciones generales que debe cumplir el etiquetado de organismos genéticamente modificados que sean semillas o material vegetativo destinados a siembra, cultivo y producción agrícola; en apego a los principios, objetivos y preceptos mandados por la Ley.

Sin embargo, todavía no existe alguna regulación oficial que demande a las industrias el etiquetado correspondiente de alimentos elaborados o generados a partir de OGM destinados específicamente a consumo animal o humano.

CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 Justificación

El mango al ser un fruto fresco tropical con un sabor que se extiende en una amplia gama desde agrio a dulce, pasando por diversos grados de acidez; es habitualmente adquirido por consumidores de todas las edades, por lo que su mercado como fruto y derivados procesados es considerablemente amplio; destacando salsas agridulces, bebidas, purés, yogurts, postres, dulces, entre una gran variedad; por tal motivo los reportes de la INEGI (2007) registran que los países de Asia (un 31 % consumo), América del Norte (un 29 % consumo) y Europa (un 27 % de consumo) importan 1,5 millones de toneladas anuales. La tendencia de importaciones crece de forma global, por lo que se espera que para 2030 México duplique su producción y así mismo las toneladas exportadas (SAGARPA, 2017).

Cuando se trata de reglamentos relativos a problemas fitosanitarios cuyo objetivo es proteger a las zonas de importación de la introducción de organismos dañinos tales como: insectos, bacterias, virus o plagas, la presencia de estos conlleva a la devolución o destrucción de las mercancías o la aplicación obligatoria de tratamientos específicos, teniendo reglas reguladas por variadas instancias gubernamentales o empresas privadas en cada país, ejemplos de estas la USDA (departamento de agricultura de los estados unidos) en los Estados Unidos, la Comisión Europea y la SCFI (secretaría de comercio y fomento industrial) en México.

Sin embargo, según la Dra. Norma Angélica Ruiz Torres en su compilación del primer foro de tecnologías de semillas de 2012 denota que, “el uso de organismos genéticamente modificados está rodeado de disyuntivas, que pueden dar lugar a un sinnúmero de efectos imprevistos, por lo que se recomienda hacer esfuerzos concertados y organizados para investigar los posibles efectos (tanto positivos como negativos) de estas tecnologías”.

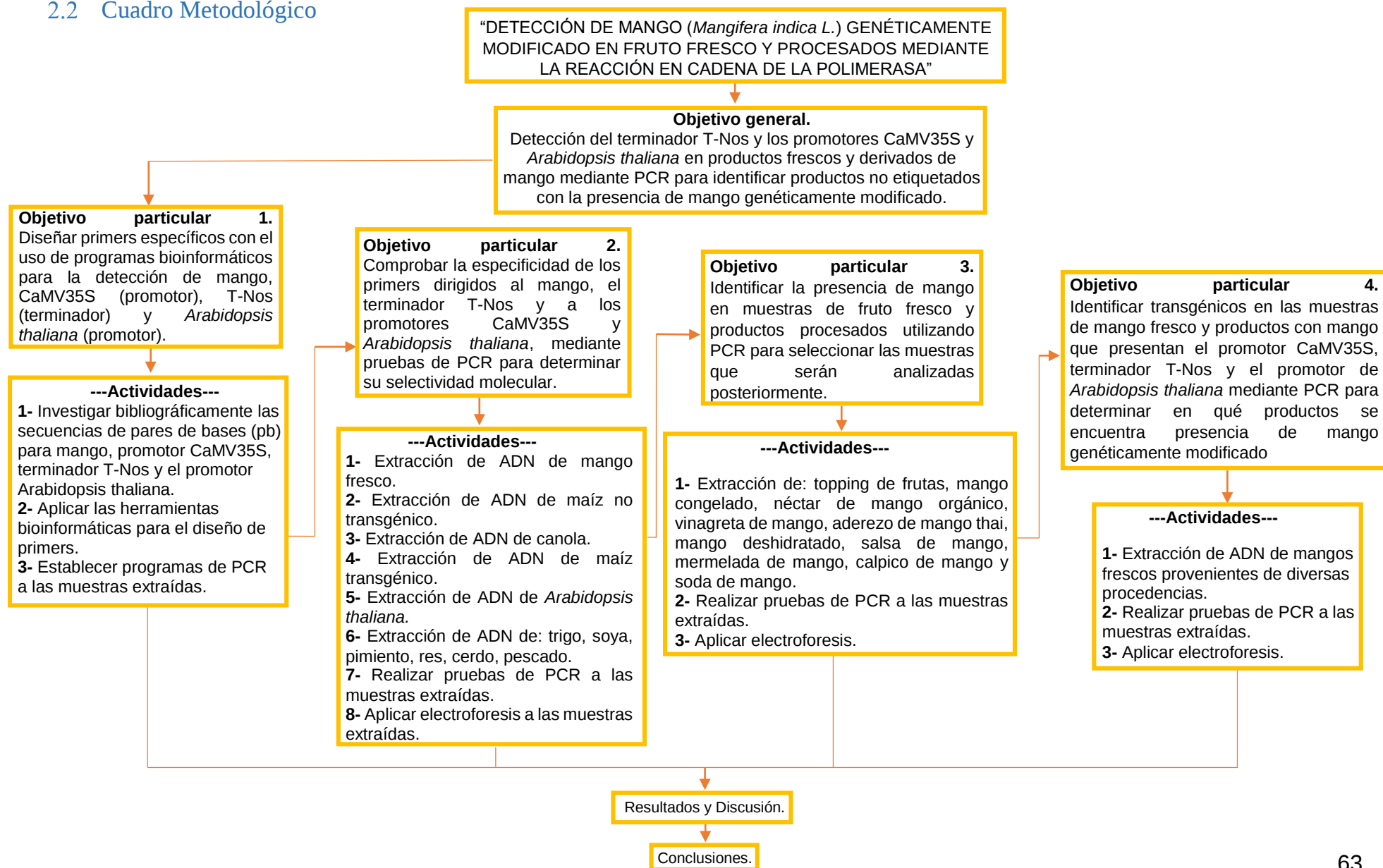
Considerando esta situación, Torres (2012) menciona algunas controversias respecto a la salud del consumidor, como primer punto destaca las reacciones alérgicas y de hipersensibilidad, que



implican la necesidad obligatoria del etiquetado de productos de consumo humano que contengan algún alimento GM, en segundo lugar las diversas sustancias químicas nocivas que pudieran contener, entre ellas: diversos marcadores o sustancias plaguicidas, como tercer punto destaca el hecho del incremento de genes de resistencia a antibióticos, que pueden ser transferidos a gérmenes patógenos para el ser humano, generando en ellos resistencia de antibióticos y en cuarto lugar la posible transferencia de genes al ser humano, aunque aún no haya sido comprobado.

Es por esta razón que el objetivo de esta investigación se centra en la detección del terminador T-Nos y los promotores CaMV35S y el gen AtSUC2 de *Arabidopsis thaliana*, utilizados en la modificación genética de mango (*Mangifera indica* L.), analizado en muestras de fruto fresco y alimentos procesados mediante la técnica de PCR, ya que la reacción en cadena de la polimerasa es el principal método de detección de los OGM a partir de las modificaciones hechas en el ADN nativo. Al referirse al uso potencial de cultivos transgénicos, es importante reconocer que se trata de una valiosa herramienta con múltiples beneficios, como ocurre actualmente con los costos de producción o en un futuro con variedades que cuenten con propiedades nutricionales incrementadas. Los transgénicos ya están en los supermercados, aunque sin etiquetado diferencial, y sus efectos se sienten tanto en el ambiente como en la salud. Los intereses económicos que mueven esta corriente son muy fuertes como para dejarse llevar por el rechazo del consumidor, y lo más probable es que el futuro esté dominado por los alimentos transgénicos patentados. Es por ello que, en lugar de asumir una posición contraria e irracional respecto al tema, se debe realizar un balance global de costo–beneficio para los casos particulares de los distintos países y buscar la mejor alternativa para todos, a fin de cuentas, el consumidor debe estar consciente de lo que está adquiriendo, ya que por él y para él se destina la mayor industria mundial, la gran industria alimentaria.

2.2 Cuadro Metodológico



2.3 Descripción de cuadro metodológico

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

2.3.1 Objetivo general

Detección del terminador T-Nos y los promotores CaMV35S y *Arabidopsis thaliana* en productos frescos y derivados de mango mediante PCR para identificar productos no etiquetados con la presencia de mango genéticamente modificado.

2.3.2 Objetivo particular 1

Diseñar primers específicos con el uso de programas bioinformáticos para la detección de mango, CaMV35S (promotor), T-Nos (terminador) y *Arabidopsis thaliana* (promotor).

---Actividades---

- A) Investigar bibliográficamente las secuencias de pares de bases (pb) específicos para mango, promotor CaMV35S, terminador T-Nos y el promotor *Arabidopsis thaliana*.
- B) Aplicar las herramientas bioinformáticas para el diseño de primers.
- C) Establecer programas de PCR.

2.3.3 Objetivo particular 2

Comprobar la especificidad de los primers dirigidos al mango, el terminador T-Nos y a los promotores CaMV35S y *Arabidopsis thaliana*, mediante pruebas de PCR para determinar su selectividad molecular.

---Actividades---

- A) Extracción de ADN de mango fresco.
- B) Extracción de ADN de maíz no transgénico.
- C) Extracción de ADN de canola
- D) Extracción de ADN de maíz transgénico.
- E) Extracción de ADN de *Arabidopsis thaliana*.

F) Extracción de ADN de trigo, soya, pimiento, res, cerdo y pescado.

G) Realizar pruebas de PCR a las muestras extraídas

H) Aplicar electroforesis a las muestras extraídas

2.3.4 Objetivo particular 3

Identificar la presencia de mango en muestras de fruto fresco y productos procesados utilizando PCR para seleccionar las muestras que serán analizadas posteriormente.

---Actividades---

A) Extracción de ADN de: topping de frutas, mango congelado, néctar de mango orgánico, vinagreta de mango, aderezo de mango thai, mango deshidratado, salsa de mango, mermelada de mango, calpico de mango y soda de mango.

B) Realizar pruebas de PCR a las muestras extraídas

C) Aplicar electroforesis

2.3.5 Objetivo particular 4

Identificar transgénicos en las muestras de mango fresco y productos con mango que presentan el promotor CaMV35S, terminador T-Nos y promotor *Arabidopsis thaliana* mediante PCR para determinar en qué productos se encuentra presencia de mango genéticamente modificado.

---Actividades---

A) Extracción de ADN de mangos frescos de diversas procedencias.

B) Realizar pruebas de PCR a las muestras extraídas

C) Aplicar electroforesis

2.4 Materiales y Métodos

2.4.1 Material biológico

Para la elaboración de este proyecto se eligieron 10 productos comercializados en México elaborados a base de mango, la mayoría de estos, de marcas comerciales obtenidas en tiendas de autoservicio o puntos de venta ambulantes.

En el siguiente recuadro se muestran las muestras estudiadas como mango procesado, así como su rotulado específico de detección y otros datos de interés para ubicar las características propias de las muestras.

Tabla 8. Características de origen y rotulado para productos procesados de mango.

Muestra	Rotulado	Marca	Lote	Caducidad	País de procedencia	Costo (\$)
Topping de frutas	Mp-1	Natural Planet	60722019	01/10/19	Estados Unidos	48
Mango congelado	Mp-2	Great Value	50412019	01/11/19	México	40
Néctar de mango orgánico	Mp-3	Campo vivo	97672019	03/03/19	México	25
Vinagreta de mango	Mp-4	Extra special	84752019	22/09/19	México	42
Aderezo mango thai	Mp-5	Vegeta listos	12212018	18/08/19	México	47
Mango deshidratado	Mp-6	Agranel	----	01/07/21	México	20
Salsa de mango	Mp-7	La vigen	27152019	23/09/21	México	45
Mermelada de mango	Mp-8	De la costa	32602019	01/05/21	México	50
Calpico de mango	Mp-9	Calpis	152223658399	01/05/2019	Japón	55
Soda de mango	Mp-10	Sangil	8809005028970	06/03/2019	Corea	40

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 9 se presentan las muestras estudiadas como mango fresco, así como su rotulado específico de detección y otros datos de interés para ubicar las características propias de las muestras.

Tabla 9. Características de origen y rotulado para productos frescos de mango.

Muestra (Mango fresco)	Rotulado	Procedencia	Costo por kilo (\$)
Mango Ataulfo	Mf-1	Wal-Mart, Tlalnepantla, Edo. de Méx.	50
Mango Manila	Mf-2	Wal-Mart, Tlalnepantla, Edo. de Méx.	50
Mango Paraíso	Mf-3	Wal-Mart, Tlalnepantla, Edo. de Méx.	75
Mango Ataulfo mini	Mf-4	Mercado de san juan, Colonia centro, CDMX.	50
Mango Ataulfo	Mf-5	Mercado de san juan, Colonia centro, CDMX.	60
Mango Manila	Mf-6	Mercado de san juan, Colonia centro, CDMX.	65
Mango Paraíso	Mf-7	Mercado de san juan, Colonia centro, CDMX.	70
Mango Ataulfo	Mf-8	Mega Soriana, Atizapán de Zaragoza, Edo. de Méx.	49
Mango Manila	Mf-9	Puesto ambulante, Buenavista, CDMX	30
Mango Ataulfo mini	Mf-10	Zorro abarrotero, Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.	45

Fuente: Elaboración propia.

2.4.2 Diseño de primers o cebadores

Para el diseño específico de los primers se utilizó el programa bioinformático de NCBI siguiendo los pasos del anexo 3, además se tomó en cuenta el artículo de Marisela Rivera Domínguez, Karen Rosalinda Astorga Cienfuegos, Socorro Vallejo Cohen, Irasema Vargas Arispuro (2011), “Embriones Transgénicos de Mango (*Mangifera indica*) cv. 'Ataulfo' con el Gen de la Defensina J1”.

En la tabla 10 se muestran las secuencias de los primers utilizados para los promotores de transgénicos, así como su tamaño de amplificado en pares de bases (pb), concentración G-C y Tm.

Tabla 10. Primers seleccionados para PCR.

Primer	Secuencia	Tm (°C)	G-C (%)	Pb
Mango	F. GCTACATGAGCCCCTAGCAG	60	60	203
	R. AGGGTATTCGTGCTTGGATG		50	
CaMV35S	F. GCTCCTACAAATGCCATCA	60	48	195
	R. GGATAGTGGGATTGTGCGTC		55	
T-Nos	F. GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	60	55	180
	R. TTATCCTAGTTTGCGCGCTA		45	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	F. GCGCAGTACAAATAAACAGTGG	61.1	45	679
	R. TCCGAAGAGGAGACAGTGAA		50	

Fuente: Elaboración propia.

2.4.3 Extracción de ADN

Se entiende como extracción de ADN a la obtención de ADN a partir de tejidos o fluidos de material biológico de interés, ya que dependiendo de las características propias del material biológico empleado resultará más o menos complicada la obtención de muestras adecuadas para su aplicación. A todas las muestras biológicas obtenidas, se les extrajo su ADN empleando el protocolo de Green y Sambrook (2012), basado en la disolución del tejido de la muestra usando detergentes y proteinasas, extracción de proteínas y polisacáridos y la precipitación del ADN, sin embargo a lo largo de la experimentación se realizaron ajustes para adecuar las técnicas, ya que al tener altas concentraciones de carbohidratos, pectinas y carotenos se presentaban dificultades para realizar la extracción correctamente.

Reactivos:

- ◆ Muestras de material biológico
- ◆ Etanol frío
- ◆ Mezcla Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico
- ◆ Enzima proteinasa K
- ◆ Solución de lisis (Tris base 50mM, pH=8, EDTA 0.1 M, SDS 0.5%)
- ◆ H₂O libre de nucleasas

Material y equipo:

- ◆ Mortero de porcelana
- ◆ Balanza Analítica Electrónica *Symmetry Cole-Parmer PR 410*
- ◆ Agitador Vortex, *Genie K-55-G*
- ◆ Centrífuga *Mini Spin plus Eppendorf modelo F-45-12-11*
- ◆ Juego de micropipetas
- ◆ Thermomixer compact, Eppendorf, modelo T1317-1EA.

Metodología.

2.4.3.1 *Disgregación del tejido*

1. Se trituró la muestra de interés con un mortero de porcelana.
2. Se pesó y agregó 0.200 g de la muestra en un tubo eppendorff.
3. Se agregaron 0.100 g de micro perlas de vidrio.
4. Se agregaron 1250 μ L de solución de lisis y se dio agitación en el agitador Vortex por 10 min.
5. Se adicionaron 7 μ L de la enzima proteinasa K.
6. Se incubó el tubo eppendorff a 50 °C en el Thermomixer por 2 horas.
7. Se aumentó la temperatura del Thermomixer a 60 °C por 1 hora.
8. Se centrifugó a 3000 rpm por 5 segundos y se recupera la fase ligera.
9. Se centrifugó a 3000 rpm por 30 segundos y se recupera la fase ligera.
10. Se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos y se recupera la fase pesada (pellet).
11. Se agregaron 1000 μ L de solución de lisis y se dio agitación en el agitador Vortex por 5 minutos hasta disolver por completo el pellet.

Una vez obtenido y cuantificado el ADN de los productos procesados se realizó la prueba de PCR utilizando el Kit de *Master Mix* y los primers de mango, así como el control positivo propio (C+). El programa utilizado se muestra en la figura 10. Posteriormente se evaluó el producto obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 3 % y se observó en el transiluminador.

2.4.3.2 *Extracción de proteínas y polisacáridos*

12. Se agregaron 250 μ L de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico y se agitó por 3 minutos en el agitador Vortex.
13. Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos.

14. Se recuperó la fase acuosa superior (donde se encuentra el ADN) y se trasladó a un nuevo segundo tubo eppendorff.

2.4.3.3 *Precipitación del ADN*

15. Se adicionó aproximadamente 1000 μL de etanol frío al tubo eppendorff que contiene la fase acuosa recuperada.
16. Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos.
17. Se decantó el etanol y se dejó secar con el tubo eppendorff abierto en el Thermomixer a 37 °C por 1 hora.
18. Se agregaron 50 μL de agua libre de nucleasas al tubo eppendorff.
19. Se aplicó agitación al tubo eppendorff en el vortex por 1 min.
20. Se cuantificó el ADN por medio de absorbancia.

2.4.4 *Cuantificación de ADN*

La cuantificación de ADN de las muestras biológicas se realiza por medición de absorbancia, este método es útil para detectar cualquier compuesto que absorbe luz significativamente a 260 nm, ya que se presentan ácidos nucleicos altamente puros, lo cual incluye, por ejemplo: ADN, ARN, EDTA y Fenol. La relación de absorbancia 260nm se utiliza como prueba de contaminación de una preparación de ADN y ARN con proteína, puesto que los aminoácidos aromáticos absorben la luz a 280nm. En este caso, sólo un nivel significativo de proteína en la preparación puede causar un cambio significativo en la relación de absorbancia en ambas longitudes de onda.

Para cuantificar la cantidad de ADN, las lecturas se tomaron a 260 y 280 nm. La lectura de 260nm permite conocer la concentración de ácidos nucleicos que contiene la muestra analizada. La relación entre las lecturas a 260 y 280nm proporciona un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos, la preparación pura de ADN tiene valores de 1.8, mientras que valores de 2 muestran la existencia de preparaciones puras de ARN. Si existe contaminación significativa con fenol

o proteínas, la relación 260/280 será menor de 1.7 entonces puede haber dificultades por inhibición al utilizar el ADN presente en la muestra, (Green y Sambrook, 2012).

Reactivos:

- ◆ ADN de muestras de material biológico.
- ◆ H₂O libre de nucleasas.

Equipos:

- ◆ Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 A113.
- ◆ Micropipetas.
- ◆ Tubos eppendorff.

Metodología.

1. Se encendió la computadora
2. Se abrió el programa de Nanodrop, representado con un icono ND-1000.
3. Se seleccionó el botón “ácidos nucleicos”.

2.4.4.1 Calibración del equipo

4. Se colocaron 2μL de agua libre de nucleasas en el pequeño orificio que se encuentra en la base del equipo.
5. Se bajó el brazo del equipo.
6. En la pantalla de la computadora se presionó el icono de “OK”.
7. Se levantó el brazo del equipo.
8. Se limpió el agua del espectrofotómetro con un pedazo de papel.

2.4.4.2 Muestra Blanco

9. Se colocaron 2μL de agua libre de nucleasas, se bajó el brazo del equipo.
10. Se seleccionó el icono de “Blanco”, en el apartado de “muestra ID” se escribió “Blanco” en la computadora.
11. Se esperó a que la prueba finalice, se levanta el brazo del equipo y se limpió.

2.4.4.3 Análisis de muestras

12. Se colocaron 2 μ L de la muestra de interés, se bajó el brazo del equipo
13. Se seleccionó el icono “Measure”, en el apartado de “Sample ID” se escribió el nombre de la muestra en la computadora.
14. Se levantó el brazo del equipo y se limpió.
15. Se anotan los datos de interés resultantes: las relaciones 280/260 así como la concentración presentada en ng/ μ L.
16. Se repitieron los pasos 12 a 14 para el análisis de cada muestra a cuantificar.
17. Al concluir la cuantificación de las muestras de interés, se seleccionó “salir” y por ultimo “Esc” para finalizar el programa.

NOTA: La concentración registrada debe ser lo más aproximado (± 10) a 70 ng/ μ L, de lo contrario se debe realizar una dilución de la muestra de ADN con agua libre de nucleasas (Anexo 1).

2.4.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La programación del termociclador se efectúa de acuerdo a la temperatura media de los cebadores (“PRIMERS”) y la enzima del kit utilizado, los tiempos y números de ciclo son según la referencia bibliográfica base o los resultados obtenidos según las experimentaciones previas en el laboratorio (recomendaciones experimentales).

Siendo las etapas de acuerdo a Mason y colaboradores (2002).

- Desnaturalización: Es necesario que el ADN se desnaturalice, es decir, que las dos cadenas de ADN se separen y se lleva a cabo elevando la temperatura a alrededor de 94°C.
- Hibridación: Consiste en un descenso de la temperatura para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al DNA molde. Temperaturas habituales en esta fase oscilan entre 55 y 62°C.

- Elongación o extensión: En esta etapa la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores. La temperatura a la que se lleva a cabo esta fase depende de la enzima polimerasa empleada; si se utiliza Taq polimerasa la temperatura de elongación suele ser de 72°C.

La duración de cada etapa debe corregirse para incluir el tiempo necesario en que la mezcla alcance la temperatura fijada, tiempo que depende de muchos factores (fuente de calor, volumen de la reacción, material del tubo, etc.). La reacción de PCR se ha automatizado: existen aparatos (termocicladores) que pueden programarse para que modifiquen de forma cíclica las condiciones de la reacción de modo que la muestra pueda atravesar repetidamente las tres etapas del proceso de amplificación (Perera *et al.*, 2003).

Es fundamental la estandarización de las concentraciones de los componentes principales de la reacción (primers y ADN). Los primers deben ser solubilizados a una concentración de 250 μL , mientras que el ADN requiere una concentración baja aprox. 70 ng/ μL .

Cuando se habla de PCR directa se considera un tipo de reacción que ha sido modificada para obtener mayores rendimientos en los productos obtenidos, así como la mejora de tiempo transcurrido por la reacción, tal es el caso del kit de PCR directa para plantas: Phire de Thermo Scientific, fue diseñado para realizar PCR directa a partir de hojas, plantas y semillas sin purificación previa de ADN.

El kit emplea la enzima modificada Phire Hot Start II DNA Polymerase, con un dominio de unión al ADN que mejora la eficiencia de la polimerasa, también exhibe niveles extremadamente altos de resistencia a muchos inhibidores de PCR encontrados en plantas.

Este kit contiene reactivos y herramientas que permiten utilizar muestras más grandes cuyos fragmentos de ADN sean más largos ($> 1 \text{ kb}$) o más difíciles como es el caso de muestras

fibrosas o que contengan látex. Por ejemplo, los cebadores de control para la amplificación de una región altamente conservada de cloroplasto o el caso de la solución Buffer que ha sido optimizada para PCR directa a partir de material vegetal, ya que contiene los d´NTP adecuados y proporciona una concentración de $MgCl_2$ 1.5 mM en la reacción final.

Reactivos:

- ◆ Kit “Master mix”.
- ◆ Kit para PCR directa: *Thermo Scientific Phire Plant Direct*.
- ◆ Primers específicos de las muestras de interés (mango, CaMV35S, T-nos o *Arabidopsis thaliana*)
- ◆ H_2O libre de nucleasas.

Materiales y equipo:

- ◆ Termociclador, *Apollo ATC401 CLP*.
- ◆ Juego de micro pipetas.
- ◆ Tubos *ependorf*.
- ◆ Agitador Vortex.
- ◆ Microcentrifuga.

Metodología.

2.4.5.1 Cálculo para la preparación de la reacción

La preparación de las muestras para la reacción se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo que establece el kit para PCR. Se realizan los cálculos necesarios para para determinar la cantidad de cada componente en la reacción (ver anexo 2).

En el siguiente recuadro se muestran las cantidades (μL) de reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR con el Kit Master Mix y el kit de PCR directa.

Tabla 11. Cantidades de componentes para agregar por cada muestra: A) Kit Master Mix, B) Kit PCR directa.

Componente (A)	Proporción p/muestra	Componente (B)	Proporción p/muestra
Kit Master Mix	12.5 μL	Sol. Boffer	10 μL
Primer F	0.5 μL	Primer F	0.5 μL
Primer R	0.5 μL	Primer R	0.5 μL
ADN	2 μL	ADN	0.5 μL
Agua L.N	10.5 μL	Agua L.N	8.1 μL
		Enzima	0.4 μL

FUENTE: (Manual de preparación para Kit Master Mix, 2010).

De esta forma como lo indica la tabla 10 por cada muestra de ADN a ser analizada se utilizan cerca de 24 μL de reactivo de volumen + 2 μL de ADN, lo cual se debe considerar para realizar la previa preparación de todas las muestras de ADN, ya que se puede preparar una única solución que contenga todos los reactivos en común y dividirla entre las muestras necesarias.

2.4.5.1.1 Preparación de la reacción

1. Se dividieron y agregaron a los tubos eppendorff los μL de solución correspondiente a la cantidad de muestras que se tengan.
2. Se centrifugaron las muestras a 3000 rpm por 2 s.
3. Se introdujeron los tubos eppendorff al termociclador y se ajustaron a las condiciones del programa específico para PCR.

2.4.5.2 Programas para PCR

Considerando las especificaciones de los primeros seleccionados se propusieron los siguientes programas para realizar la reacción en cadena de la polimerasa a cada producto seleccionado.

➤ Mango

En la figura 10 se muestra el programa de PCR específico para mango, en donde se tiene un amplificado de 203 pb. Comienza la reacción con una desnaturalización inicial a 94° C, 1 min (A), seguida de una desnaturalización a 94 ° C, 1 min (B), considerando una hibridación a 60.4 ° C, 30 s (C), tomando en cuenta una elongación de 72 ° C, 30 s (D), continuando con una elongación final a 72 °C, 5 min (E) y finalizando en un almacenamiento a 4 °C (F). Las etapas B, C y D se repiten por 40 ciclos.

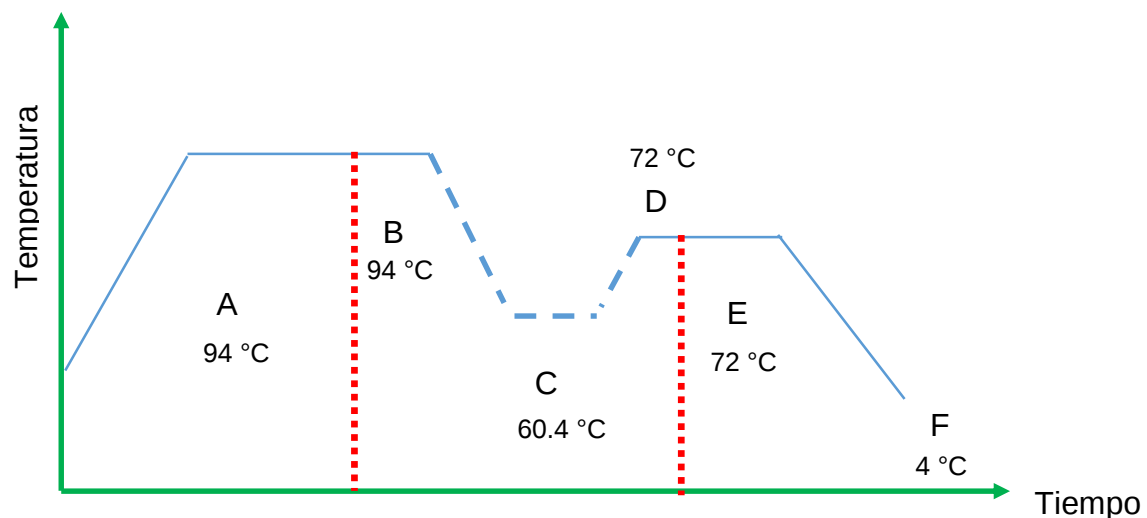


Figura 10. Gráfico de programa de PCR para muestras de mango.

➤ CaMV54S y T-nos

La figura 11 corresponde al programa de PCR para el promotor CaMV35S y terminador T-nos de acuerdo a lo descrito por Barragan, L. L. (2017). *Detección de trigo (Triticum spp) en granos y productor comerciales, mediante la PCR*. Edo. Méx.: UNAM (ver anexo 4), en donde se tiene un amplificado de 195 pb para el promotor CaMV35S y un amplificado de 180 pb para el terminador T-nos. La reacción para ambos casos comienza con una desnaturalización inicial a 98° C, 5 min (A), seguida de una desnaturalización a 98 ° C, 5 s (B), considerando una hibridación a 60.7 ° C, 5 s (C), tomando en cuenta una elongación de 72 ° C, 40 s (D), continuando con una elongación final a 72 °C, 1 min (E) y finalizando en un almacenamiento a 4 °C (F). Las etapas B, C y D se repiten por 40 ciclos.

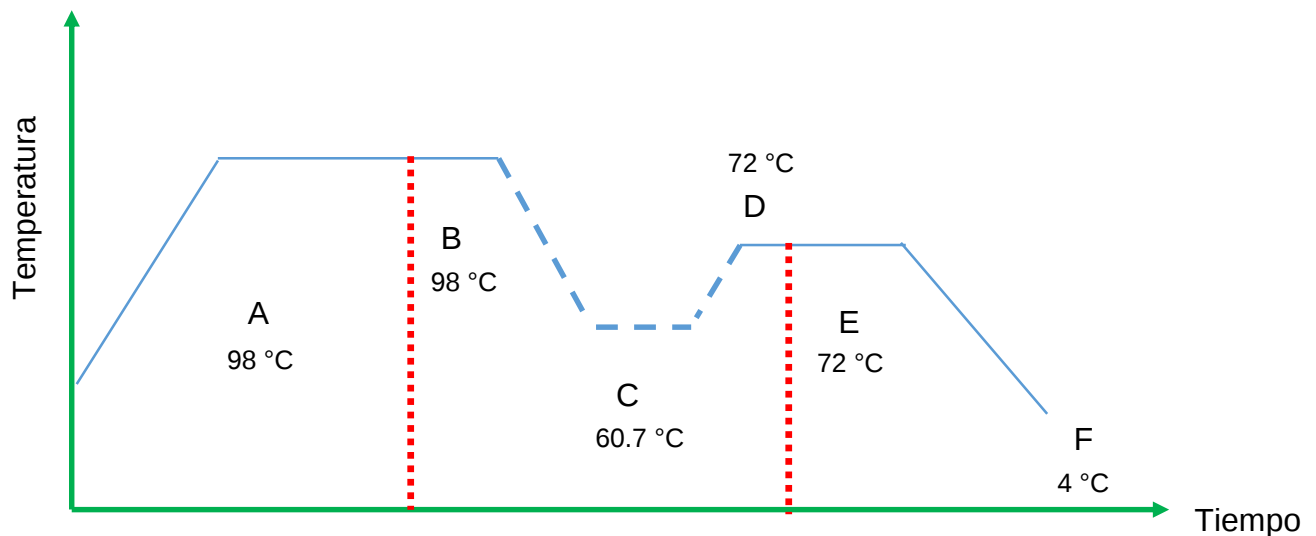


Figura 11. Gráfico de programa de PCR para muestras de promotor CaMV35S y terminador T-nos.

➤ *Arabidopsis thaliana*

En la figura 12 se muestra el programa de PCR seleccionado para el promotor de *Arabidopsis thaliana*, en donde se tiene un amplificado de 679 pb. Comienza la reacción con una desnaturalización inicial a 98° C, 5 min (A), seguida de una desnaturalización a 98 ° C, 5 s (B), considerando una hibridación a 61.1 ° C, 5 s (C), tomando en cuenta una elongación de 72 ° C, 40 s (D), continuando con una elongación final a 72 ° C, 1 min (E) y finalizando en un almacenamiento a 4 ° C (F). Las etapas B, C y D se repiten por 40 ciclos.

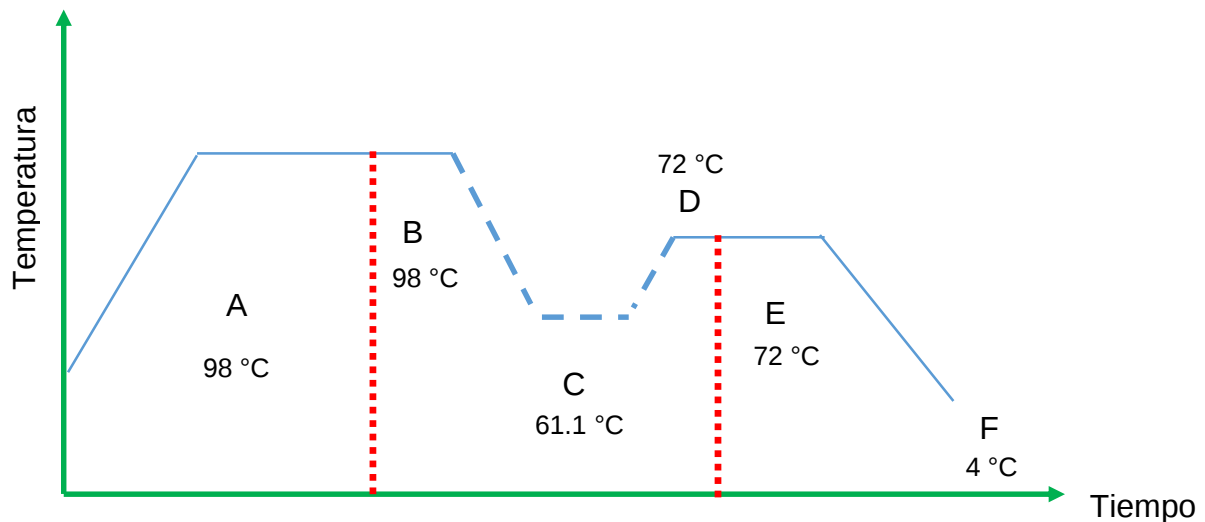


Figura 12. Gráfico de programa de PCR para muestras de promotor *Arabidopsis thaliana*.

2.5 Electroforesis

2.5.1 Electroforesis en gel de agarosa (3% para PCR y 1% para integridad molecular)

La electroforesis es una técnica bioquímica estándar para la separación de moléculas sobre la base del tamaño y la carga eléctrica. Hay varios tipos diferentes de electroforesis; para separar las moléculas de ADN se utiliza electroforesis en gel. El gel es sometido al paso de corriente a través de él. Dado que el grupo fosfato de cada nucleótido de ADN posee una carga negativa, así los fragmentos de ADN migran hacia el extremo positivo del gel y la movilidad de estos dependerá de su tamaño (Tagu y Moussard, 2006).

Reactivos

- ◆ Agarosa, *Gibco ERL*.
- ◆ Tris acetato y EDTA (TAE) 1X como solución buffer, pH=8.
- ◆ Bromuro de etidio en concentración (BrET) de 10mg/ml.
- ◆ Marcador de peso molecular, Promega.
- ◆ Tinte cargador azul/naranja 6X, Promega.
- ◆ Muestras de las reacciones de PCR.

Materiales y equipo

- ◆ Fuente de poder, Bio-Rad PowerPac 200
- ◆ Cámara y Cassete de electroforesis, Apollo 75.710
- ◆ Micropipetas
- ◆ Matraz Erlenmeyer
- ◆ Parafilm
- ◆ Transiluminador (fotodocumentador) de luz UV marca Claver Scientific LTD.
- ◆ Equipo de fotografía para luz UV marca Kodak digital Science.

Metodología:

2.5.1.1 Preparación del gel de agarosa

1. Se pesaron 0.9 g de agarosa (para un gel al 3%), 0.75g (para un gel al 2.5%) o 0.45g (para un gel al 1.5%) y se agregaron 30 ml de TAE-1X dentro de un matraz Erlenmeyer.
2. Se calentó la solución en el horno de microondas en periodos de 20 segundos hasta disolver la agarosa sin llegar a la ebullición.
3. Se dejó enfriar a temperatura ambiente.
4. Se agregaron aproximadamente 0.05 ml (una gota) de BRET y se agitó suavemente para disolver.
5. Se colocó el peine en la cabina de la cámara de electroforesis para la formación de pozos y se colocaron las paletas laterales, posteriormente se agregó la solución.
6. Se esperó hasta que solidificara la solución y una vez formado el gel, se debe retirar cuidadosamente el peine y las paletas laterales.
7. Se agregó a la cámara la cantidad necesaria de amortiguador TAE 1X, para cubrir el gel en su totalidad.

2.5.1.2 Carga y corrida del gel

8. Se colocó sobre un trozo de parafilm 5µl de cada muestra a leer, con 3 µl de azul de bromofenol y 3 µl de Bromuro de Etidio (BrET).
9. Se agregó el marcador de peso molecular mezclado con los otros componentes (con excepción de la muestra a leer) en el primer pozo de la fila del gel.
10. Se agregó la muestra blanco mezclada con los otros componentes en el segundo pozo de la fila del gel.
11. Se homogenizó la muestra con una micropipeta y se transfiere a uno de los pozos del gel.

--Se realizó el punto anterior para cada una de las muestras--

12. Se cerró la cámara de electroforesis, se conecta a la fuente de poder y se corrió a 60 V (para un gel al 3%) o a 65 V (para un gel al 2.5%) o 90 V (para un gel al 1.5 %).
13. Se apagó la fuente de poder cuando el colorante o buffer de carga blue/orange pasó a tres cuartas partes del gel.
14. Se abrió la cámara de electroforesis y se retiró el gel con las muestras con ayuda de espátulas, teniendo cuidado de no dañarlo o romperlo.

2.5.1.3 Visualización de fragmentos en un fotodocumentador

15. Se colocó el gel en el transiluminador de luz UV Clavel Scientific LTD, se cierra la escotilla del equipo.
16. Se colocó la cámara digital en el transluminador y se enciende la luz UV del equipo para obtener una fotografía.

CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Objetivo particular 1

Diseñar primers específicos con el uso de programas bioinformáticos para la detección de mango, CaMV35S (promotor), T-nos (terminador) y Arabidopsis thaliana (promotor).

Se diseñaron los primers específicos para identificar mango (*Mangifera indica* L.) en el programa bioinformático NCBI (anexo 3), la secuencia de dichos primers se encuentra en la tabla 3. Se analizó la secuencia para la cual amplifican y se verificó que al realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con las muestras de mango fresco y productos procesados el tamaño del amplificado sea de 203 pares de bases.

3.2 Objetivo particular 2

Comprobar la especificidad de los primers dirigidos al mango, el terminador T-nos y los promotores CaMV35S y Arabidopsis thaliana, mediante pruebas de PCR para determinar su selectividad molecular.

➤ Especificidad de primers de mango.

Para comprobar la especificidad de los primers dirigidos al mango se realizó la extracción de muestras de mango, trigo, soya, pimiento, res, cerdo y pescado siguiendo el protocolo de extracción (Green & Sambrook, 2012). Las muestras de ADN fueron cuantificadas mediante espectrofotometría utilizando el Nanodrop. En la tabla 12 se muestran las concentraciones iniciales obtenidas después de la extracción, las cuales van de 918.7 a 3239.4 ng/μL, sin embargo, para ser utilizadas en la reacción en cadena de la polimerasa fue necesario realizar una dilución con agua libre de nucleasas (anexo 1). Se realizaron los cálculos de tal manera que las muestras quedaran a una concentración aproximada de 70 ng/μL. La relación 260/280 final muestra que los valores se encuentran por debajo del valor óptimo que es de 1.8 indicando

que existe presencia de proteínas, sin embargo, las muestras pudieron ser utilizadas para la PCR sin presentar dificultades posteriores.

Tabla 12 Concentración y pureza de muestras de ADN para especificidad de primers de mango.

Muestra		Relación inicial 260/280 (nm)	Concentración inicial de ADN (ng/μL)	Relación final 260/280 (nm)	Concentración final de ADN (ng/μL)
Man	Mango	1.54	918.7	1.45	88
Tri	Trigo	1.63	1417.9	1.48	120.2
Soy	Soya	1.79	2859.3	1.48	113.4
Pim	Pimiento	1.53	3239.4	1.45	94.5
Res	Res	1.83	2743	1.49	90.4
Cer	Cerdo	1.65	3137.5	1.47	75.3
Pez	Pescado	1.53	2702.9	1.42	82.1

- **Control positivo para mango**

Una vez obtenido y cuantificado el ADN de mango se realizó la prueba de PCR utilizando el Kit de *Master Mix* y los primers de mango con la finalidad de determinar el control positivo (C+). El programa utilizado se muestra en la figura 10. Posteriormente se evaluó el producto obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 3 % y se observó en el transiluminador.

En la Figura 13 se muestra el amplificado correspondiente al control positivo, el cual corresponde a las 203 pb esperadas para el gen del cloroplasto de mango. En el primer carril marcado como C+ se colocó la muestra de ADN de mango fresco, posterior a este se cargó en el segundo carril la muestra de control negativo o blanco marcado como B, finalmente en el tercer carril se colocó el marcador de peso molecular (MP) de 100 pb.

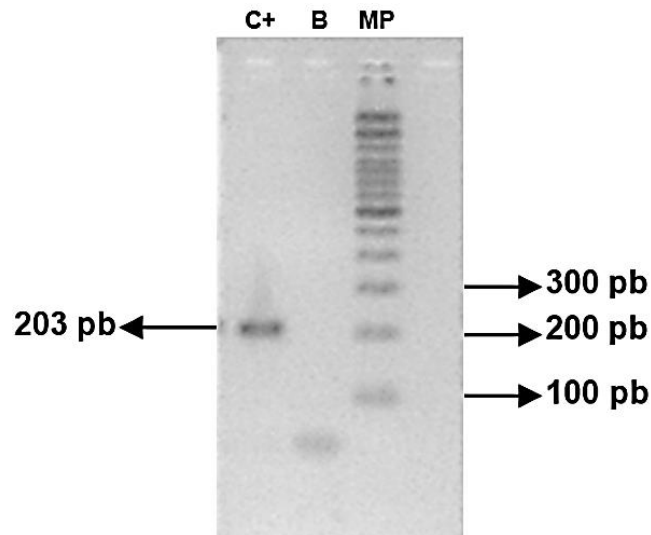


Figura 13. Gel de agarosa al 3% a 60 V, control positivo de primers de mango. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo (mango).

Al haber establecido la muestra correspondiente al control positivo (C+) es posible continuar con el análisis posterior, ya que se asegura que los primers de mango han amplificado satisfactoriamente; además se observa que no existe contaminación que pudiera alterar el resultado al no presentar alguna banda de amplificación en el carril B que corresponde al Blanco.

En el tercer carril de la figura 14 se observa el amplificado de 203 pb que corresponde al control positivo (C+) para mango. Sin embargo, en los próximos carriles definidos para trigo (Tri), soya (Soy), pimienta (Pim), bobino (Res), cerdo (Cer) y pescado (Pes) no se observa ningún amplificado en especies cercanas y lejanas, indicando que los primers diseñados para mango son específicos. En el segundo carril definido para el control negativo (B) se observa que no existe contaminación al no presentar alguna banda de amplificación, por lo que nos asegura que la prueba es confiable.

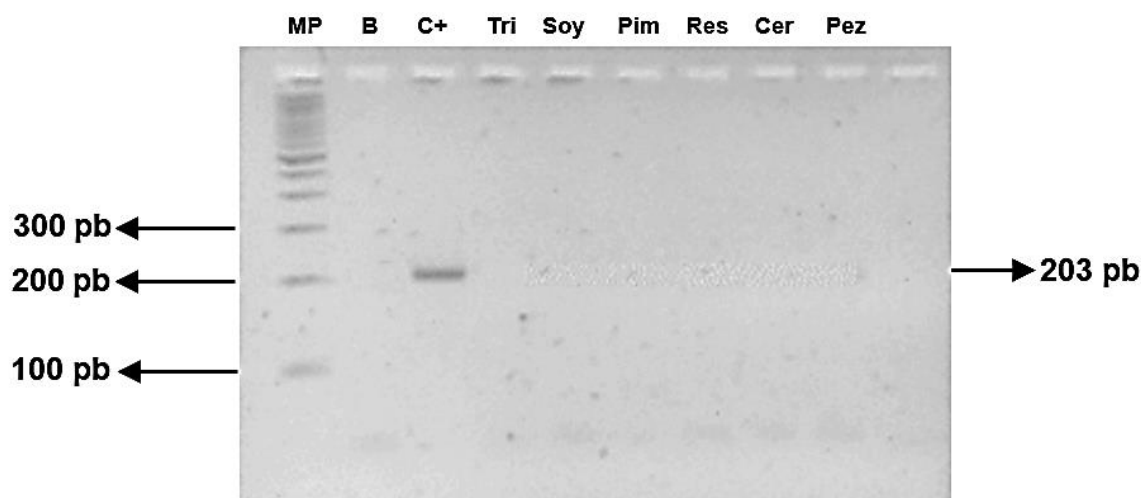


Figura 14. Gel de agarosa al 3% a 60 V para prueba de especificidad de primers de mango. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo (mango), (Tri) trigo, (Soy) soya, (Pim) pimienta, (Res) bobino, (Cer) cerdo, (Pez) pescado.

➤ **Especificidad de primers de promotores CaMV35S y *Arabidopsis thaliana* y el terminador T-nos.**

Para comprobar la especificidad de los primers dirigidos al promotor CaMV35S, *Arabidopsis thaliana* y el terminador T-nos, se realizó la extracción de muestras de maíz transgénico, así como de maíz no transgénico, canola y *Arabidopsis thaliana* siguiendo el protocolo de extracción, (Green y Sambrook, 2012). Las muestras de ADN fueron cuantificadas mediante espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop. En la tabla 13 se muestran las concentraciones iniciales obtenidas después de la extracción, las cuales van de 942.5 a 267.1 ng/μL, para ser utilizadas en la PCR fue necesario realizar una dilución con agua libre de nucleasas (anexo 1). Se realizaron los cálculos de tal manera que las muestras quedaran a una concentración aproximada de 70 ng/μL. La relación 260/280 final muestra que los valores se

encuentran por debajo del valor óptimo que es de 1.8 indicando que existe presencia de proteínas, sin embargo, las muestras no presentaron dificultades posteriores y pudieron ser utilizadas.

Tabla 13. Concentración y pureza de muestras de ADN para especificidad de primers del promotor CaMV35S.

Muestra		Relación inicial 260/280 (nm)	Concentración inicial de ADN (ng/μL)	Relación final 260/280	Concentración final de ADN (ng/μL)
MTr	Maíz Transgénico	1.65	942.5	1.56	105.7
MNTr	Maíz No Transgénico	1.83	267.1	1.53	90.1
Can	Canola	1.73	559.3	1.52	93
Ara	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.79	333.8	1.50	96.2

Una vez obtenido y cuantificado el ADN del maíz transgénico se realizó la reacción en cadena de la polimerasa utilizando el Kit directo *Thermo Scientific phire plant direct* y los primers de CaMV35S, así como los primers de *Arabidopsis thaliana* y T-nos (cada uno por separado en diferente reacción) con la finalidad de determinar el control positivo (C+) para cada caso. El programa utilizado para CaMV35S y T-nos se muestra en la figura 11 (pág. 78), mientras que en la figura 12 se observa el programa de PCR utilizado para el promotor *Arabidopsis thaliana* (pág. 79). Posteriormente se evaluaron las reacciones obtenidas mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % para CaMV35S y T-nos y al 1.5% para *Arabidopsis thaliana* con la finalidad de lograr observar los resultados con ayuda de un transiluminador.

- **Control positivo para el promotor CaMV54S**

En la figura 15 se muestra el amplificado correspondiente al control positivo, el cual corresponde a las 195 pb esperadas. En el tercer carril marcado como C+ se colocó la muestra de ADN de maíz transgénico, posterior a este se cargó en el segundo carril la muestra de control negativo o blanco marcado como B y finalmente en el primer carril se colocó el marcador de peso molecular (MP) de 100 pb.

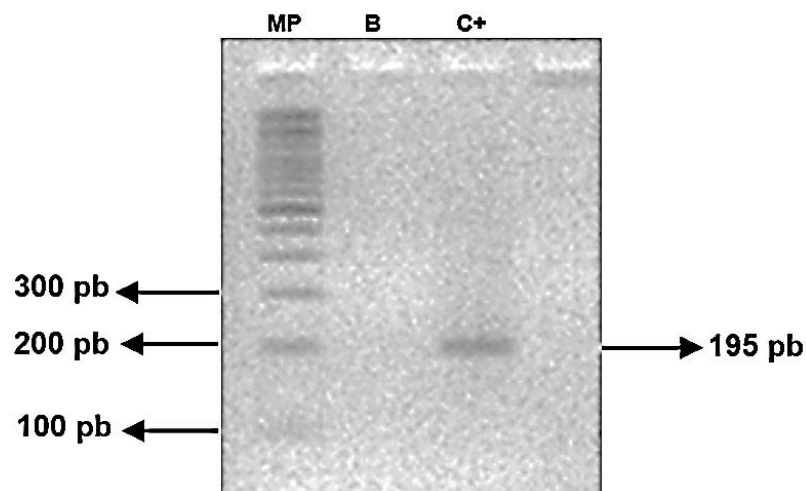


Figura 15. Gel de agarosa al 2.5% a 65 V para prueba de control positivo de primers de CaMV35S. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo (CaMV53S).

- **Control positivo para el terminado T-nos**

Observando la figura 16 se logra ver el amplificado correspondiente al control positivo de T-nos 180 pb. En el primer carril se colocó el marcador de peso molecular (MP) de 100 pb, enseguida de este se cargó en el segundo carril la muestra blanco marcada como B y finalmente en el tercer carril marcado como C+ se colocó la muestra de ADN de maíz transgénico.

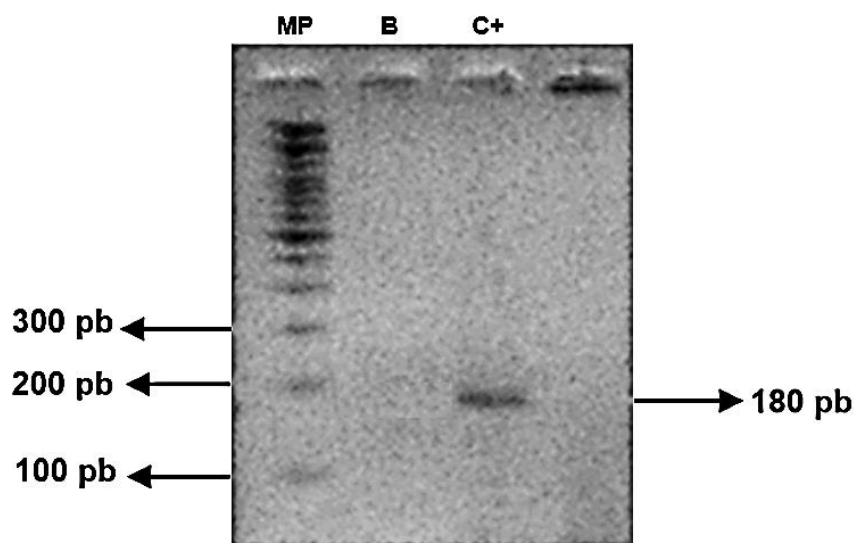


Figura 16. Gel de agarosa al 2.5% a 65 V para prueba de control positivo de primers de T-nos. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo (T-nos).

- **Control positivo para el promotor *Arabidopsis thaliana***

Como se puede ver en la figura 17 se denota el amplificado correspondiente al control positivo de 679 pb de *Arabidopsis thaliana*. En el primer carril se agregó el marcador de peso molecular (MP) de 100 pb, en el segundo carril la muestra blanco marcada como B y finalmente en el tercer carril (C+) se colocó la muestra de ADN de *Arabidopsis thaliana*.

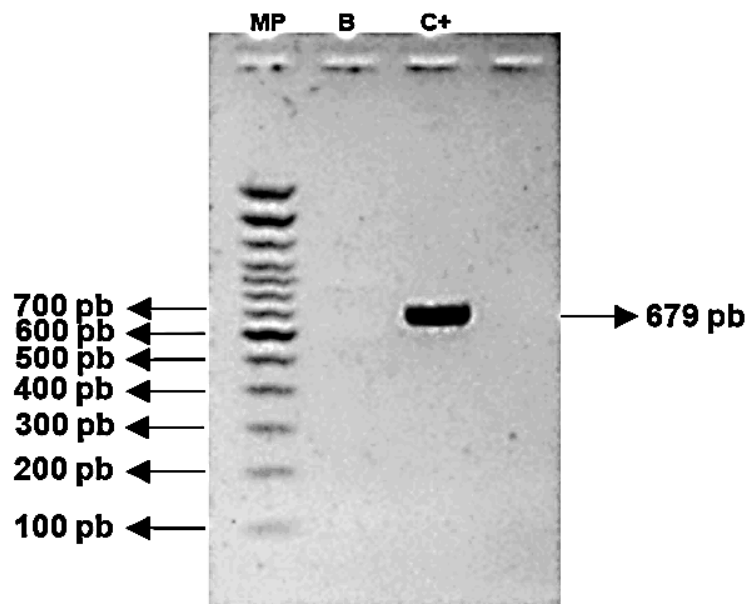


Figura 17. Gel de agarosa al 1.5% a 90 V para prueba de control positivo de primers de *Arabidopsis thaliana*. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo (*Arabidopsis thaliana*).

Ya que se han establecido las muestras correspondientes al control positivo (C+) de cada promotor y terminador es posible continuar con el análisis, debido a que se asegura que los primers han amplificado como se tenía previsto; además se puede notar que en ninguno de estos geles existe contaminación que pudiera alterar el resultado, ya que no se presentan bandas de amplificación para el carril destinado al control negativo.

- **Especificidad de los primers para CaMV35S**

Analizando la figura 18 se observa el amplificado de 195 pb correspondiente al control positivo (C+) para CaMV35S. Sin embargo, en los próximos carriles definidos para (MNTr) maíz no transgénico, (Can) canola y (Ara) *Arabidopsis thaliana* no se observa ningún amplificado, indicando que los primers para el promotor CaMV35S son específicos. En el segundo carril definido para el control negativo (B) se observa que no existe contaminación al no presentar alguna banda de amplificación, por lo que se puede confiar en la prueba.

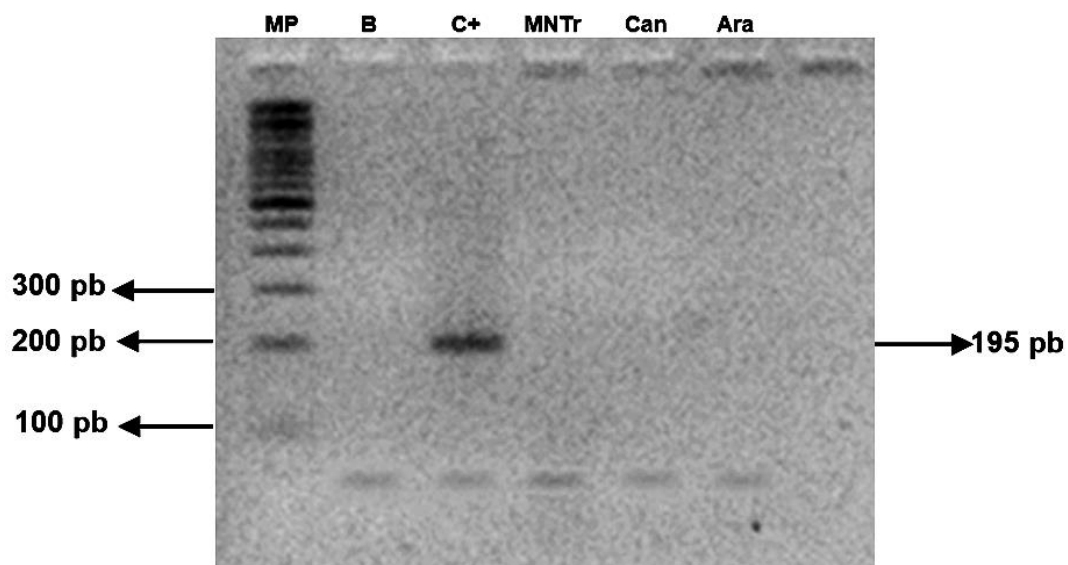


Figura 18. Gel de agarosa al 2.5% a 65 V, especificidad de primers del promotor CaMV35S. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo, (MNTr) maíz no transgénico, (Can) canola y (Ara) *Arabidopsis thaliana*.

- **Especificidad de los primers para T-nos**

Como se puede observar en la figura 19 existe un amplificado con un tamaño de 180 pb correspondiente al control positivo (C+) para T-nos. Consecutivamente, en los carriles siguientes identificados para (MNTr) maíz no transgénico, (Can) canola y (Ara) *Arabidopsis thaliana* no se logra observar ningún amplificado, indicando que los primers para el terminador T-nos son específicos. En el siguiente carril correspondiente a el blanco (B) se observa que no existe alguna banda de amplificación por lo que se puede confiar en la prueba al no presentar contaminación.

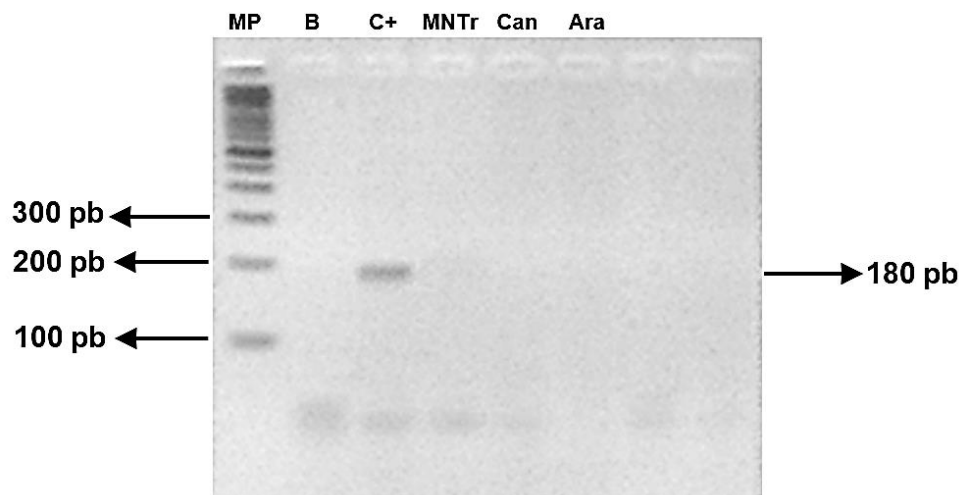


Figura 19. Gel de agarosa al 2.5% a 65 V, especificidad de primers del terminador T-nos. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo, (MNTr) maíz no transgénico, (Can) canola y (Ara) *Arabidopsis thaliana*.

- **Especificidad de los primers para *Arabidopsis thaliana***

Observando la figura 20 se destaca un amplificado de 679 pb que corresponde al control positivo (C+) para *Arabidopsis thaliana*. En los carriles siguientes marcados para (MTr) maíz transgénico, (MNTr) maíz no transgénico y (Can) canola no se puede ver ningún amplificado, indicando que los primers para el promotor *Arabidopsis thaliana* son específicos. Como parámetro de confianza se puede notar que el carril del blanco (B) no tiene ninguna banda de amplificado, por lo que la prueba resultó satisfactoria.

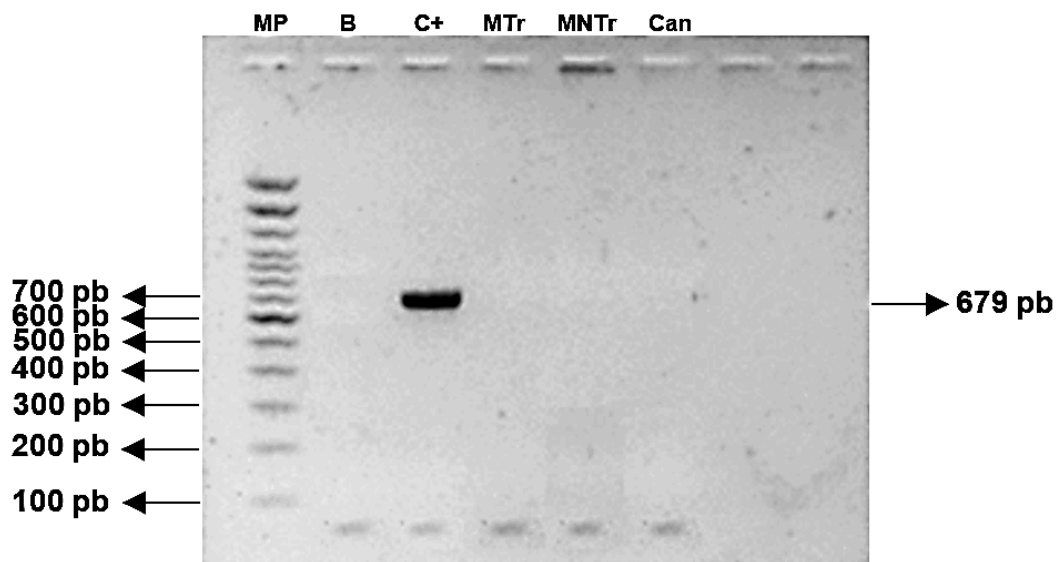


Figura 20. Gel de agarosa al 1.5% a 90 V, especificidad de primers del promotor *Arabidopsis thaliana*. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo, (MTr) maíz transgénico, (MNTr) maíz no transgénico y (Can) canola.

3.3 Objetivo particular 3

Identificar la presencia de mango en muestras de fruto fresco y productos procesados utilizando PCR para seleccionar las muestras que serán analizadas posteriormente.

Con la finalidad de delimitar las muestras que serán evaluadas posteriormente para productos transgénicos es prioritario identificar que en los veinte productos que se eligieron en un inicio contengan mango dentro de su composición, por lo que fue necesario realizar extracciones de ADN a los productos procesados y frutos frescos con forme la metodología de Sambrook (2012) e identificar la presencia de mango haciendo uso de la técnica de PCR, así como de primers específicos de mango y el propio control positivo para mango. Se cuantificó la concentración y pureza de las muestras de ADN extraídas haciendo uso del equipo Nanodrop.

➤ **Identificación de mango en frutos frescos**

En la tabla 14 se observan las concentraciones y pureza resultantes de la cuantificación de ADN, la relación 260/280 (nm) inicial que se obtuvo se encuentra entre 1.44 – 1.83 teniendo para el caso de MF-7 un valor de 1.83, el cual representa la única muestra con una relación por encima del ideal 1.8, lo que significa que la muestra se encuentra en un estado más puro y se asegura la PCR. Sin embargo, las nueve muestras restantes presentaron valores por debajo del ideal 1.8 para la pureza, lo que significa que existe contaminación por proteínas o fenol, aun así, las muestra no presentaron dificultades para su estudio y se ajustaron correctamente a la reacción.

Tabla 14. Concentración y pureza de muestras de ADN de frutos frescos.

Muestra de Mango		Relación inicial 260/280 (nm)	Concentración inicial ADN (ng/μL)	Relación final 260/280 (nm)	Concentración final ADN (ng/μL)
MF-1	Ataulfo	1.79	2859.3	1.48	120.2
MF-2	Manila	1.65	1900.3	1.48	113.4
MF-3	Paraíso	1.64	1502.2	1.49	90.4
MF-4	Ataulfo mini	1.54	918.7	1.45	88
MF-5	Ataulfo	1.44	1976	1.39	101.6
MF-6	Manila	1.67	3078.1	1.49	117.6
MF-7	Paraíso	1.83	3540.7	1.48	59.2
MF-8	Ataulfo	1.57	1740.2	1.49	114.4
MF-9	Manila	1.67	1317.6	1.50	88.7
MF-10	Ataulfo mini	1.65	942.5	1.56	105.7

Las concentraciones registradas van de 918.7 – 3540.7 ng/μL, sin embargo, para poder utilizarlas en la PCR fue necesario realizar una dilución con agua libre de nucleasas (anexo 1). Se realizaron los cálculos de tal manera que las muestras quedaran a una concentración aproximada de 70 ng/μL, dejando así valores de concentración final de entre 88 – 117.6 ng/μL.

En la figura 21 se muestran los amplificados esperados de 203 pb correspondientes para mango. En el primer carril se colocó el marcador de peso molecular (MP) de 100 pb, en el segundo carril se cargó la muestra correspondiente al control negativo, después se colocó el control positivo para mango, en cuanto al cuarto carril marcado como (MF1) se colocó la muestra de ADN de mango Ataulfo de Wal-Mart en Tlalnepantla, posterior a este se cargó la muestra de mango Manila de Wal-Mart en Tlalnepantla marcado como (MF2), en el sexto carril se agregó la muestra de mango Paraíso de Wal-Mart en Tlalnepantla marcado como (MF3), en el séptimo carril marcado como (MF4) la muestra de mango Ataulfo mini del mercado de San Juan en

CDMX y en el carril marcado como (MF5) la muestra de mango Ataulfo del mercado de San Juan en CDMX.

Se denotan bandas de amplificadas intensas, lo que representa que la reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo exitosamente y en las concentraciones adecuadas. Se comprueba que no existe contaminación en la prueba, ya que no hay presencia de amplificadas en la banda correspondiente al control negativo (B), por lo que los resultados son confiables.

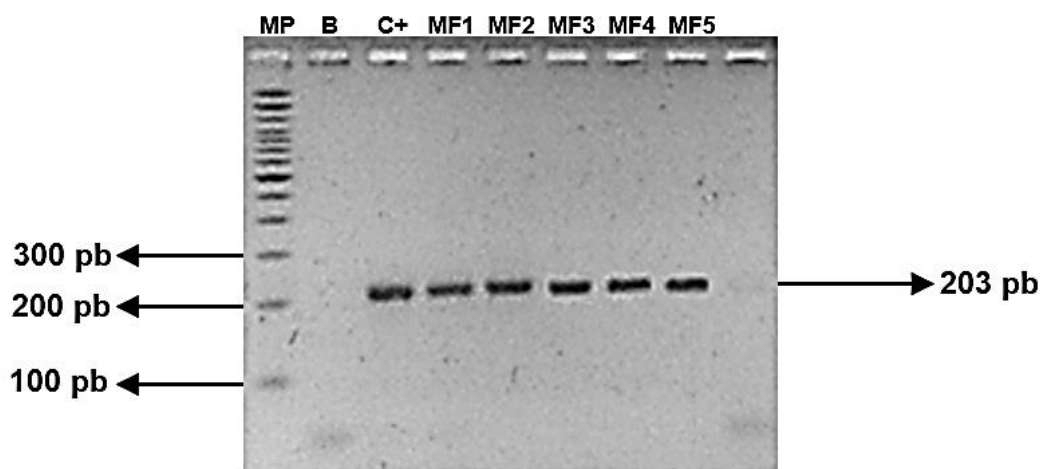


Figura 21. Gel de agarosa al 3% a 60 V, para la identificación de mango en frutos fresco por PCR. (MP) marcador de peso molecular 100 pb, (B) blanco, (C+) control positivo para mango, (MF1) mango Ataulfo, (MF2) mango Manila, (MF3) mango Paraíso, (MF4) mango Ataulfo mini, (MF5) mango Ataulfo.

En la figura 22 se observan las últimas cinco muestras: (MF6) mango Manila en el mercado de San Juan en la CDMX, (MF7) mango Paraíso en el mercado de San Juan en la CDMX, (MF8) mango Ataulfo en la mega soriana de Atizapán de Zaragoza, (MF9) mango Manila en un puesto ambulante de Buenavista en la CDMX y (MF10) mango Ataulfo mini en el Zorro abarrotero de Cuautitlán Izcalli. Se destaca el amplificado correspondiente a 203 pb para mango, el control positivo amplificó de manera destacada demostrando que los primers amplificaron de manera

adecuada en la zona de interés correspondiente. No se observan amplificados en los carriles destinados al control negativo (B), por lo que se asegura que las reacciones se encuentran libres de contaminación y los resultados son confiables.

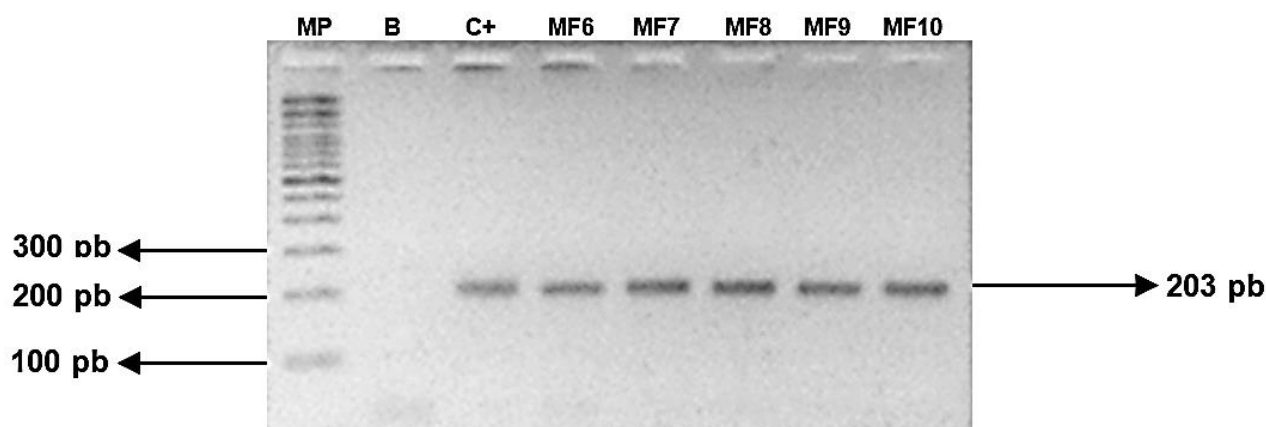


Figura 22. Gel de agarosa al 3% a 60 V, para la identificación de mango en frutos fresco por PCR. (MP) marcador de peso molecular 100 pb, (B) blanco, (C+) control positivo para mango, (MF6) mango Manila, (MF7) mango Paraíso, (MF8) mango Ataulfo, (MF9) mango Manila, (MF10) mango Ataulfo mini.

➤ Identificación de mango en productos procesados

En la tabla 15 se observan las concentraciones y pureza resultantes de la cuantificación de ADN, la relación 260/280 (nm) inicial que se obtuvo se encuentra entre 1.60 – 1.90 teniendo para el caso de MP-2, MP-3, MP-5, MP-6, MP-8 y MP-10 los valores de 1.74, 1.65, 1.60, 1.73, 1.71 y 1.62 respectivamente, lo que significa que existe contaminación por proteínas o fenol en las muestras, derivado de que no se alcanzó el ideal 1.80 para esta relación; sin embargo las muestra no presentaron dificultades para su estudio. Del mismo modo las muestras MP-1, MP-4, MP-7 y MP-9 presentaron valores ideales y por encima de 1.80 para esta relación, por lo que se ajustaron correctamente a la reacción.

Tabla 15. Concentración y pureza de muestras de ADN de productos comerciales que contienen mango.

Muestra		Relación inicial 260/280 (nm)	Concentración inicial ADN (ng/μL)	Relación final 260/280 (nm)	Concentración final ADN (ng/μL)
MP-1	Topping de frutas	1.96	3464.4	1.54	165.8
MP-2	Mango congelado	1.74	1079.0	1.55	145.5
MP-3	Néctar de mango	1.65	1090.9	1.53	94.3
MP-4	Vinagreta de mango	1.85	2842.9	1.60	145.3
MP-5	Aderezo mango thai	1.60	1051.7	1.61	73.1
MP-6	Mango deshidratado	1.73	1686.2	1.60	192.6
MP-7	Salsa de mango	1.83	2784.5	1.57	127.9
MP-8	Mermelada de mango	1.71	2556.9	1.58	116.3
MP-9	Calpico de mango	1.82	359.6	1.56	62.8
MP-10	Soda de mango	1.62	807.1	1.55	80.2

Las concentraciones registradas van de 359.6 – 3464.4 ng/μL, sin embargo, para poder utilizarlas en la PCR fue necesario realizar una dilución con agua libre de nucleasas (anexo 1). Se realizaron los cálculos de tal manera que las muestras quedaran a una concentración aproximada de 70 ng/μL.

En la figura 23 se muestran los amplificados esperados de 203 pb correspondientes a mango. En el primer carril se colocó el marcador de peso molecular (MP) de 100 pb, en el segundo carril se cargó la muestra correspondiente al control negativo, después de colocó el control positivo para mango, en cuanto al cuarto carril marcado como (MP1) se colocó la muestra de ADN de topping de frutas, posterior a este se cargó la muestra de mango congelado marcado

como (MP2) y finalmente en el sexto carril se agregó la muestra de néctar de mango orgánico marcado como (MP3), en donde a pesar de que la intensidad del amplificado es más tenue, la concentración de ADN fue suficiente para lograr la reacción. Se comprueba que no existe contaminación en la prueba, ya que no hay presencia de amplificados en la banda correspondiente al control negativo (B), por lo que los resultados son confiables.

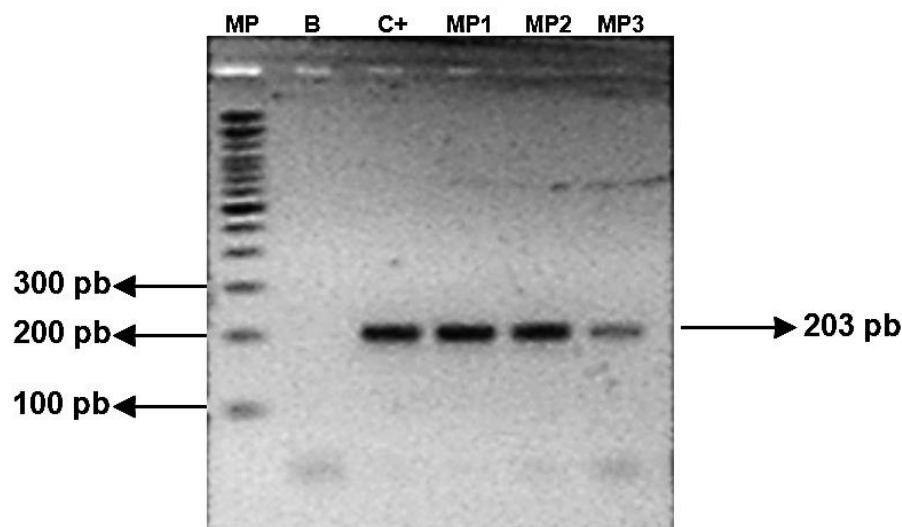


Figura 23. Gel de agarosa al 3% a 60 V, para la identificación de mango en productos procesados por PCR. (MP) marcador de peso molecular 100 pb, (B) blanco, (C+) control positivo para mango, (MP1) Topping de frutas, (MP2) Mango congelado, (MP3) néctar de mango orgánico.

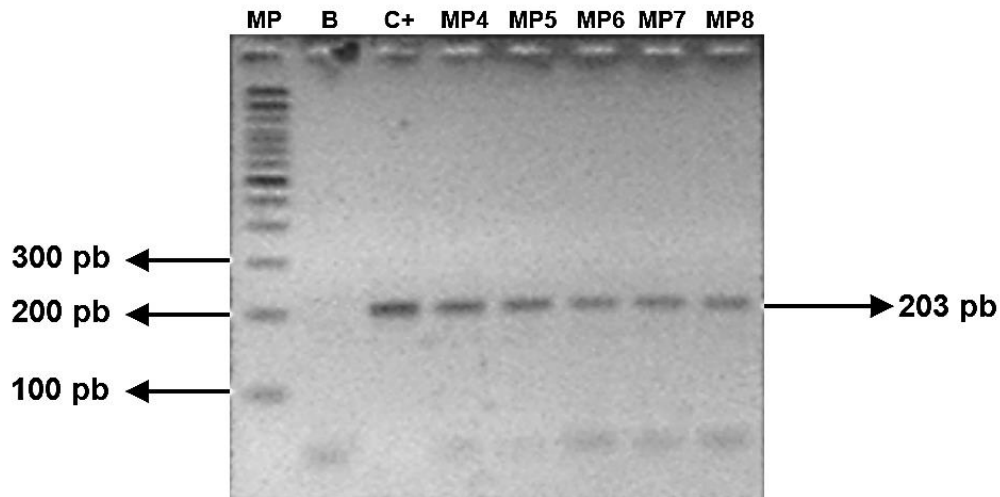


Figura 24. Gel de agarosa al 3% a 60 V, para la identificación de mango en productos procesados por PCR. (MP) marcador de peso molecular 100 pb, (B) blanco, (C+) control positivo para mango, (MP4) vinagreta de mango, (MP5) aderezo de mango thai, (MP6) mango deshidratado, (MP7) salsa de mango y (MP8) mermelada de mango.

Como se observa en las figuras 24 y 25 se muestran las 7 muestras restantes con las que se trabajó: vinagreta de mango (MP4), aderezo de mango thai (MP5), mango deshidratado (MP6), salsa de mango (MP7), mermelada de mango (MP8), calpico de mango (MP9) y soda de mango (MP10). Se puede ver que todas las muestras tienen un amplificado de 203 pb como se esperaba, demostrando que los productos realmente contienen una porción del fruto de mango. En el pocillo (C+) se colocaron muestras de ADN de mango fresco para verificar que la PCR se efectuó de manera correcta mostrando también un amplificado en ambos casos de 203 pb. No existe contaminación en las muestras al no presentar amplificadas del carril B, correspondiente al control negativo. Sin embargo, se puede notar que los amplificados resultantes son de menor intensidad con respecto al control positivo, esto puede deberse a que el ADN se vio afectado estructuralmente por la presencia de conservadores, saborizantes u

otros componentes presentes en estos, así como por el mismo proceso al que se sometió el producto.

Es importante tener en cuenta que los primers diseñados para mango resultaron específicos para la especie y por más que los productos comerciales no solo contienen mango en su composición, se puede afirmar que existe presencia de *Mangifera indica* en estos.

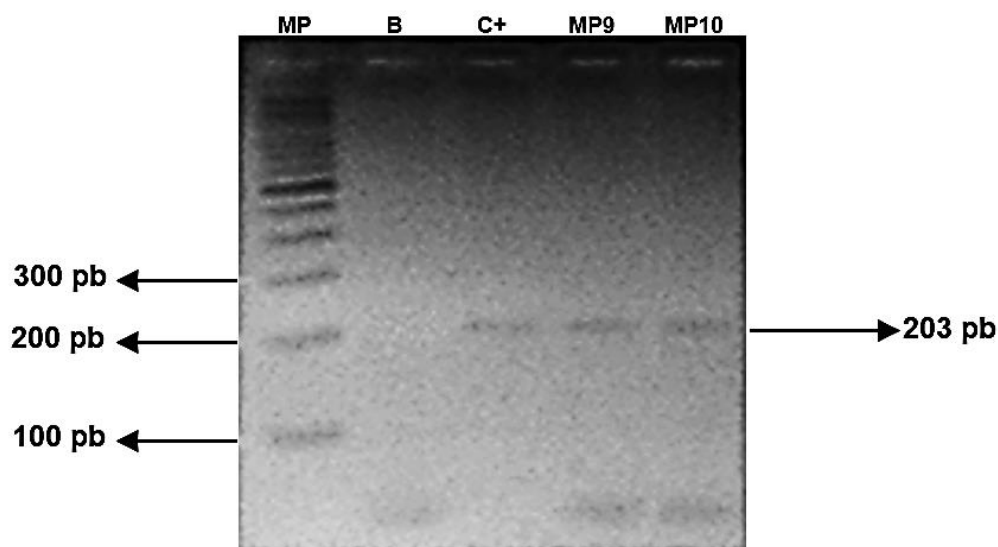


Figura 25. Gel de agarosa al 3% a 60 V, identificación de mango en productos procesados. (MP) marcador de peso molecular 100 pb, (B) blanco, (C+) control positivo para mango, (MP9) calpico de mango, (MP10) soda de mango.

Una vez que se confirmó que las muestras de productos procesados amplificaron con los primers de la especie *Mangifera indica* exitosamente y no solo contienen saborizantes u otro tipo de aditivos al respecto dentro de su composición, fue posible continuar con el análisis para determinar organismos genéticamente modificados de la especie.

3.4 Objetivo particular 4

Identificar transgénicos en las muestras de mango fresco y productos con mango que presentan el promotor CaMV35S, terminador T-nos y promotor Arabidopsis thaliana mediante PCR para determinar en qué productos se encuentra presencia de mango genéticamente modificado.

➤ **Detección del promotor CaMV35S en muestras de mango fresco.**

En la figura 26 se presentan las primeras cinco muestras de mango fresco: en el carril (MF1) mango Ataulfo de Wal-Mart en Tlalnepantla, en el carril (MF2) mango Manila de Wal-Mart en Tlalnepantla, en el carril (MF3) Mango paraíso de Wal-Mart en Tlalnepantla, en el carril (MF4) mango Ataulfo mini del mercado de San Juan en CDMX y en el carril (MF5) mango Ataulfo del mercado de San Juan en CDMX. El primer pocillo pertenece al marcador de peso molecular, el segundo al blanco, sin amplificado alguno demostrando que la reacción se realizó libre de contaminación, el tercer carril pertenece al control positivo, marcando un amplificado de 195 pb como se esperaba, en el carril marcado como MF1 perteneciente a la muestra de mango Ataulfo de Wal-Mart en Tlalnepantla se observa un tenue amplificado, corroborando que en esta muestra se utilizó el promotor CaMV35S para modificar genéticamente el mango., Se realizaron un par de repeticiones para confirmar que los amplificados fueran correctos.

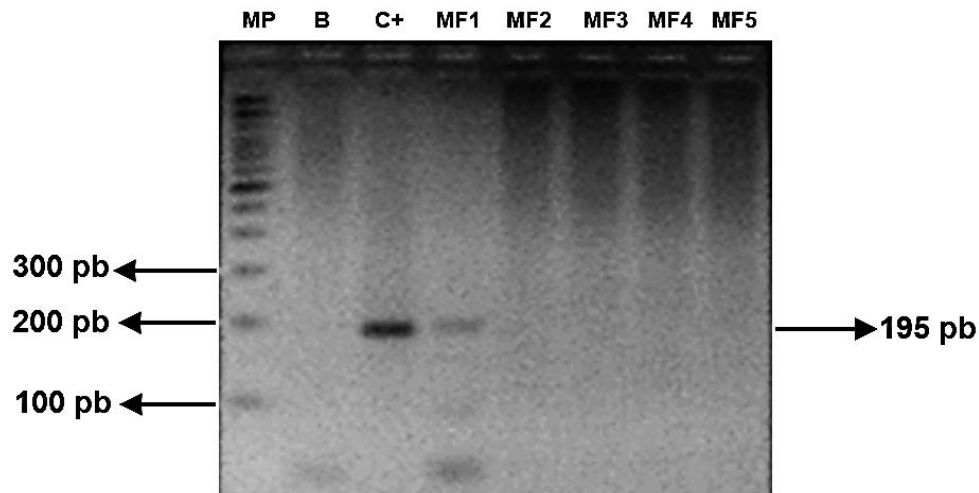


Figura 26. Gel de agarosa al 2.5% a 65V, detección del promotor CaMV35S en cinco muestras de mango fresco. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: maíz transgénico, (MF1) mango Ataulfo, (MF2) mango Manila, (MF3) Mango paraíso, (MF4) mango Ataulfo mini, (MF5) mango Ataulfo.

En la figura 27 se aprecian las cinco muestras restantes de mango fresco: en el carril (MF6) mango Manila en el mercado de San Juan en la CDMX, en el carril (MF7) mango Paraíso en el mercado de San Juan en la CDMX, en el carril (MF8) mango Ataulfo en la mega soriana de Atizapán de Zaragoza, en el carril (MF9) mango Manila en un puesto ambulante de Buenavista en la CDMX y en el carril (MF10) mango Ataulfo mini en el Zorro abarrotero de Cuautitlán Izcalli. En este caso solo se observa el amplificado correspondiente al control positivo (C+) de 195 pb que contiene el ADN de maíz transgénico con CaMV35S, indicando que estas nuevas muestras de mango no han sido modificadas con este promotor., También se puede observar que en el carril de control negativo (B) no hay ningún amplificado demostrando que la PCR se realizó correctamente sin presentar contaminación.

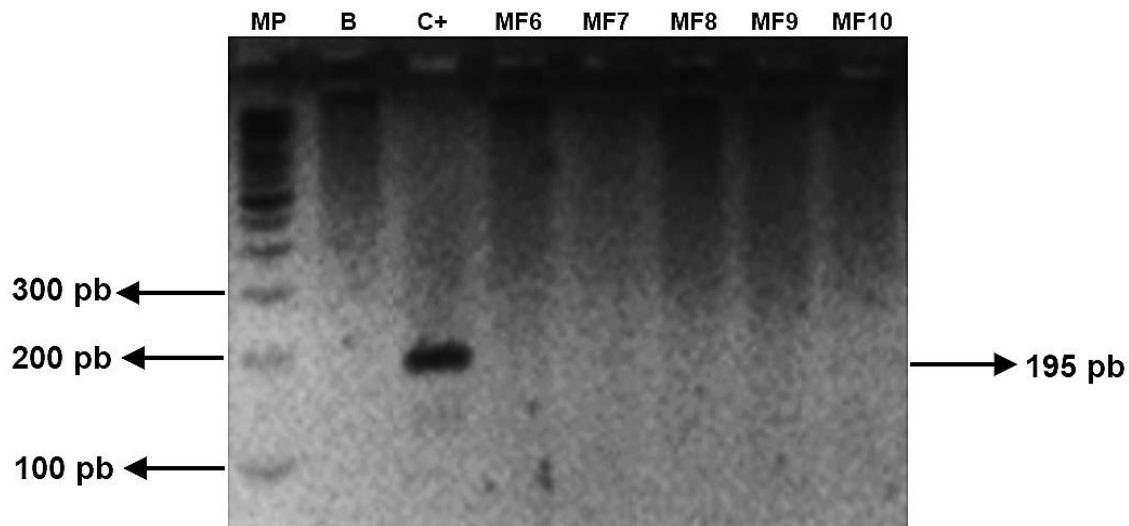


Figura 27. Gel de agarosa al 2.5% a 65V para la detección del promotor CaMV35S en cinco muestras de mango fresco. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: maíz transgénico, (MF6) mango Manila, (MF7) mango Paraíso, (MF8) mango Ataulfo, (MF9) mango Manila y (MF10) mango Ataulfo mini.

➤ Detección del promotor CaMV35S en muestras de productos procesados.

Después de realizar las pruebas de detección del promotor CaMV35S en mangos frescos se procedió a realizar el mismo procedimiento en las muestras de los productos comerciales.

Como se observa en la figura 28 se presentan los primeros cinco productos procesados de mango: topping de frutas natura planet en el carril MP1, mango congelado great value en el carril PM2, Néctar de mango orgánico campo vivo en el carril PM3, vinagreta de mango extra special en el carril PM4 y aderezo de mango thai vegeta listos en el carril PM5. Se observó que en el carril perteneciente al blanco (B) no hay fragmentos amplificados, lo que demuestra que la reacción se realizó libre de contaminación y la única banda que se amplificó pertenece al control positivo (C+) con 195 pb., En las muestras analizadas no estuvo presente el promotor CaMV35S, lo que indica que probablemente no fueron modificadas genéticamente.

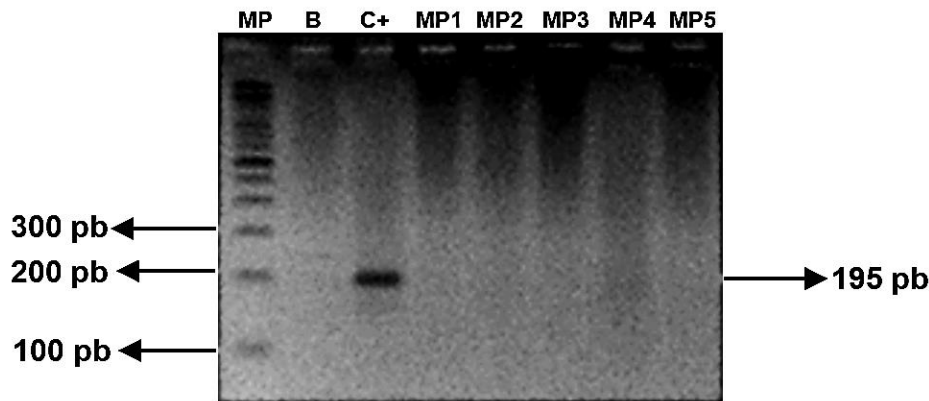


Figura 28. Gel de agarosa al 2.5% a 65V para la detección del promotor CaMV35S en cinco muestras de productos procesados. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: maíz transgénico, (MP1) topping de frutas natura planet, (MP2) mango congelado great value, (MP3) Néctar de mango orgánico campo vivo, (MP4) vinagreta de mango extra special y (MP5) aderezo de mango thai vegeta listos.

En la figura 29 se presentas los restantes cinco productos procesados de mango: mango deshidratado a granel en el carril MP6, salsa de mango la virgen en el carril MP7, mermelada de mango de la costa en el carril MP8, calpico de mango calpis MP9 y soda de mango sangil en el carril MP10.

Destacan cuatro amplificados de 195 pb, el primero correspondiente al control positivo, el cual nos indica que la reacción se llevó acabo de manera correcta, la muestra marcada como MP8 perteneciente a la mermelada de mango de la marca de la costa proveniente de México, la muestra MP9 de calpico de mango de la marca Calpis proveniente de Japón y la muestra MP10 de soda de mango de la marca Sangil proveniente de Corea; Así pues, se demuestra que el promotor CaMV35S ha sido utilizado para modificar genéticamente el mango que se utilizó para la elaboración de estos productos sin declarar que estos hayan sido modificados genéticamente según su etiqueta reportada. Al no presentar bandas de amplificación en la

muestra blanco (B) se corrobora que la reacción no presenta contaminación y se pueden confiar en los resultados.

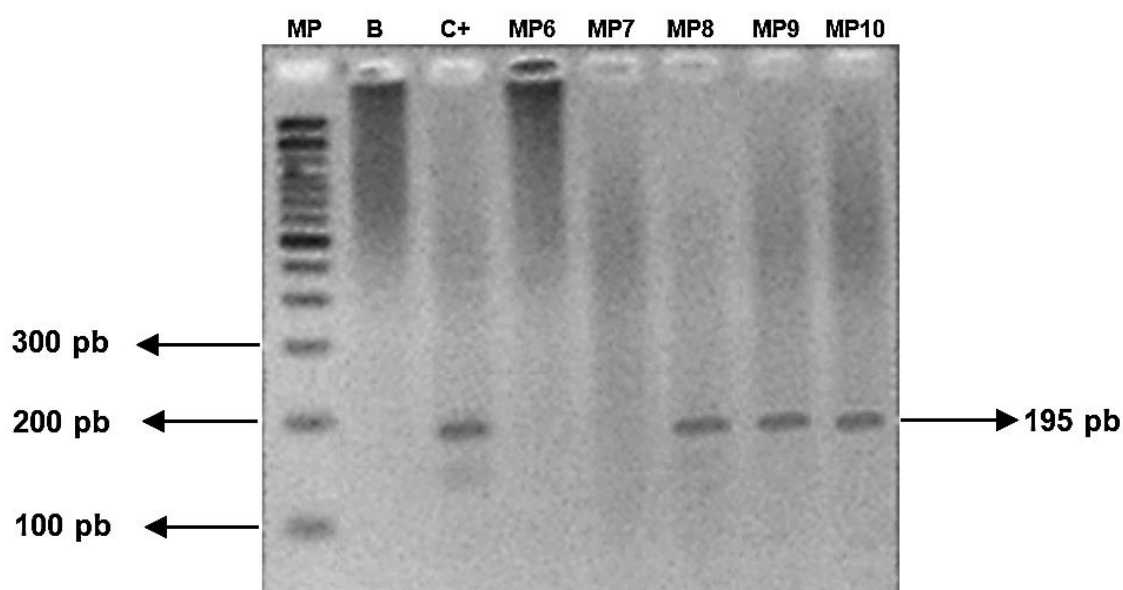


Figura 29. Gel de agarosa al 2.5% a 65V para la detección del promotor CaMV35S en cinco muestras de productos procesados. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: maíz transgénico, (MP6) mango deshidratado a granel, (MP7) salsa de mango la virgen, (MP8) mermelada de mango de la costa, (MP9) calpico de mango calpis y (MP10) soda de mango sangil.

➤ Detección del terminador T-nos en muestras de mango fresco.

Una vez evaluadas las muestras con el promotor CaMV35S se procedió a realizar el mismo tratamiento con el terminador T-nos, se utilizó como control positivo (C+) la muestra de ADN de maíz transgénico para así corroborar la existencia del material genéticamente modificado.

En la figura 30 se muestran los resultados de las muestras: (MF1) mango Ataulfo de Wal-Mart en Tlalnepantla, (MF2) mango Manila de Wal-Mart en Tlalnepantla, (MF3) Mango paraíso de Wal-Mart en Tlalnepantla, (MF4) mango Ataulfo mini del mercado de San Juan en CDMX y (MF5) mango Ataulfo del mercado de San Juan en CDMX; Mientras que en la figura 31 se

observan las últimas cinco muestras: (MF6) mango Manila en el mercado de San Juan en la CDMX, (MF7) mango Paraíso en el mercado de San Juan en la CDMX, (MF8) mango Ataulfo en la mega soriana de Atizapán de Zaragoza, (MF9) mango Manila en un puesto ambulante de Buenavista en la CDMX y (MF10) mango Ataulfo mini en el Zorro abarrotero de Cuautitlán Izcalli. Observando ambas figuras se destaca que ninguna de las 10 muestras de mango fresco analizadas presenta alguna banda de amplificación, descartando así el uso del terminador T-nos para realizar modificación genética, por otra parte, los controles positivos amplificaron de manera destacada demostrando que los primers amplificaron de manera adecuada en la zona de interés correspondiente a las 180 pb. No se observan amplificados en los carriles destinados al control negativo (B), por lo que se asegura que las reacciones se encuentran libres de contaminación y los resultados son confiables.

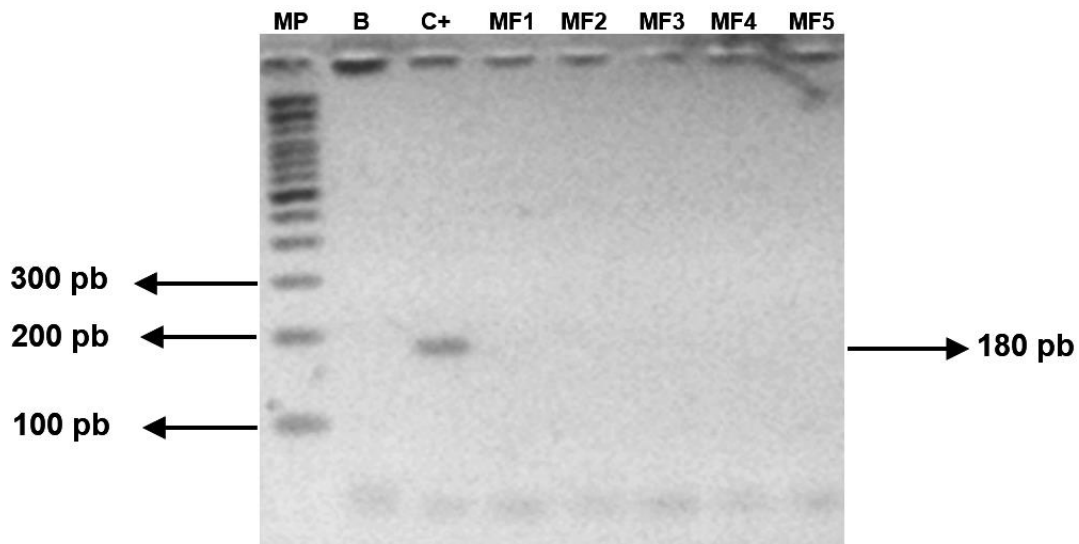


Figura 30. Gel de agarosa al 2.5% a 65V para la detección del terminador T-nos en cinco muestras de productos procesados. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: maíz transgénico, (MF1) mango Ataulfo, (MF2) mango Manila, (MF3) Mango paraíso, (MF4) mango Ataulfo mini, (MF5) mango Ataulfo.

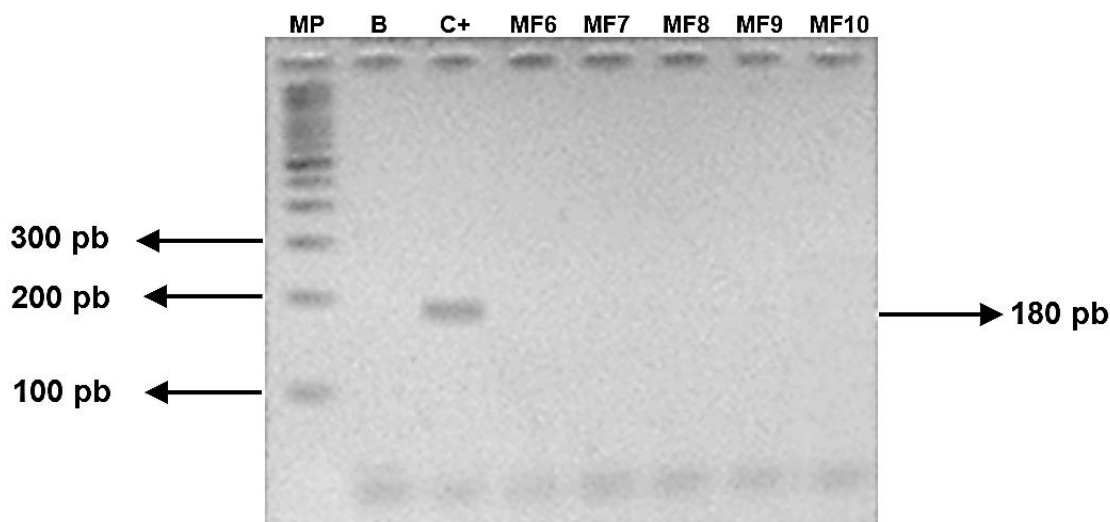


Figura 31. Gel de agarosa al 2.5% a 65V para la detección del terminador T-nos en cinco muestras de mango fresco. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: maíz transgénico, (MF6) mango Manila, (MF7) mango Paraíso, (MF8) mango Ataulfo, (MF9) mango Manila y (MF10) mango Ataulfo mini.

➤ **Detección del terminador T-nos en muestras de productos procesados.**

En las figuras 32 y 33 se muestran los geles de electroforesis realizados después de llevar a cabo la técnica de PCR a diez productos comerciales: topping de frutas natura planet en el carril MP1, mango congelado great value en el carril MP2, Néctar de mango orgánico campo vivo en el carril MP3, vinagreta de mango extra special en el carril PM4 y aderezo de mango thai vegeta listos en el carril MP5, mango deshidratado a granel en el carril MP6, salsa de mango la virgen en el carril MP7, mermelada de mango de la costa en el carril MP8, calpico de mango calpis en el carril MP9 y soda de mango sangil en el carril MP10.

Se observan los amplificadores correspondientes al control positivo (C+) de 180 pb en ambos casos demostrando que los primers han hibridado adecuadamente en la zona de interés, además que no se presentan bandas de amplificación en los carriles destinados para la muestra blanco

(B), lo que asegura que la reacción se encuentra libre de contaminación, así pues, al igual que en las muestras de mango fresco, en ninguno de los diez productos comerciales evaluados existió alguna amplificación de 180 pb, señalando que no se hizo uso del terminador T-nos en el mango que contienen estos productos, por lo que probablemente no están modificados genéticamente.

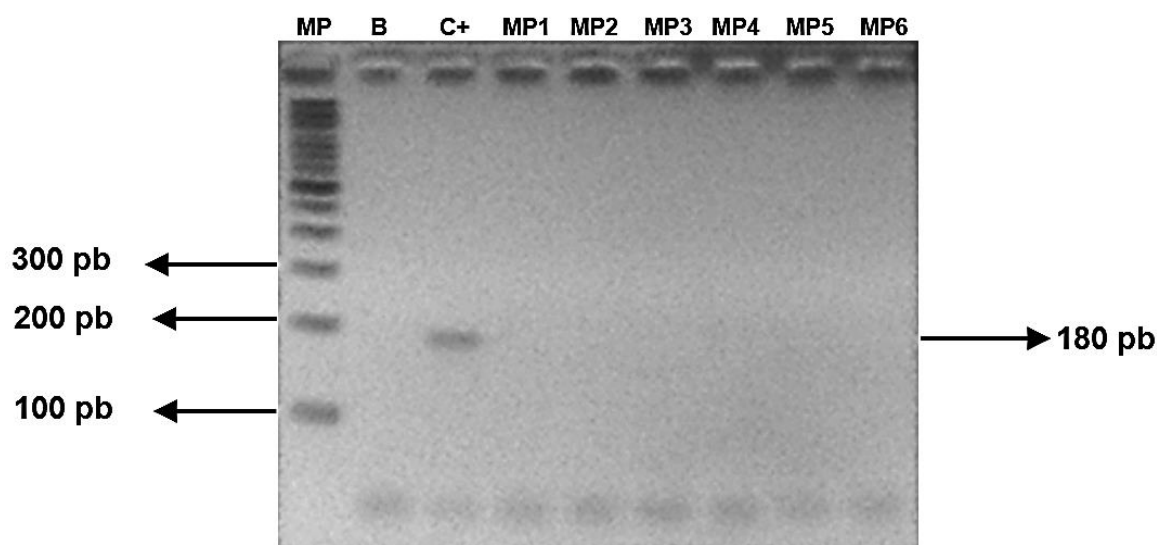


Figura 32. Gel de agarosa al 2.5% a 65V para la detección del terminador T-nos en seis muestras de productos procesados. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: maíz transgénico, (MP1) topping de frutas natura planet, (MP2) mango congelado great value, (MP3) Néctar de mango orgánico campo vivo, (MP4) vinagreta de mango extra special, (MP5) aderezo de mango thai vegeta listos y (MP6) mango deshidratado a granel.

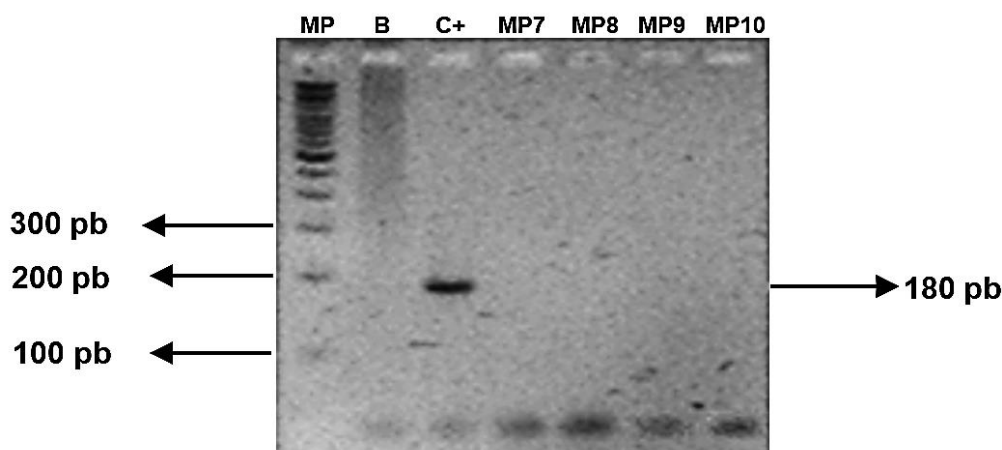


Figura 33. Gel de agarosa al 2.5% a 65V para la detección del terminador T-nos en cuatro muestras de productos procesados. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: maíz transgénico, (MP7) salsa de mango la virgen, (MP8) mermelada de mango de la costa, (MP9) calpico de mango calpis y (MP10) soda de mango sangil.

➤ **Detección del promotor *Arabidopsis thaliana* en muestras de mango fresco.**

Finalmente, para determinar la presencia o ausencia del promotor *Arabidopsis thaliana* en las muestras analizadas se realizó la PCR mediante el kit *Thermo scientific phife plant* con los primers del promotor *Arabidopsis thaliana* a las condiciones que se establecieron en la figura 12 (pág. 79), utilizando como control positivo muestras de ADN de la planta *Arabidopsis thaliana*, se evaluó el producto obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa a 1.5% y 90V y se visualizó con ayuda del transiluminador.

En la figura 34 se observa el gel de electroforesis de las primeras cinco muestras de mango fresco: mango Ataulfo en el carril MF1, mango Manila en el carril MF2, Mango paraíso en el carril MF3, mango Ataulfo mini en el carril MF4 y mango Ataulfo en el carril MF5.

En el segundo carril para la muestra blanco (B) no se encuentra ningún amplificado, demostrando que la reacción en cadena de la polimerasa se llevó acabo exitosamente y libre de contaminación; así mismo, se pueden observar dos amplificados, correspondientes al mango

Ataulfo de Wal-Mart en Tlalnepantla y al mango Ataulfo mini del mercado de San Juan en CDMX, el que hayan amplificado estas variedades indica que han sido modificadas genéticamente utilizando el promotor *Arabidopsis thaliana* para la expresión del gen insertado, destacando que se desconoce el tipo de gen insertado, se logra corroborar que el control positivo (C+) amplificó correctamente a 679 pb como era de esperarse para *Arabidopsis thaliana*.

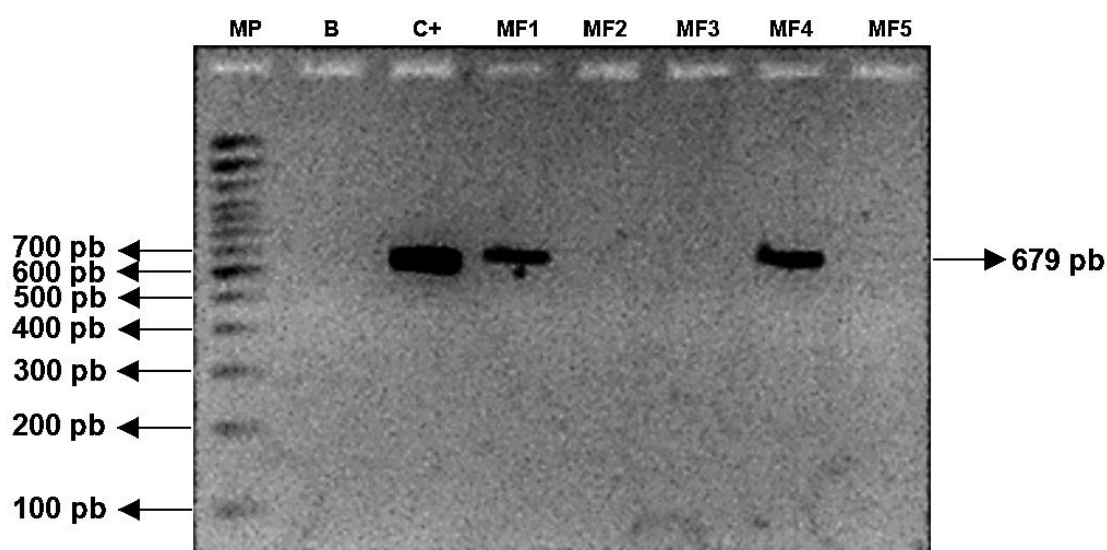


Figura 34. Gel de agarosa al 1.5% a 90V para la detección del promotor *Arabidopsis thaliana* en cinco muestras de mango fresco. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: *Arabidopsis thaliana*, (MF1) mango Ataulfo, (MF2) mango Manila, (MF3) Mango paraíso, (MF4) mango Ataulfo mini, (MF5) mango Ataulfo.

Las cinco muestras restantes de mango fresco analizadas se pueden observar en la figura 35: mango Manila en el mercado de San Juan en la CDMX en el carril MF6, mango Paraíso en el mercado de San Juan en la CDMX en el carril MF7, mango Ataulfo en la mega soriana de Atizapán de Zaragoza en el carril MF8, mango Manila en un puesto ambulante de Buenavista en la CDMX en el carril MF9 y mango Ataulfo mini en el Zorro abarrotero de Cuautitlán Izcalli en el carril MF10. En este caso, únicamente se observa el amplificado perteneciente al control

positivo (C+) de 679 pb como se esperaba, el carril (B) se encuentra libre de bandas de amplificación, lo que nos indica que no existe contaminación en las muestras y que la reacción se realizó adecuadamente.

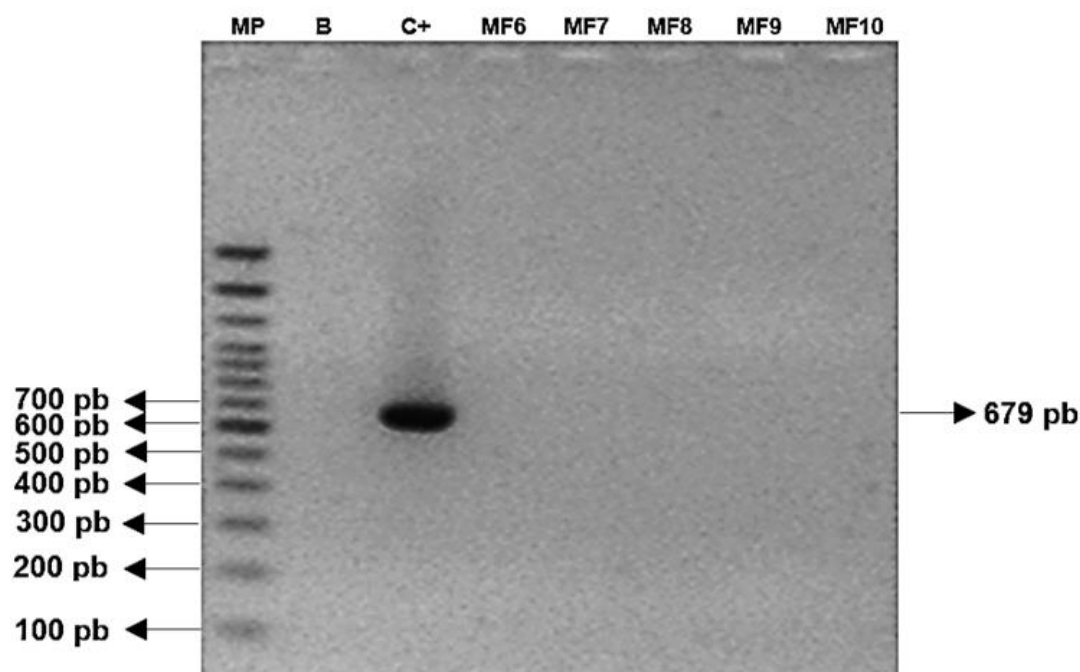


Figura 35. Gel de agarosa al 1.5% a 90V para la detección del promotor *Arabidopsis thaliana* en cinco muestras de mango fresco. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: *Arabidopsis thaliana*, (MF6) mango Manila, (MF7) mango Paraíso, (MF8) mango Ataulfo, (MF9) mango Manila y (MF10) mango Ataulfo.

➤ **Detección del promotor *Arabidopsis thaliana* en muestras de productos procesados.**

Para finalizar se detectó la presencia del promotor *Arabidopsis thaliana* en las muestras de ADN de los productos comerciales que contienen mango en su composición, en la figura 36 se muestran las primeras 5 muestras analizadas: topping de frutas natura planet en el carril MP1, mango congelado great value en el carril MP2, Néctar de mango orgánico campo vivo en el carril MP3, vinagreta de mango extra special en el carril MP4 y aderezo de mango thai vegeta

listos en el carril MP5. En este caso únicamente se destaca el amplificado correspondiente a la muestra del control positivo (C+) de 679 pb para *Arabidopsis thaliana*, así mismo, observando el segundo carril perteneciente al control negativo (B) se verifica que no hay presencia de amplificados, lo que significa que la reacción no fue contaminada y se llevó a cabo correctamente. En las muestras analizadas de los productos con mango no se detectó que fueran modificadas genéticamente con este promotor

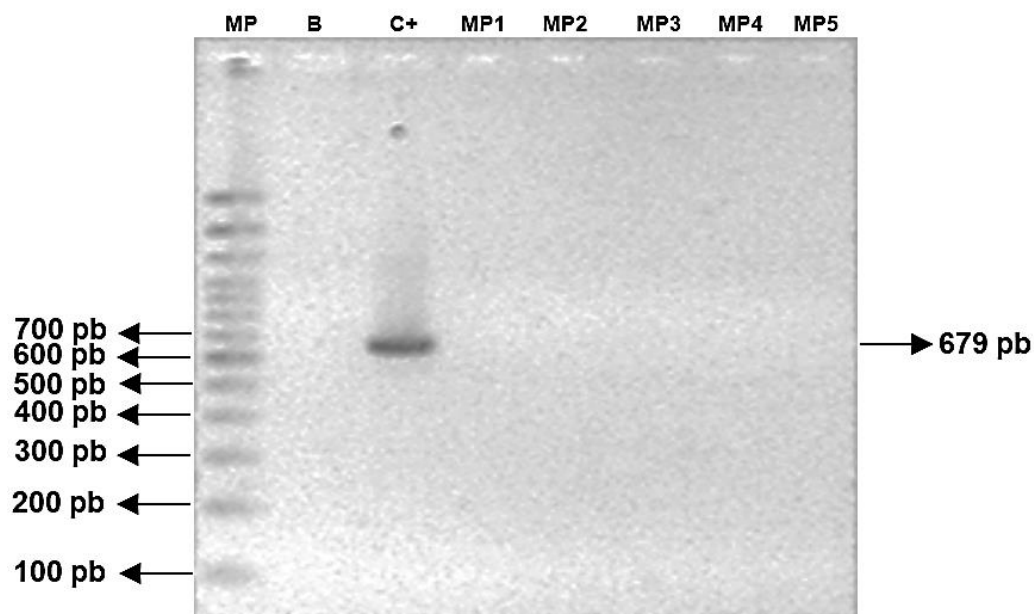


Figura 36. Gel de agarosa al 1.5% a 90V para la detección del promotor *Arabidopsis thaliana* en cinco muestras de productos procesados. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: *Arabidopsis thaliana*, (MP1) topping de frutas natura planet, (MP2) mango congelado great value, (MP3) Néctar de mango orgánico campo vivo, (MP4) vinagreta de mango extra special y (MP5) aderezo de mango thai vegeta listos.

Las cinco muestras restantes se observan en la figura 37: mango deshidratado a granel en el carril MP6, salsa de mango la virgen en el carril MP7, mermelada de mango de la costa en el carril MP8, calpico de mango calpis en el carril MP9 y soda de mango sangil en el carril MP10. No se encontraron bandas de amplificación para el promotor *Arabidopsis thaliana*, solo se

logra detectar la banda de amplificado del control positivo (C+) de 679 pb. La PCR para detectar el promotor *Arabidopsis thaliana* se considera que se realizó con éxito y se puede tener seguridad de la misma debido a que el carril (B) designado para el control negativo o blanco no muestra presencia de amplificado alguno.

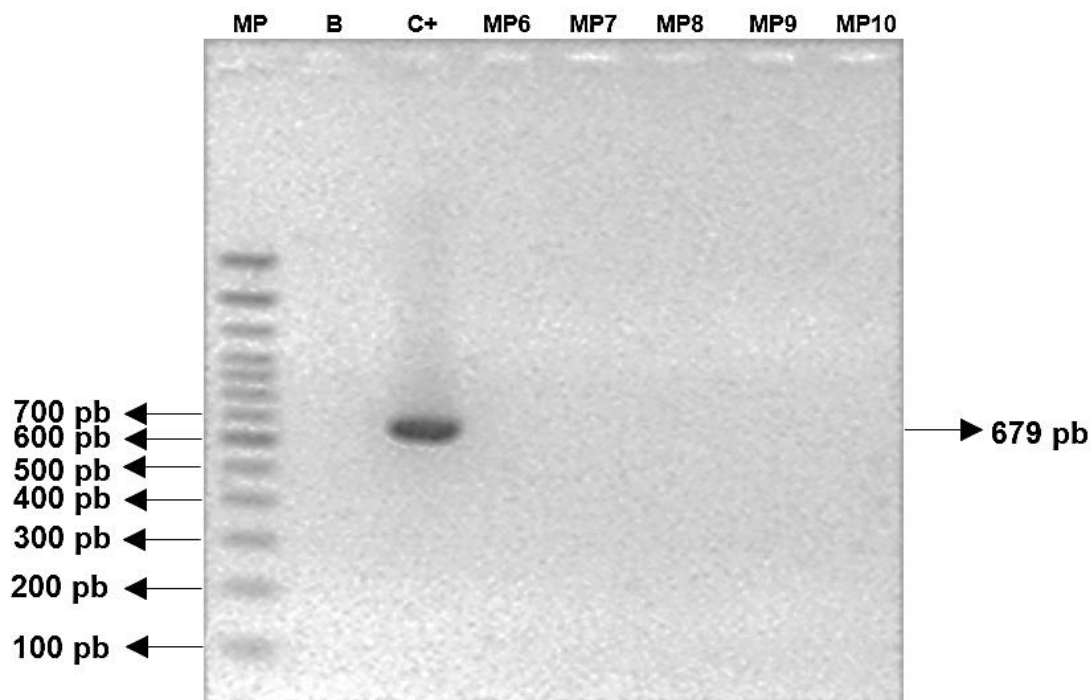


Figura 37. Gel de agarosa al 1.5% a 90V para la detección del promotor *Arabidopsis thaliana* en cinco muestras de productos procesados. (MP) marcador de peso molecular 100pb, (B) blanco, (C+) control positivo: *Arabidopsis thaliana*, (MP6) mango deshidratado a granel, (MP7) salsa de mango la virgen, (MP8) mermelada de mango de la costa, (MP9) calpico de mango calpis y (MP10) soda de mango sangil.

Finalmente, en los recuadros 16 y 17 se muestra un resumen de los resultados obtenidos para la presencia y/o ausencia de los transgenes CaMV35S, T-nos y *Arabidopsis thaliana* en las muestras de mango fresco y en las muestras de los productos procesados.

Tabla 16. Resumen de resultados de la detección de OGM en mango fresco.

Nomenclatura	Muestra de Mango	CaMV35S	T-nos	<i>Arabidopsis thaliana</i>
MF-1	Ataulfo Wal-Mart Tlalnepantla	✓	×	✓
MF-2	Manila Wal-Mart Tlalnepantla	×	×	×
MF-3	Paraíso Wal-Mart Tlalnepantla	×	×	×
MF-4	Ataulfo mini mercado de San Juan CDMX	×	×	✓
MF-5	Ataulfo mercado de San Juan CDMX	×	×	×
MF-6	Manila mercado de San Juan CDMX	×	×	×
MF-7	Paraíso mercado de San Juan CDMX	×	×	×
MF-8	Ataulfo mega soriana Atizapán de Zaragoza	×	×	×
MF-9	Manila puesto ambulante Buenavista CDMX	×	×	×
MF-10	Ataulfo mini Zorro abarrotero Cuautitlán Izcalli	×	×	×

Tabla 17. Resumen de resultados de la detección de OGM en productos comerciales que contienen mango.

Nomenclatura	Muestra	CaMV35S	T-nos	<i>Arabidopsis thaliana</i>
MP-1	Topping de frutas	×	×	×
MP-2	Mango congelado	×	×	×
MP-3	Néctar orgánico	×	×	×
MP-4	Vinagreta	×	×	×
MP-5	Aderezo	×	×	×
MP-6	Mango deshidratado	×	×	×
MP-7	Salsa	×	×	×
MP-8	Mermelada	✓	×	×
MP-9	Calpico	✓	×	×
MP-10	Soda	✓	×	×

Conclusión

La pareja de primers diseñados para la especie de *Mangifera indica* se realizó exitosamente. Se logró amplificar experimentalmente la zona de interés de cada muestra de mango, obteniendo amplificadores de 203 pb.

Los primers para mango fueron específicos para detectar la especie *Mangifera indica*, así como los primers seleccionados para los promotores CaMV35S, *Arabidopsis thaliana* y el terminador T-nos fueron específicos para amplificar organismos genéticamente modificados.

Las diez muestras de productos procesados analizados tenían mango y con los primers diseñados para *Mangifera indica* se lograron amplificadores esperados de 203 pares de bases.

La detección de organismos genéticamente modificados (OGM) fue adecuada, debido a que se encontraron fragmentos de ADN del promotor CaMV35S, indicando una manipulación genética en una de las muestras de mango fresco procedente de México y en tres de las muestras de productos comerciales procedentes de la mermelada de mango de la marca la costa, calpico de mango de la marca calpis y la soda de mango de la marca sangil. Así mismo se encontraron amplificadores de fragmentos de ADN del promotor *Arabidopsis thaliana* para dos de las muestras de mango fresco de la variedad Ataulfo.

No se observaron amplificadores en ninguna de las veinte muestras analizadas para la detección del terminador T-nos. Se demuestra que no siempre se utiliza esta combinación promotor-terminador y que el uso de estas herramientas para la tecnología del ADN recombinante es diverso y cada vez más extenso, por lo que no se puede descartar la posibilidad de que alguna de las muestras implicadas en el proyecto que no amplificaron para los promotores y terminador aquí evaluados esté libre de ser un OGM.

México al ser el principal país exportador de estos frutos necesita regularizar y aplicar vigorosamente la normatividad, ya que por el momento solo se encuentra en vigencia la NOM-

001-SAG/BIO-2014, la cual pretende establecer las especificaciones generales que debe cumplir el etiquetado de organismos genéticamente modificados que sean semillas o material vegetativo destinados a siembra, cultivo y producción agrícola; en apego a los principios, objetivos y preceptos mandados por la Ley.

La ley de Bioseguridad de organismos genéticamente modificados (LBOGM) se encarga de regular las actividades de utilización de OMG, con este trabajo de investigación se puede determinar que actualmente en México se comercializan productos que han sido modificados genéticamente para conferirles alguna característica sin mostrar una etiqueta en donde de indique su presencia, por lo que los consumidores mexicanos no tienen la posibilidad de elegir la adquisición de tales productos o no.

Finalmente se puede destacar que todavía no existe alguna regulación oficial que demande a las industrias el etiquetado correspondiente de alimentos elaborados o generados a partir de OGM destinados específicamente a consumo animal o humano.

Referencias

- Acevedo, G. F. (2009). La bioseguridad en México y los organismos genéticamente modificados: cómo enfrentar. *Capital natural de México*, México.
- Altieri, M. A. (1999). Riesgos ambientales de los cultivos transgénicos: una evaluación agroecológica. *Red, Gestión de Recursos Naturales*, México.
- AMGEM. (14 de marzo de 2016). *Khan Academy*. Recuperado de Khan Academy: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
- Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H., y van den Eede, G. (2012). Analytical methods for detection and determination of genetically modified organism in agricultural crops and plant derived food products. *European Food Research and Technology*. 214(1), 3-26. Doi.org/10.1007/s002170100415
- Barragan, L. L. (2017). *Detección de trigo (Triticum ssp) en granos y productos comerciales, mediante la PCR*. UNAM, México.
- Camacho, S. N. (2007). *Caracterización y expresión del gen del receptor de etileno ERS1 en distintas etapas de desarrollo de mango (Mangifera indica L.)*. Centro de investigación en Alimentos y Desarrollo, México.
- Cárdenas, N. L. (2011). Detección y ensayo de los organismos genéticamente modificados. *Revista Cubana Aliment Nutr.* 21(2), 293-302.
- Castro, S. G., y Zinn, R. (11 de abril de 2001). Los transgénicos en México, empresas, marcas y productos. Recuperado de Otros mundos chiapas.org: <http://otrosmundoschiapas.org/analisis/LOSDUCTOS.pdf>
- Chispeels, J. M., y Savada, E. D. (2013). *Plant, genes and crop biotechnology*. ASPD Education Foundation, EEUU.
- CNUCED. (2016). Mango. *Perfil de INFOCOMM*, 26. Recuperado de https://unctad.org/es/PublicationsLibrary/INFOCOMM_cp07_Mango_es.pdf
- CONABIO. (14 de Septiembre de 2007). *CONABIO.gob.mx*. Obtenido de CONABIO.gob.mx: <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/doctos/preguntas.html>
- CONACYT. (25 de marzo de 2014). *CIBIOGEM*. Recuperado de Transgénicos, preguntas: <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/cibiogem/preguntas-frecuentes>
- Conocer la agricultura y la ganadería.com. (3 de abril de 2015). *Conocer la agricultura y la ganadería*. Recuperado de Conocer la agricultura y la ganadería.: <http://www.conocerlaagricultura.com/2015/04/cuales-son-los-principales-cultivos.html>
- Cultek. (19 de agosto de 2009). *Cultek, Tecnología del ADN recombinante*. Recuperado de Cultek: <https://www.cultek.com/index.php/molecular.html>



- Ecologitas en acción.org. (10 de 12 de 2010). *Ecologistas en acción*. Recuperdo de Ecologistas en acción: <https://www.ecologistasenaccion.org/?p=3175>
- Feldman, M., Morris, M., y Hoisington., D. (2000). ¿Por qué suscitan tanta polemica los OGM?. CIMMYT, México.
- Fresh Plaza. (5 de enero de 2018). *Fresh Plaza.es.2018*. Recuperado de Plaza.es.2018:<http://www.freshplaza.es/article/112600/Resumen-del-mercado-global-del-mango/>
- García Préchac, F., Ernst, O., Arbeletche, P., Bidegain, M. P., Pritsch, C., Ferenczi, A., y Rivas, M. (2010). Intensificación agrícola: Oportunidades y Amenazas para un país productivo y natural. *Colección CSIC*, Uruguay.
- Gimenez, M. L., García, M. V., y Mallorquín, P. (2003). *Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria, Informe de vigilancia tecnológica*, GENOMA. España.
- Green, R. M., y Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning, a laboratory manual*, CSH Press.EE,UU.
- Griffiths, K., Partis, L., Croan, D., Wang, N., y Emslie, K. R. (2012). *Review of technologies for detecting genetically modified materials in commodities and food*, Australian Government Department of Agriculture Fisheries & Forestry. Australia.
- Houpe, S. (2011). Transgenicos:¿Dónde estamos y adónde vamos?, Recuperado de *La jornada ecológica*: <https://www.jornada.com.mx/2001/05/29/eco-b.html>
- Holst, J. A., De Loose, M., y Van den, E. G. (2008). Coherence between legal requirements and approaches for detection of genetically modified organisms (GMOs) and their derived products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(8), 2799-2809.Doi.org/10.1021/jf052849a
- Holst-Jensen, A., Ronning, S., Lovseth, A., y Berdal, K. (2013). PCR techology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, EEUU.
- INEGI. (2007). *Censo agropecuario, mango*. México, Recuperado de D.R INEGI: <https://www.inegi.org.mx/programas/ena/2017>.
- İrem Karamollaoğlu, H. A. (2009). Biosensor de ADN basado en QCM para la detección de organismos genéticamente modificados (OGM). *Revista de Ingeniería Bioquímica*, 44(3),142-150. Doi.org/10.1016/j.bej.2018.11.011
- Journal Of Visualized Experiments. . (23 de 10 de 2014). *Sociedad para la inmunología de la mucosa*. Recuperado de Métodos básicos en biología celular y molecular: PCR: <http://www.socmucimm.org/pcr-polymerase-chain-reaction/>
- Levitus, G. (18 de Marzo. de 2008). *ArgenBio*. Recuperado de ArgenBio: <http://www.argenbio.org/index.php?action=alimentos&opt=6>

- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hoop, E., y Mroginski, L. (2008). *Biotechnología y mejoramiento vegetal II*. INTA, Argentina.
- López, M., Mallorquin, P., y Vega, M. (2003). *Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria*, CIBT-FGUAM, España.
- Mason, G., Provero, P., Vaira, A. M., y Accotto, G. P. (2002). Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR., 20(2). Recuperado de BMC biotechnology: <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-2-20>
- Meran, K. E., Kamani, H. T., y Sameera, R. S. (2017). Una revisión sobre aplicaciones etnofarmacológicas, actividades farmacológicas y compuestos bioactivos de *Mangifera indica* (Mango). *Evidence based complementary and alternative medicine*: Doi.org/10.1155/2017/6949835.
- Milani, S. R. (14 de septiembre de 2014). UNESCO. Recuperado de UNESCO: <http://unesdoc.unesco.org/images/0012/001246/124623s.pdf>
- Monroy, Laguna. Aideht. Diana. (2018). Identificación de fresa (*Fragaria x ananassa*) genéticamente modificada en productos frescos y comerciales en México mediante PCR, UNAM. México.
- Moreno, Á., León, F. D., Giraldo, A. G., y Ríos, E. (2010). Análisis del perfil de compuestos volátiles del mango (*Mangifera indica* L. Var. Tommy Atkins) tratado por métodos combinados. *Rev. colomb. quim.*, 39(1), 61-72. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-28042010000100005&script=sci_abstract&tlng=en
- Ortega, M. G., Rubio, C. E., y López, G. J. (2013). *Biotechnología y Alimentación*. UNED, España.
- Markoulatos, P., Siajakas, N., Papathoma, A., Nerantzis, E., Betzios, B., Dourtoglou, V., y Moncany, M. (2004). Qualitative and Quantitative Detection of Protein and Genetic Traits in Genetically Modified Food. *Food Reviews International*, 20(3), 275-396. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/255615547_Qualitative_and_Quantitative_Detection_of_Protein_and_Genetic_Traits_in_Genetically_Modified_Food
- Parrotta, J. A. (1993). *Mangifera indica* L. Mango. *Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station*. Recuperado de: <http://www.fozli.com/ebook/Mango-foreign.pdf>.
- Pierce, A. B. (2009). *Genetica, Un enfoque conceptual*. Panamericana, España.
- Pierson, J. T., Monteith, G. R., Roberts-Thomson, S. J., Dietzgen, R., Gidley, M. J., y Shaw, P. N. (2014). Phytochemical extraction, characterisation and comparative distribution across four mango (*Mangifera indica* L.) fruit varieties. *Fud Chem*, 149(1), 253-263. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/259112981_Phytochemical_extracti

- on_characterisation_and_comparative_distribution_across_four_mango_Mangifera_indica_L_fruit_varieties.
- Querci, M., Van Den Bulcke, M., Zel, J., Van Den, E. G., & Broll, H. (2010). Nuevos enfoques en la detección de OGM. *Química analítica y Bioanalítica*. México.
- Rivera, D. M. (2006). La biotecnología en plantas y aspectos biotecnológicos del mango. *Interciencia*, México.
- Rivera, D. M., Astorga, C. K., y Vallejo, R. (2011). Embriones Transgenicos de Mango (*Mangifera indica*) cv. Ataulfo con el gen de la defensina J1. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 78(29), Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v29n1/v29n1a10.pdf>
- Robinson, C. (2011). *Alimentos y tecnología de modificación genética salud y seguridad en el consumidor*. ILSI Europe: Bruselas.
- Rodriguez, R. P., y Gonzales, R. O. (2007). Plantas transgenicas: Una revisión de los principales cultivos básicos en México. *e-Genosis*, México.
- SAGARPA. (14 de diciembre de 2014). Especificaciones generales de etiquetado de organismos genéticamente modificados que sean semillas o material vegetativo destinados a siembra, cultivo y producción agrícola. *NORMA Oficial Mexicana NOM-001-SAG/BIO-2014*. Distrito Federal., Distrito Federal., México: SEGOB.
- SAGARPA. (2017). *Planeación agrícola nacional, Mango mexicano*. México: D.R SAGARPA. Recuperado de: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257078/Potencial-Mango.pdf>
- Sánchez, C. M. (2003). Biotecnología, ventajas y desventajas para la agricultura. *UDO Agrícola*, Venezuela. 3(1), 1-11. Recuperado de: <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-udo-agricola/articulo/biotecnologia-ventajas-y-desventajas-para-la-agricultura>.
- SENASICA. (5 de abril de 2016). *gob.mx*. Recuperado de *gob.mx*: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/regulacion-internacional-de-ogm>
- Shah K, A., Patel, M. ., Patel, J. R., y Parmar P, K. (2010). *Mangifera Indica L. pharmacognosy review*, 4(7), 42-48. Doi.org/10.4103/0973-7847.65325
- Siari, N. C. (14 de diciembre de 2012). *Apuntes de fisiología vegetal*. Obtenido de *Apuntes de fisiología vegetal*. Recuperado de: <http://fisiolvegetal.blogspot.com/2012/12/metodos-de-transformacionfusion-de.html>
- Tagu, D., y Moussard, C. (2006). *Techniques for molecular biology*. Enfield, EEUU.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y del a PCR en tiempo real. *Investidación en discapacidad*, 2(2), 70-78. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>



- Thieman, J. W., y Palladino, A. M. (2010). *Introducción a la Biotecnología*. Pearson, España.
- Torres, R. A. (2012). Realidades de los OGM: Los organismos genéticamente modificados y sus implicaciones. *Primer foro en tecnologías de semillas*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.
- Trigo, M. C. (2009). Cultivos y alimentos transgenicos en México. El debate, los actores y las fuerzas sociopolíticas. . *Argumentos (Méx, D.F)*, 22(59),1-9. Recuperado de:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57952009000100008
- UNED. (23 de mayo de 2000). *Principios Básicos de la manipulacion genética*. Obtenido de Ingeniería Genética. Recuperado de: <http://cosmolinux.no-ip.org/uned/pcr.pdf>
- Villalobos, V. M. (2008). *Los trangenicos: Oportunidades y amenazas*. Mundi-prensa, España.
- Vincent, O. M. (1 de Mayo de 2012). *vmasseyors.blogspot*. Recuperado de El mundo del marine surveyor : <http://vmasseyors.blogspot.com/2012/05/el-mango-sus-variedades-su-transporte.html>
- Wall, M. A., Olivas, A. F., y Velderrain, R. G. (2015). El mango: aspectos agroindustriales, valor nutricional/funcional. *Nutrición Hospitalaria*, 32(1) 67-75. Doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.7701.

Anexos

1). Disolución.

Para realizar la disolución de muestras de ADN que tengan una concentración mayor a 70 ng/μL se debe considerar:

- a) Concentración 1 ng/μL
- b) μL de solución

De esta forma se calculan los μL de agua libre de nucleasas (ALN) y los μL de ADN que se deben agregar para diluir la muestra:

$$\mu\text{L de ADN} = \frac{\left(70 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}\right) (\mu\text{L de solución})}{\text{concentración } 1 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}}$$

$$\mu\text{L de ALN} = (\mu\text{L de solución}) - (\mu\text{L de ADN})$$

2). Cálculos para preparación de muestras PCR.

- A) Utilizando el kit de Master Mix.

Para realizar el cálculo de la cantidad de solución que se debe agregar a cada tubo eppendorff se ejemplifica un caso en el que se tiene cinco muestras de interés, en donde las proporciones adicionadas de cada reactivo deben ser equivalentes en cada tubo.

Total, de μL por cada componente de la PCR.

Componente	μL por muestra	No. de muestras	Total μL por agregar
Kit Master Mix	12.5	5	62.5
Primer F	0.5	5	2.5
Primer R	0.5	5	2.5
Agua L.N	10.5	5	52.5
TOTAL	----	5	120
--ADN--	--2--	----	----

Al conocer el total de μL para agregar, calculamos la cantidad que debemos agregar a cada tubo eppendorff:

$$\mu\text{L por tubo eppendorff} = \frac{\mu\text{L total}}{\text{No. muestras}} + 2 \mu\text{L de ADN}$$

$$\mu\text{L por tubo eppendorff} = \frac{120 \mu\text{L}}{5} + 2 \mu\text{L de ADN} = 26 \mu\text{L}$$

por lo cual debemos agregar 24 μL de la solución de componentes y 2 μL de ADN por cada tubo eppendorff.

B) Utilizando el Kit de PCR Directa.

Para realizar el cálculo de la cantidad de solución que se debe agregar a cada tubo eppendorff se ejemplifica un caso en el que se tiene cinco muestras de interés, en donde las proporciones adicionadas de cada reactivo deben ser equivalentes en cada tubo.

Total, de μL por cada componente de la PCR.

Componente	μL por muestra	No. de muestras	Total μL por agregar
Sol. Boffer	10	5	50
Primer F	0.5	5	2.5
Primer R	0.5	5	2.5
Agua L.N	8.1	5	40.5
Enzima	0.4	5	2
TOTAL	----	5	97.5
--ADN--	--0.5--	----	----

Al conocer el total de μL para agregar, calculamos la cantidad que debemos agregar a cada tubo eppendorff:

$$\mu\text{L por tubo eppendorff} = \frac{\mu\text{L total}}{\text{No.muestras}} + 0.5 \mu\text{L de ADN}$$

$$\mu\text{L por tubo eppendorff} = \frac{97.5 \mu\text{L}}{5} + 0.5 \mu\text{L de ADN} = 20 \mu\text{L}$$

3). Selección de primers para Mango.

Su evaluación se realizó mediante la metodología que se muestra a continuación.

1. Entrar en la página web del NCBI, seleccionar la pestaña de Nucleotide e ingresar en el buscador el nombre de la especie en estudio (*Mangifera indica L*), proseguimos a descargar el archivo en formato FASTA.

GenBank ▾

Send to: ▾

Change region shown ▾

Mangifera indica chloroplast, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_035239.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#) ▾

LOCUS NC_035239 157780 bp DNA circular PLN 14-JUL-2017
 DEFINITION Mangifera indica chloroplast, complete genome.
 ACCESSION NC_035239
 VERSION NC_035239.1
 DBLINK BioProject: [PRJNA394488](#)
 KEYWORDS RefSeq.
 SOURCE chloroplast Mangifera indica (mango)
 ORGANISM [Mangifera indica](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae;
 Pentapetalae; rosids; malvids; Sapindales; Anacardiaceae;
 Mangifera.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 157780)
 AUTHORS Rabah,S.O., Lee,C., Hajrah,N.H., Makki,R.M., Alharby,H.F.,
 Alhebshi,A.M., Sabir,J.S.M., Sabir,M.J., Jansen,R.K. and
 Ruhlman,T.A.
 TITLE Plastome sequencing of 10 non-model crop species reveals multiple
 inversions, gene transfers to the nucleus and a recent, large
 mitochondrial insertion in the tree species cashew (Anacardium,
 Anacardiaceae)

Customize view ▾

Analyze this sequence ▴[Run BLAST](#)[Pick Primers](#)[Highlight Sequence Features](#)[Find in this Sequence](#)**Related information** ▴[BioProject](#)[Protein](#)[Taxonomy](#)[Full text in PMC](#)[Gene](#)[Other INSDC Genome Sequences](#)[PubMed \(Medline\)](#)

Product Size: 203 bp Pair Any: 5.0 Pair End: 2.0

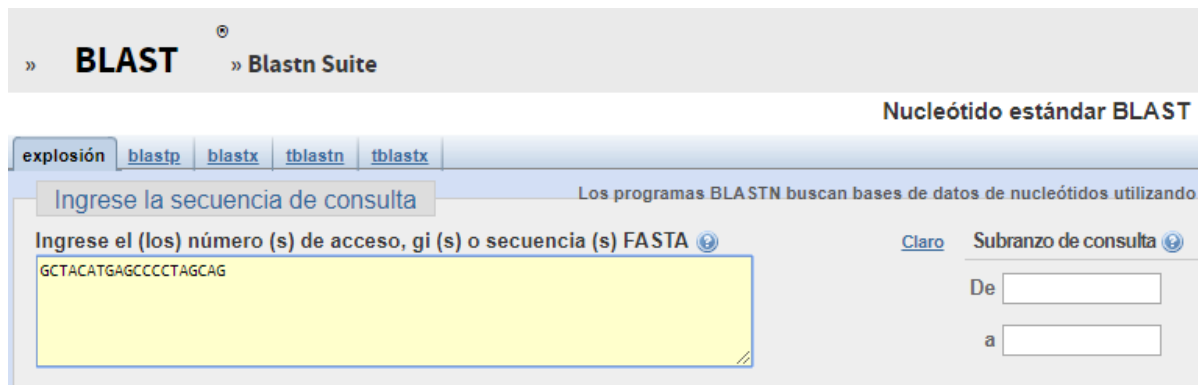
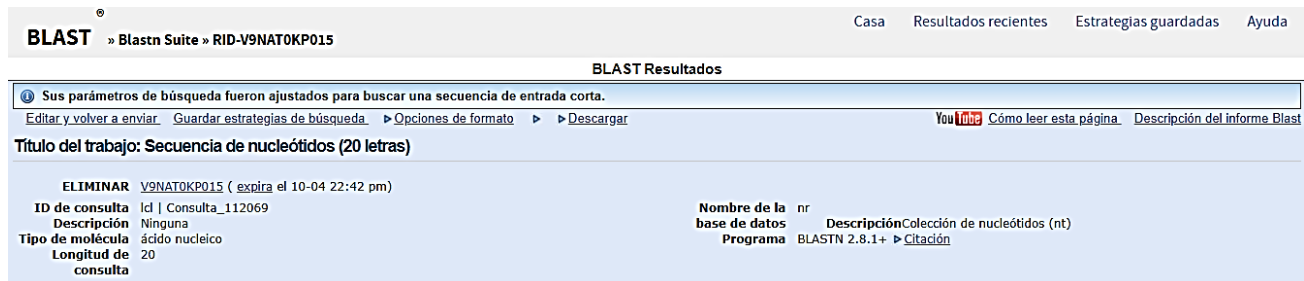
- Nos dirigimos a la página de Primers3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) y cargamos el archivo de la secuencia de nucleótidos descargada. Posteriormente nos dirigimos al apartado de “Pick Primers”, en donde aparecerán una lista de primers compatibles con la secuencia que se ha cargado al sistema.
- Se eligen los primers que mejor se adapten a los requerimientos necesarios y cumplan la mayor cantidad de rubros para selección de primers.

P. Frontal:

☐ Left Primer 5:	gi 1215836734 ref NC_035239.1 Mangifera indica c				
Sequence:	GCTACATGAGCCCCTAGCAG				
Start: 46913	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 60.0 %	ANY: 6.0	SELF: 2.0

--Blast--

- Ya que se seleccionó a la pareja de primers, nos dirigimos a la página del NCBI Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), en donde se anota la secuencia del primer frontal y se corre la prueba.

BLAST Resultados

Sus parámetros de búsqueda fueron ajustados para buscar una secuencia de entrada corta.

[Editar y volver a enviar](#) [Guardar estrategias de búsqueda](#) [Opciones de formato](#) [Descargar](#) [YouTube](#) [Cómo leer esta página](#) [Descripción del informe Blast](#)

Título del trabajo: Secuencia de nucleótidos (20 letras)

ELIMINAR V9NAT0KP015 (expira el 10-04 22:42 pm)		Nombre de la base de datos		Descripción	
ID de consulta	Id Consulta_112069	nr		Colección de nucleótidos (nt)	
Descripción	Ninguna	Programa	BLASTN 2.8.1+	Citación	
Tipo de molécula	ácido nucleico				
Longitud de consulta	20				

- Una vez que se han obtenido los resultados nos aseguramos que exista compatibilidad del primer con la especie que es de interés, asegurándose que el mismo primer no amplifique para alguna otra especie que interfiera con la investigación.

☐ Pluchea indica cloroplasto, genoma completo	40.1	40.1	100%	0.33	100%	NC_038194.1
☐ Pluchea indica cloroplasto, genoma completo	40.1	40.1	100%	0.33	100%	MG452144.1
☐ Nyssa sinensis cloroplasto, genoma completo	40.1	40.1	100%	0.33	100%	MG525000.1
☐ Nyssa wenshanensis cloroplasto, genoma completo	40.1	40.1	100%	0.33	100%	MG524995.1
☐ Mangifera indica bono PDBK 2014-0249 cloroplasto, genoma completo	40.1	40.1	100%	0.33	100%	KX871231.1
☒ Mangifera indica cloroplasto, genoma completo	40.1	40.1	100%	0.33	100%	KY635882.1
☐ Nyssa sinensis cloroplasto, genoma completo	40.1	40.1	100%	0.33	100%	KX904873.1
☐ Daucus tenuisectus bono Ames 31616 plastid, genoma completo	40.1	40.1	100%	0.33	100%	KX832318.1
☐ Daucus muricatus bono Ames 29090 plastid, genoma completo	40.1	40.1	100%	0.33	100%	KX832315.1
☐ Daucus muricatus bono PI 295863 plastid, genoma completo	40.1	40.1	100%	0.33	100%	KX832314.1
☐ Bupleurum latissimum chloroplast, genoma completo	40.1	40.1	100%	0.33	100%	KT983258.1
☐ Cloroplasto de Bupleurum falcatum, genoma completo	40.1	40.1	100%	0.33	100%	KM207676.1
☐ Viburnum tinus voucher Gen de anoproteína de clorofila (psbC) del fotosistema II de Donoghue & Chatelet WC277, cds parciales: cloroplasto	40.1	40.1	100%	0.33	100%	KJ795387.1
☐ Mangifera indica gran región de copia única, secuencia parcial, y repetición invertida, secuencia completa: cloroplasto	40.1	40.1	100%	0.33	100%	EF205595.2
☐ Cloroplasto de Titanophycus setchellii, genoma completo, aislamiento J.0604	38.2	38.2	95%	1.3	100%	LT622874.1

6. Ya que se ha cerciorado que el primer cebador F nos es de utilidad pasamos a realizar los mismos pasos para el segundo cebador R, sin embargo, para poder verificar la especificidad de este, debemos conocer la secuencia complementaria y reversa del cebador R.

P. Reverso:

☐ Right Primer 5:	gi 1215836734 ref NC_035239.1 Mangifera indica c					
Sequence:	AGGGTATTCGTGCTTGGATG					
Start: 47115	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 50.0 %	ANY: 2.0	SELF: 0.0	

--Blast--

» **BLAST**
» Blastn Suite

Nucleótido estándar BLAST

explosión
blastp
blastx
tblastn
tblastx

Ingrese la secuencia de consulta
Los programas BLASTN buscan bases de datos de nucleótidos utilizando

Ingrese el (los) número (s) de acceso, gi (s) o secuencia (s) FASTA

CATCCAAGCACGAATACCCT

Claro
Subranzo de consulta

De
a

BLAST » Blastn Suite » RID-V9MU0P59015

Casa Resultados recientes Estrategias guardadas Ayuda

BLAST Resultados

ⓘ Sus parámetros de búsqueda fueron ajustados para buscar una secuencia de entrada corta.

[Editar y volver a enviar](#) [Guardar estrategias de búsqueda](#) [Opciones de formato](#) [Descargar](#) [YouTube](#) [Cómo leer esta página](#) [Descripción del informe Blast](#)

Título del trabajo: Secuencia de nucleótidos (20 letras)

ELIMINAR V9MU0P59015 (expira el 10-04 22:33 pm)

ID de consulta	Descripción	Tipo de molécula	Longitud de consulta	Nombre de la base de datos	nr	Descripción
Id Consulta_112501	Ninguna	ácido nucleico	20	Programa	BLASTN 2.8.1+	Colección de nucleótidos (nt)

7. Finalmente nos aseguramos que el segundo cebador R, amplifique para el gen que es de interés y que no amplifique para alguna otra especie que interfiera con la investigación.

☐	Theobroma cacao genotype Amelonado chloroplast partial genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	JQ228380.1
☐	Plumbago auriculata voucher FLAS:M.J. Moore 306 photosystem II protein D2 (psbD) gene complete cds: chloroplast	40.1	40.1	100%	0.33	100%	GQ998814.1
☐	Ficus sp. Moore 315 voucher FLAS:M.J. Moore 315 photosystem II protein D2 (psbD) gene complete cds: chloroplast	40.1	40.1	100%	0.33	100%	GQ998252.1
☐	Ximenia americana voucher FLAS:W.S. Judd 8070 photosystem II protein D2 (psbD) gene complete cds: chloroplast	40.1	40.1	100%	0.33	100%	GQ997886.1
☐	Rhododendron simsii voucher FLAS:M.J. Moore 324 photosystem II protein D2 (psbD) gene complete cds: chloroplast	40.1	40.1	100%	0.33	100%	GQ997817.1
☐	Acorus americanus chloroplast complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	EU273602.1
☐	Cuscuta obtusiflora chloroplast complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	EU189133.1
☐	Cuscuta gronovii complete chloroplast genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	AM711639.1
☐	Trithuria submersa photosystem II D2 protein (psbD) and photosystem II CP43 protein (psbC) genes partial cds: chloroplast	40.1	40.1	100%	0.33	100%	EF153940.1
☐	Aphelia brizula photosystem II D2 protein (psbD) and photosystem II CP43 protein (psbC) genes partial cds: chloroplast	40.1	40.1	100%	0.33	100%	EF153939.1
☐	Centrolepis monogyna photosystem II D2 protein (psbD) and photosystem II CP43 protein (psbC) genes partial cds: chloroplast	40.1	40.1	100%	0.33	100%	EF153938.1
☐	Leiosporoceros dussii chloroplast complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	MH577299.1
☒	Mangifera indica voucher PDBK 2014-0249 chloroplast complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	KX871231.1
☒	Mangifera indica chloroplast complete genome	40.1	40.1	100%	0.33	100%	KY635882.1

8. Una vez que conocemos las secuencias específicas de los cebadores a utilizar se puede realizar el cálculo de la temperatura de hibridación, ya que esta depende de las proporciones de bases nitrogenadas que contenga el cebador seleccionado, de esta forma recurrimos a la ecuación:

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

A: 5 T: 3

G: 5 C: 7

$$Tm_F = [(5 + 7)4 + (5 + 3)2] - 5$$

$$Tm_F = 59 ^\circ\text{C}$$

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

$$A: 3 \quad T: 7$$

$$G: 8 \quad C: 2$$

$$Tm_R = [(8 + 2)4 + (3 + 7)2] - 5$$

$$Tm_R = 55 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$\overline{Tm} = \frac{Tm_F + Tm_R}{2}$$

$$\overline{Tm} = \frac{59 \text{ }^{\circ}\text{C} + 55 \text{ }^{\circ}\text{C}}{2}$$

$$\overline{Tm} = 57 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Finalmente se repiten los pasos para los otros cebadores, en donde se tendrá que considerar la nueva sección de ADN diana para diseñar cebadores específicos.

4). Selección de primers para los promotores CaMV35S y *Arabidopsis thaliana* y el terminador T-Nos.

Bibliográficamente estudiado por Monroy, Laguna. Aideht. Diana. (2018).

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

Bibliográficamente estudiado por İrem Karamollaoğlu, H. A. (2009).

Cebadores bibliográficos para promotor CaMV35S y terminador T-Nos.

	Primers (5' → 3')	Tamaño de amplificado
Promotor CaMV 35S (Virus del Mosaico de la coliflor)	F: GCTCCTACAAATGCCATCA	195 pb
	R: GGATAGTGGGATTGTGCGTC	
Terminador T-NOS (Terminador de la nopaline Sintetasa)	F: GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	180 pb
	R: TTATCCTAGTTTGC GCGCTA	