

Metodologías para el análisis de expresión y cuantificación de proteínas conferidas en tejidos de cultivos GM

Abel Alberto Verdugo-Fuentes
Luciano Castro-Espinoza[§]
Marco A. Gutiérrez-Coronado
José Luis Martínez-Carrillo

Dirección de Recursos Naturales-Instituto Tecnológico de Sonora. 5 de febrero 818 sur, Col. Centro, Cd. Obregón, Sonora, México. CP. 85000.

[§]Autor para correspondencia: luciano.castro@itson.edu.mx.

Resumen

Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt) son utilizadas como bioinsecticidas en la agricultura. Se precisa de métodos confiables que permitan analizar las características que se confieren a las plantas genéticamente modificadas (GM) durante su desarrollo, antes de su comercialización. El objetivo del trabajo fue estandarizar metodologías para el análisis de la expresión de genes y proteínas conferidas al algodón GM durante sus diferentes etapas fenológicas en campo. Como principal aplicación práctica del estudio realizado, las metodologías estandarizadas se podrán emplear en la caracterización de cultivos GM que se desarrollen y para los cuales sea necesario realizar su análisis de riesgo. Para ello se procesaron muestras de tejido vegetal en diferentes etapas fenológicas obtenidas de predios comerciales de algodón GM en el Valle del Yaqui. En los diferentes tejidos se cuantificó la expresión génica y proteica mediante análisis RTq-PCR y Elisa, respectivamente. Los resultados obtenidos muestran variación en la expresión de los genes conferidos a lo largo del desarrollo de la misma variedad y entre los diferentes sitios donde se ubicaron los cultivos. Los mayores niveles de expresión se identificaron, como se esperaba, en las etapas tempranas del cultivo (valores medios de 8.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Cry1Ac y 63.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Cry2Ab) comparados con lo observado en etapas tardías o maduras (valores medios de 0.05 y 0.3 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Cry1Ac y Cry2Ab, respectivamente). Por lo tanto, se concluye que las técnicas de RTq-PCR y ELISA son adecuadas para evaluar la expresión espacial y temporal de genes que se confieran a plantas GM, información requerida para caracterizar la exposición al peligro y poder realizar el análisis de riesgo.

Palabras clave: análisis de expresión génica, análisis de expresión de proteínas, cultivos GM.

Recibido: abril de 2019

Aceptado: junio de 2019

Introducción

El último informe de la international service for the acquisition of agri-biotech applications (ISAA) de 2017 reporta 498 eventos, en 29 cultivos genéticamente modificados (GM) que han sido desarrollados y aprobados para distintos propósitos comerciales alrededor del mundo. Las características que confieren los eventos con mayor tiempo en el mercado mundial, incluyendo el mexicano, son el de la tolerancia a herbicidas y la resistencia a insectos lepidópteros plaga.

Las proteínas Cry son las más utilizadas para el manejo y control de insectos plaga. Las plantas transgénicas han sido utilizadas para reducir las pérdidas que ocasiona el ataque de dichos insectos. Las variedades de algodónero resistentes a insectos plaga, que se han empleado en México con fines comerciales, incorporan los genes Cry1Ac y Cry2Ab (Bayer, 2012), los cuales confieren a la planta la expresión de proteínas insecticidas específicas para controlar las principales especies de insectos lepidópteros plaga del cultivo. *Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria patógena para algunos insectos, ya que forma proteínas tóxicas conocidas como Cry, Vip y Cyt. Se reportan al menos cuatro diferentes tipos de proteínas Cry, según su estructura (Bravo *et al.*, 2011).

Existen distintos métodos que permiten detectar de manera cualitativa y cuantitativa la presencia de genes y proteínas transgénicas en los diferentes cultivos GM. Estos métodos pueden estar basados en la detección del ácido desoxirribonucleico (ADN) conferido o la detección inmunológica de la proteína que codifican. El método que se está utilizando con mayor frecuencia en la detección de organismos GM (OGM) es la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RTq-PCR), que permite la cuantificación del ADN introducido para estimar su presencia en productos derivados inclusive en mezclas complejas (Pla *et al.*, 2006; Elenis *et al.*, 2008).

Los métodos de detección inmunológica se desarrollan básicamente de dos maneras: las tiras reactivas o strips de flujo lateral y el ensayo de inmunodetección ligado a enzima (Elisa). Mediante el uso de las tiras reactivas se puede determinar la ausencia o presencia de una determinada proteína, lo que lo hace un análisis de tipo cualitativo, que puede llegar a ser semi cuantitativo incluyendo consideraciones estadísticas en el muestreo. El ensayo Elisa se basa en el uso de anticuerpos específicos para lograr detectar la proteína de interés y a su vez excluir proteínas que se encuentren en el producto que se analiza; es un método muy sensible, versátil y cuantitativo (Corona *et al.*, 2006).

La cuantificación en tiempo y espacio de las proteínas que se confieren a un cultivo GM forma parte de su caracterización para generar información requerida en los diferentes análisis previos a su comercialización. Por ejemplo, los niveles de expresión de la proteína conferida en las diferentes partes de las plantas, es utilizada como información base del análisis de riesgo ambiental y los datos de la concentración de la proteína conferida al GM en el grano cosechado es utilizado en el análisis de exposición dietaria.

La presente investigación tuvo como objetivo estandarizar metodologías para el análisis de la expresión de genes y proteínas conferidas al algodónero GM durante sus diferentes etapas fenológicas en campo. Como principal aplicación práctica del estudio realizado, las metodologías estandarizadas se podrán emplear en la caracterización de cultivos GM que se desarrollen y para los cuales sea necesario realizar su análisis de riesgo.

Materiales y métodos

Zona de estudio

Los muestreos se realizaron en el Valle del Yaqui, ubicado en el sur del estado de Sonora, en cuatro predios agrícolas distintos y donde fueron sembradas dos variedades de algodón genéticamente modificado, durante el ciclo 2014 (Cuadro 1). En cada predio también se sembró una variedad que no expresa las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab, como refugio.

Cuadro 1. Georreferencias de los predios muestreados.

Predio	Coordenadas geográficas			
Guamúchil	N	27°26'28.4"	W	109°59'36.0"
5 de febrero	N	27°22'31.9"	W	109°56'06.9"
Campo 9	N	27°22'13.0"	W	109°54'35.1"
Campo 1	N	27°22'10.5"	W	109°54'22.3"

Toma y preparación de la muestra

Se tomaron muestras de hojas en seis fechas, en las primeras cuatro fechas también se tomaron muestras de cuadros y las bellotas fueron recolectadas en las últimas dos fechas. La toma de muestra de tejido vegetal se realizó a la altura del tercer nudo de arriba hacia abajo. Para la detección inmunológica se tomó un total de 120 muestras, correspondiendo a 60 de hojas, 40 de cuadros y 20 de bellotas, de éstas 24 (12 de hoja, ocho de cuadro y cuatro de hoja) fueron del refugio. Para la detección génica solo se tomaron muestras en tres fechas, tomándose cinco muestras en cada ocasión, de cada campo, las cuales fueron procesadas en forma independiente.

Para el caso de la hoja se tomó en cuenta que estuviera completamente desdoblada e íntegra, para cuadro y bellota se cuidó que no tuvieran alguna alteración al momento del muestreo. Se tomaron 30 mg de tejido de hoja, 80 mg de tejido de cuadro y 9 mg de tejido de bellota, todo en fresco. Para las pruebas de detección inmunológica los tejidos se procesaron en fresco con su respectivo buffer de extracción y se procedió a la maceración. Para la detección génica los tejidos se pusieron en contacto con nitrógeno líquido y se trituraron con la ayuda de un micropistilo estéril.

Detección inmunológica

Tiras de flujo lateral

Antes de proceder a la cuantificación proteica y génica, se evaluó la presencia de las proteínas transgénicas mediante el uso de tiras de flujo lateral, siguiendo la metodología sugerida por el fabricante (EnviroLogix, Portland, ME, USA). Para ello en un tubo de 1.5 mL se realizó una muestra compuesta de cinco porciones de los distintos tejidos de algodón, se le añadieron 0.5 mL de búfer de extracción para análisis de hoja y 1.5 mL para cuadro y bellota. Se homogenizó la muestra con la ayuda de un micropistilo. Posteriormente, se introdujo una tira dentro del tubo y se dejó por 10 min para observar e interpretar los resultados. Las muestras que resultaron positivas se pasaron al análisis mediante la prueba Elisa y PCR en tiempo real.

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Elisa)

Se realizó una prueba tipo ‘sandwich’ para ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (Elisa) siguiendo el protocolo del Kit QualiPlate AP 051 de EnviroLogix. Para las curvas de calibración se utilizaron cinco estándares en concentración de 3.13, 6.25, 12.5, 25 y 50 ng mL⁻¹ de proteína Cry1Ac y Cry2Ab. Se mezcló el contenido de los pozos y posteriormente se colocó en incubación a temperatura ambiente durante una hora. Después de la incubación se agitó el contenido de los pozos, se inundaron los pocillos por completo con el búfer de lavado, luego se vació. Se repitió este paso de lavado tres veces.

Se añadieron 100 µL de *p*-nitrofenil fosfato (sustrato S1) a cada pocillo, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Se leyó en el espectro SpectrOstar Nano (BMG Lab Tech, Ortenberg, Alemania) a 405 nm para la proteína Cry2Ab. Se realizaron cuatro lavados para añadir posteriormente 100 µL de 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (sustrato S2) a cada pocillo, se incubó a temperatura ambiente por 30 min y se leyó a 650 nm para Cry1Ac. La interpretación de los resultados se realizó con base en las absorbancias de cada muestra analizada (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentraciones y mediciones de absorbancia para las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab.

Concentración (ng mL ⁻¹)	Absorbancia Cry1Ac	Absorbancia Cry2Ab
0	-0.005	0.0045
3.13	0.269	0.0525
6.25	0.522	0.1825
12.5	1.139	0.3685
25	1.975	0.7025

Detección génica

Extracción de ARN a partir de tejidos vegetales

El tejido vegetal a analizar se colocó en un tubo de 1.5 ml y se añadieron 500 µL de PureLink[®] Plant RNA Reagent (Life Technologies[™], Carlsbad, California, USA), posteriormente se homogenizó. Se incubaron las muestras por 5 min a temperatura ambiente manteniendo el tubo de manera horizontal para máxima extracción. Se centrifugaron a 14 000 RPM por dos min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo estéril. Se añadieron 100 µL de NaCl 5M para clarificar. Se adicionaron 300 µL de cloroformo y se mezcló vigorosamente.

Se centrifugó a 14 000 RPM por 10 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo estéril. Se precipitó el RNA con un volumen igual de isopropanol frío 100% a la fase acuosa que se separó y se mezcló por inversión. Se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se incubó a temperatura ambiente por 10 min y posteriormente se centrifugó a 14 000 RPM por 10 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante del tubo dejando el pellet de RNA, para el lavado se añadieron 500 µL de etanol al 75%, se agitó y se centrifugó a 14 000 RPM por cinco min a 4 °C, posteriormente se secó el pellet de RNA por aproximadamente 5-10 min y se procedió a la resuspensión con 50 µL de agua DEPC mezclando con la micropipeta. Se dejó resuspender a 4 °C y posteriormente se procedió a determinar la concentración y pureza de la extracción.

Síntesis del cADN por transcripción reversa

La retrotranscripción se realizó empleando el kit GoTaq[®] Probe 2-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, Wisconsin, USA) y se llevó a cabo en tubos para PCR de 0.2 mL conteniendo la siguiente mezcla por cada reacción: 2 µL de ARN (200 ng), 1 µL de oligo (dT)15 primers, 1 µL de primers aleatorios y 3 µL agua libre de RNAsas/DNAsas para completar un volumen de 7 µL. Se desnaturalizó el ARN y primers en un block de calentamiento a 70 °C por 5 min, se colocó inmediatamente en hielo por 5 min y posteriormente se centrifugó por 10 s.

Para la alineación y síntesis de cADN se añadieron los siguientes componentes: 4.9 µL de agua libre de RNAsas/DNAsas, 4 µL del búfer de reacción GoScript 5X, 1.6 µL de MgCl₂, 1 µL de nucleótidos, 0.5 µL de RNasin recombinante como inhibidor, 1 µL de transcriptasa reversa GoScript, para completar un volumen de 13 µL y adicionarlo a los 7 µL del paso de desnaturalización. Para la alineación se colocaron a 25 °C por 5 min, para la elongación a 42 °C por 45 min y para inactivar la transcriptasa reversa a 70 °C por 15 min. Se procedió al RT-PCR o se almacenaron a -20 °C.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

La amplificación por PCR en tiempo real se llevó a cabo en tubos para PCR de 0.2 mL con la siguiente mezcla por cada reacción para las muestras: 2 µL de ARN (200 ng), 7 µL de agua libre de RNAsas/DNAsas, 10 µL de GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA) y 1 µL del mix de primer/probe (300 nM), obteniendo un volumen de 20 µL por cada reacción.

Para realizar las curvas de calibración la mezcla para cada reacción fue la siguiente: 5 µL de cada punto de la curva, 4 µL de agua libre de RNAsas/DNAsas, 10 µL de GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix y 1 µL del mix de primer/probe (300 nM), para obtener un volumen final de 20 µL por cada reacción. Todas las muestras fueron analizadas en el sistema 7500 Fast Real-Time PCR (Life Technologies[™], Carlsbad, California, US) bajo las condiciones que se muestran en el Cuadro 3. Los primers utilizados para la amplificación en cada una de las reacciones se muestran en el cuadro 3. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración mediante diluciones seriadas a partir de una concentración inicial de 200 000 copias por microlitro (Cuadro 4 y 5).

Cuadro 3. Condiciones de corrida en el termociclador en tiempo real.

Paso	Ciclos	Temperatura	Tiempo (min)
Activación GoTaq [®] polimerasa	1	95.0 °C	02:00
Desnaturalización	40	95.0 °C	00:15
Alineación	40	60.0 °C	01:00

Cuadro 4. Secuencia de primers utilizados.

Primers	Secuencia	Amplicón
Cry1Ac	(F) GACTCTAACCTCTTGGGACACT	134 pb
	(R) AGAACGGTGACTTCAACAATGG	
Cry2Ab	(F) AATTCTAACTACTTCCCCGACTACTTC	121 pb
	(R) ACGGAGAGGCGATGTTCTTG	

Cuadro 5. Puntos de la curva de calibración para cuantificación génica.

Punto	Núm. de copias (μL)
1	200 000
2	20 000
3	2 000
4	200
5	20
6	2
7	0.2

Análisis de resultados

Los resultados obtenidos en la detección proteica se analizaron mediante un análisis de varianza (Anova), basado en un modelo lineal de efectos fijos para una $p < 0.05$, a partir de las medias obtenidas en los análisis. Se tomó como fuente de variación las fechas (seis niveles), sin interacción con las variedades ni los sitios, elementos que fueron tomados solamente para elevar el tamaño de la muestra. Para la conformación de las curvas de calibración de las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab se realizó un análisis de regresión lineal simple, presentando, la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación. Los resultados obtenidos en la detección génica se analizaron mediante la evaluación de medianas en la Prueba de Kruskal-Wallis con una $p < 0.05$. Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV (StatPoint Technologies, Inc.).

Resultados y discusión

Detección inmunológica

Tiras de flujo lateral

Previo a los análisis por ELISA y RT-qPCR se realizaron los análisis por inmunocromatografía, resultando positivas 96 de las 120 muestras recolectadas y que presuntamente expresaban la proteína Cry1Ac y Cry2Ab. Dohare y Tank (2014) detectaron la presencia de las mismas proteínas, que se buscaban en este estudio, mediante el análisis de un total de tres variedades de algodón genéticamente modificado de la línea Bollgard II[®]. Mientras que Larbouga *et al.* (2013) utilizaron la misma herramienta para un estudio similar cinco variedades de algodón de la misma línea.

Esta tecnología permite que los anticuerpos inmovilizados y específicos para cada proteína se incorporen a una tira de nitrocelulosa acoplados a una molécula que reaccionará ante la presencia de las proteínas analizadas (Lipton *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2007). Es por ello que esta herramienta es ampliamente utilizada en la actualidad debido a la rapidez y facilidad para la obtención de resultados, ya sea en campo o en laboratorio.

Parámetros de calidad en Elisa

Para la verificación de la linealidad y la cuantificación de las proteínas transgénicas se realizaron curvas de calibración con cinco concentraciones conocidas a distintos niveles. Para la proteína Cry1Ac se obtuvieron R^2 superiores a 0.99, lo mismo para la proteína Cry2Ab. Los valores de R^2

recomendados para asegurar la linealidad del método es ≥ 0.99 , concordando con los resultados obtenidos por Shan *et al.* (2007), en la construcción de curvas para la cuantificación de la proteína Cry1Ac en distintos tejidos de algodónero. En la Figura 1 se muestra las linealidades del sistema de la curva de calibración para las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab. La exactitud y precisión del método se evaluó realizando todos los análisis por duplicado de cada una de las muestras cuantificadas. Karuri *et al.* (2013) obtuvieron coeficientes de variación menores al 15%, similar a los obtenidos en este estudio, lo que refleja la calidad de los resultados.

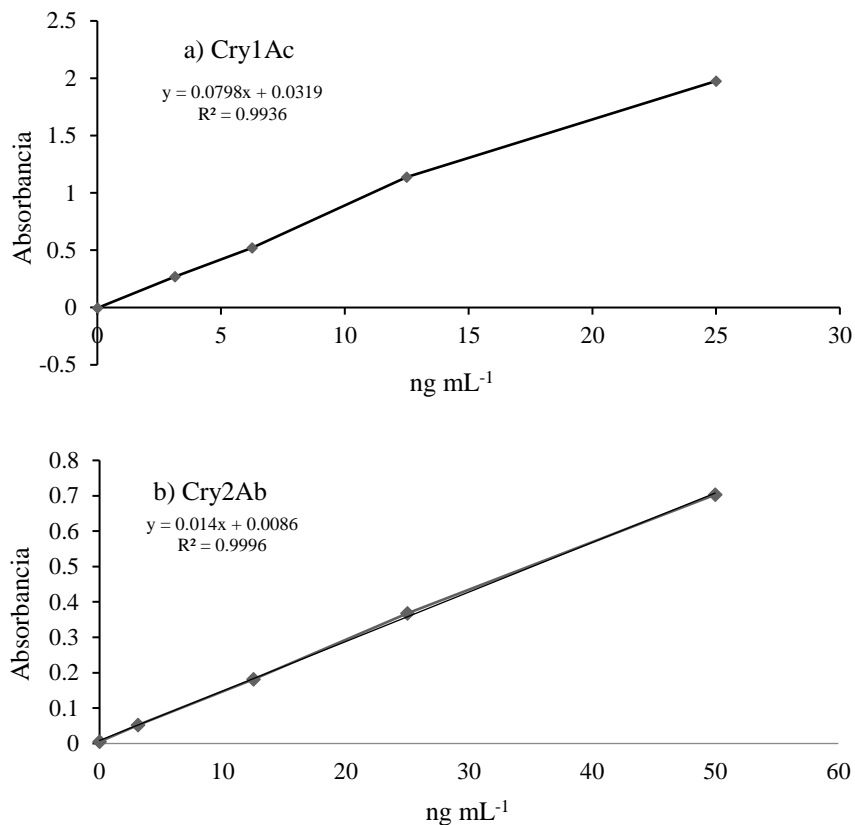


Figura 1. Curvas de calibración para la prueba Elisa de las proteínas, a) Cry1Ac y b) Cry2Ab.

Cuantificación de proteínas Cry a través de Elisa

Los resultados de los análisis de la cuantificación de la expresión proteica para Cry1Ac y Cry2Ab en los cuatro predios analizados, en seis momentos y dos cultivares distintos, arrojaron una tasa de expresión la cual disminuyó a lo largo del tiempo, con diferencias altamente significativas ($p < 0.0025$ para Cry1Ac y $p < 0.0045$ para Cry2Ab), llegando a niveles a los cuales no pudo ser detectada, esto para los casos de cuadro y bellota. El nivel mínimo de proteína Cry1Ac cuantificado en hoja (Cuadro 5) fue de $0.3 \mu\text{g g}^{-1}$, mientras que en cuadros y bellotas (Cuadro 6 y 7) la tendencia ocurrió a cero, al resultar indetectable en el predio 5 de febrero. Los niveles máximos de expresión ocurrieron en hoja, encontrándose hasta $8.5 \mu\text{g g}^{-1}$ en etapas tempranas del cultivo, mientras que en cuadros y bellotas fue de $2.5 \mu\text{g g}^{-1}$. Greenplate *et al.* en 2003, en un estudio similar con la variedad de algodónero MON-15985, lograron la determinación de la proteína Cry1Ac; a través, de la prueba Elisa, obteniendo valores promedio de $4.8 \mu\text{g g}^{-1}$ en tejido de hoja, resultados muy similares a los obtenidos en este estudio.

Cuadro 6. Concentración de proteína en hoja ($\mu\text{g g}^{-1}$ en peso seco).

Fecha \ Sitio	21/05/14	04/06/14	19/06/14	14/07/14	21/07/14	29/07/14
	Hoja	Hoja	Hoja	Hoja	Hoja	Hoja
Cry1Ac						
Campo 1	7.88	7.2	3.7	2.36	2.11	0.91
Guamúchil	8.5	4.75	1	3.65	1.59	1.51
5 de febrero	5	4.08	1.74	1.63	0.33	0.91
Campo 9	ND	5.14	1.91	1.42	1.57	1.5
Cry2Ab						
Campo 1	63.13	66.67	63.44	13.91	35.49	17.57
Guamúchil	64.32	66.71	69.11	21.22	31.74	15.11
5 de febrero	62.88	74.09	63.2	9.68	33.92	14.47
Campo 9	61.46	72.26	64.04	8.51	34.9	18.09

ND= no detectada.

Cuadro 7. Concentración de proteína en cuadro y bellota ($\mu\text{g g}^{-1}$ en peso seco).

Fecha \ Sitio	21/05/14	04/06/14	19/06/14	14/07/14	21/07/14	29/07/14
	Cuadro	Cuadro	Cuadro	Cuadro	Bellota	Bellota
Cry1Ac						
Campo 1	1.87	2.2	1.16	0.18	0.18	0.16
Guamúchil	1.52	1.08	0.65	0.38	0.06	0.06
5 de febrero	1.03	2.08	0.73	0.08	ND	ND
Campo 9	1.71	2.47	0.56	0.04	0.35	0.08
Cry2Ab						
Campo 1	70.75	81.73	59.02	1.07	24.35	18.51
Guamúchil	52.02	58.19	64.38	2.35	19.21	17.52
5 de febrero	59.68	92.64	80.92	0.64	12.34	16.7
Campo 9	73.6	88.73	58.1	0.36	17.11	19.07

ND= no detectada.

En el análisis de expresión de las proteínas conferidas a los cultivos GM es importante tener presente su relación directa con el crecimiento y desarrollo de la propia planta y que ambos son influidos por factores ambientales. La temperatura, luz, salinidad, disponibilidad de agua, estado nutricional e interacciones ambientales (con agentes bióticos de su entorno) se identifican como los principales factores ambientales que afectan las condiciones de cultivo y por lo tanto el desarrollo de las plantas y su composición (Sivasupramaniam *et al.*, 2008; Jamal, 2009; Knight *et al.*, 2013).

Según Kranthi *et al.* (2005), la proteína Cry1Ac tiende a variar entre los distintos híbridos y los diferentes tejidos de la planta, encontrándose los niveles más altos en hojas terminales, seguido de cuadros, bellotas y por último las flores. Dicha variación fue observada claramente a lo largo de

los muestreos y análisis realizados. Un comportamiento muy similar fue el observado y cuantificado con la proteína Cry2Ab en todos los tejidos analizados. Los niveles más altos se cuantificaron en hoja con $74 \mu\text{g g}^{-1}$ en etapa vegetativa, mientras que en etapas tardías se obtuvieron niveles inferiores de hasta $8.5 \mu\text{g g}^{-1}$, sin llegar a niveles indetectables. En cuadro y bellota se obtuvieron niveles similares a los de hoja en etapas tempranas, cuantificando hasta $92.6 \mu\text{g g}^{-1}$ mientras que en etapas tardías se obtuvieron niveles de hasta $0.3 \mu\text{g g}^{-1}$ (Knight *et al.*, 2013).

Detección génica

Extracción y determinación de la concentración y pureza de ARN a partir de tejidos vegetales

La absorbancia a 260 nm y la relación A260/280 nos da una indicación de la cantidad de RNA y del grado de contaminación de impurezas orgánicas e inorgánicas. Se obtuvieron extractos de ARN a partir de tejidos de hoja, cuadro y bellota con relaciones de A260/A280 entre 1.7-2, lo cual indica un alto grado de pureza de ARN aislado, según Kang (2012). Los rendimientos de extracción a partir de hoja fueron superiores a $1\ 000 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, mientras que para cuadro y bellota estuvieron entre 50 y $340 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Parámetros de calidad en la detección génica

Para la verificación de la linealidad y la cuantificación génica de las proteínas transgénicas se realizaron curvas de calibración con seis concentraciones, en número de copias, conocidas a distintos niveles. Para la proteína Cry1Ac se obtuvieron R^2 mayores al 0.99 en la mayoría de los casos, lo mismo para la proteína Cry2Ab. Los valores de R^2 recomendados para asegurar la linealidad del método es ≥ 0.99 . En la Figura 2 se observan las linealidades del sistema de la curva de calibración para la cuantificación génica de las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab.

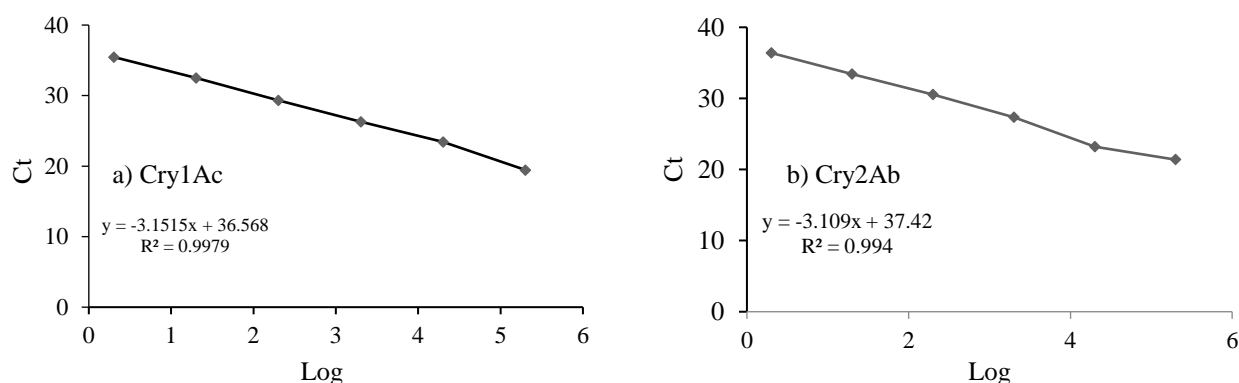


Figura 2. Curva de calibración para las proteínas, a) Cry1Ac y b) Cry2Ab en RT-Qpc.

Se midió la eficiencia del método (E), que es la adecuada duplicación de la secuencia de interés en cada ciclo. Las eficiencias obtenidas fueron de 107.63% para Cry1Ac y 109.72% para la proteína Cry2Ab. Una reacción adecuada arroja eficiencias con valores del 90-110%. Para Kavanagh *et al.* (2011) la pendiente debe ser otro parámetro de calidad evaluado en las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa, los obtenidos en este estudio fueron de -3.1515 para Cry1Ac y -3.109 para Cry2Ab, los cuales caen dentro de los recomendados por bibliografía que deben de oscilar entre -3.58 y -3.1.

Los resultados obtenidos en la validación cumplen con los criterios establecidos en la guía de información mínima para la publicación de experimentos de PCR cuantitativo en tiempo real (MIQE), por sus siglas en inglés publicada por Bustin *et al.* (2009) y usados por Dinon *et al.* (2011), para el desarrollo y validación de métodos de detección de proteínas transgénicas mediante PCR en tiempo real.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)

Una vez sintetizado el ADN complementario, se procedió a la cuantificación de los genes codificantes para las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab expresados en los tejidos ya mencionados anteriormente. Debido a la dispersión obtenida de los datos, se procedió a realizar la prueba de Kruskal-Wallis analizando la mediana de los datos para concluir si existió o no diferencia estadísticamente significativa. Dichos resultados evidenciaron que no existe una diferencia significativa, con respecto al tiempo, en la expresión de la proteína Cry1Ac ($p=0.84$) y Cry2Ab ($p=0.446$) en hojas; si existe diferencia en cuadros y bellotas para ambas proteínas ($p=0.0004$ para Cry1Ac, $p=0.001$ para Cry2Ab).

Se observó en cada uno de los campos que conforme el análisis se realizaba en etapas más tardías la cuantificación del gen resultaba menor, en algunos casos tendiendo a cero (Figuras 3 y 4), pero siempre hubo expresión. En un estudio similar realizado por Adamczyk y Meredith en 2004, la expresión génica de la proteína Cry1Ac tiende a variar entre distintas variedades y partes de la planta a lo largo de la temporada. Adamczyk *et al.* (2009), correlacionaron las cantidades de la proteína Cry1Ac con los transcritos de mRNA, encontrándose diferencias en las variedades estudiadas.

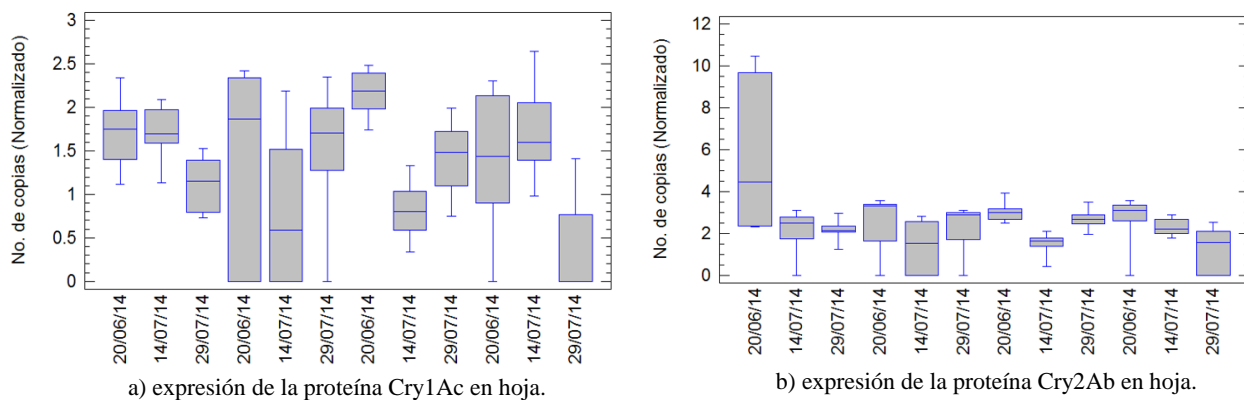


Figura 3. Cuantificación de los genes de las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab en tejidos de hoja de algodónero GM.

El orden de las fechas para los predios de izquierda a derecha es: Campo 1, 5 de febrero, Guamúchil y Campo 9.

La fecha correspondiente a la del análisis de bellota es la del 29/07/2014, el resto corresponde a cuadros. El orden de las fechas para los predios de izquierda a derecha es: Campo 1, 5 de febrero, Guamúchil y Campo 9.

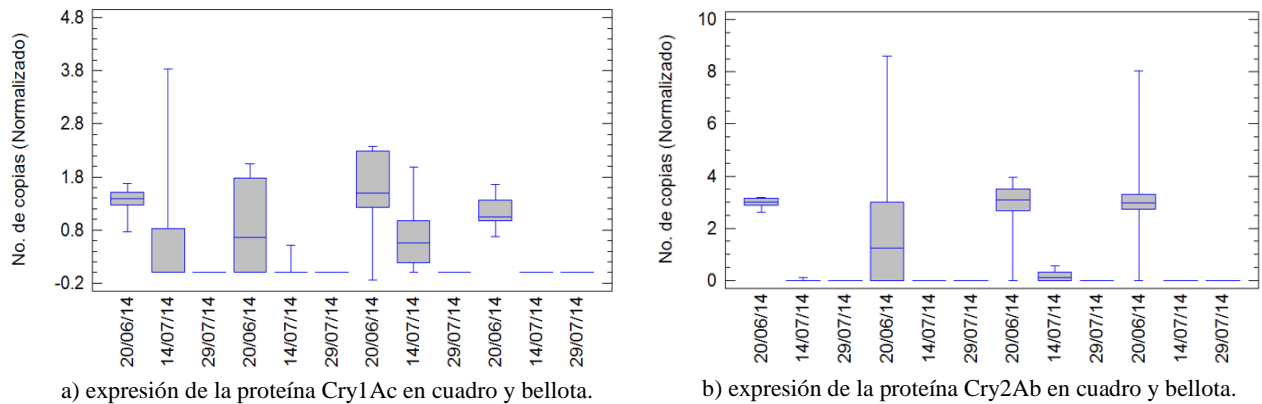


Figura 4. Cuantificación de los genes de las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab en tejidos de cuadro y bellota de algodón GM.

Olsen *et al.* (2005); Xia *et al.* (2005), concluyeron que el mecanismo resulta hasta cierto punto desconocido. Adamczyk y Gore (2004); Kranthi *et al.* (2005); Olsen *et al.* (2005); Wan *et al.* (2005), concluyeron que la expresión del gen Cry1Ac puede llegar a disminuir la efectividad de la tecnología en los cultivos debido a los niveles de expresión que se observan en etapas tardías, recomendando monitoreos constantes para establecer las líneas base de cada insecto problema y evitar con ello el desarrollo de resistencias en los insectos blanco.

Para el caso de la proteína Cry2Ab en hoja, bellotas y cuadros los resultados demuestran que existe variación y diferencia de expresión en el tejido analizado entre las diferentes fechas y campos estudiados. Bakhsh *et al.* (2012) observaron que la expresión del gen Cry2Ab sufre variaciones entre las variedades estudiadas, al igual que en los distintos tejidos que la conforman. Monsanto (2011) indicó que las variaciones de expresiones génicas dependen de los periodos de producción, fisiología de cada planta, variabilidad genética de cada planta, condiciones medioambientales y de las prácticas agrícolas; además que pueden existir variaciones entre plantas de un mismo lote y que la conformación celular puede comprometer la expresión de las proteínas añadidas al genoma de la planta.

Wessel *et al.* (2001) sugirieron que la actividad de la región promotora del transgen puede ser caracterizada solamente por la distribución de los diferentes niveles de expresión en la planta, a cada nivel (o tejido) ocurre un comportamiento distinto. La característica de expresión temporal y espacial de un transgen en diferentes líneas transgénicas independientes debe ser intrínseco a la actividad del promotor. Por lo tanto, el promotor quien es el que dirige la expresión del transgen tiene comportamientos distintos en cada tipo de células en la planta, definiendo la regulación espacial de la expresión (Head and Greenplate, 2012).

Conclusiones

Se logró estandarizar metodologías moleculares para el análisis de expresión génica y cuantificación de las proteínas conferidas en las dos variedades de algodón GM cultivado en el Valle del Yaqui.

El análisis Elisa permitió determinar la concentración de cada una de las proteínas a lo largo del desarrollo fenológico de la variedad estudiada y en cada sitio.

Las tendencias de expresión observadas, niveles y estadio de desarrollo del cultivo, ratifican la información que se ha publicado sobre los algodones GM empleados en el estudio. Como se esperaba, se observaron valores máximos de expresión en las fases iniciales del cultivo.

Las técnicas de RTq-PCR y ELISA son adecuadas para evaluar la expresión espacial y temporal de genes que se confieran a plantas GM. La utilización de estas técnicas permitirá generar información necesaria para el análisis de riesgo, en lo particular para caracterizar exposición, a nuevos cultivos GM que se pretenda liberar al medio ambiente y posteriormente introducirse a la cadena alimentaria.

Literatura citada

- Adamczyk, J. and Meredith, W. 2004. Genetic basis for variability of Cry1Ac expression among commercial transgenic *Bacillus thuringiensis* (Bt) cotton cultivars in the United States. *J. Cotton Sci.* 8:17-23.
- Adamczyk, J. and Gore, J. 2004. Development of bollworms, *Helicoverpa zea* (Boddie), on two commercial Bollgard cultivars that differ in overall Cry1Ac level. *J Insect Sci.* 4:32-41.
- Adamczyk, J.; Perera, J. and Meredith, W. 2009. Production of mRNA from the Cry1Ac transgene differs among Bollgard lines which correlate to the level of subsequent protein. *Transgenic Res.* 18:143-149.
- Bakhsh, A.; Rao, A.; Shahid, A. and Husnain, T. 2012. Spatio temporal expression pattern of an insecticidal gene (cry2A) in transgenic cotton lines. *Not. Sci. Biol.* 4(4):115-119.
- Bayer. 2012. Solicitud de permiso de liberación al ambiente del algodón genéticamente modificado Bollgard II®/solución faena Flex® (MON-15985-7 x MON-88913-8) en etapa comercial en los estados de Baja California y Sonora. <http://senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=24192yIdUrl=50472>.
- Bustin, S.; Benes, V.; Garson, J.; Hellems, J.; Huggett, J.; Kubista, M. and Wittwer, C. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry.* 55(4):611-622.
- Corona, B.; Uffo, O. and Martínez, S. 2006. Detección de organismos genéticamente modificados (OGMs) en la cadena alimentaria. *Rev. Salud Anim.* 28(2):69-78.
- Dinon, A.; Prins, T.; Van Dijk, J.; Arisi, A.; Scholtens, I. and Kok, E. 2011. Development and validation of real-time PCR screening methods for detection of cry1A. 105 and cry2Ab2 genes in genetically modified organisms. *Analy. Bioanaly. Chem.* 400(5):1433-1442.
- Dohare, A. and Tank, S. 2014. Identification of Cry1Ac and Cry2ab proteins in transgenic cotton seeds available in Gujarat (India) by ELISA method. *J. Exp. Biol.* 2(1):43-48.
- Elenis, D. S.; Kalogianni, D. P.; Glynou, K.; Ioannou, P. C. and Christopoulos, T. K. 2008. Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 392(3), 347-354.
- Greenplate, J.; Mullins, J.; Penn, S.; Dahm, A.; Reich, B.; Osborn, J. and Shappley, Z. W. 2003. Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. *J. Appl. Entomol.* 127(6):340-347.

- Head, G. P. and Greenplate, J. 2012. The design and implementation of insect resistance management programs for Bt crops. *GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain*. 3:3 144-153.
- ICAC. 2008. International Cotton Advisory Committee Cry 1Ac Expression in Biotech Cotton. *The Icac Recorder*. 26. No. 1.
- ISAAA. 2017. Global status of commercialized biotech/gm crops in 2017: biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 years. ISAAA Brief No. 53. ISAAA: Ithaca, NY.
- Jamal, A.; Ko, K.; Hyun-Soon, K.; Young-Kug, Ch.; Joung, H. and Kisung, K. 2009. Role of genetic factors and environmental conditions in recombinant protein production for molecular farming. *Biotechnol. Adv.* 27:914-923.
- Kang, J. S. 2012. Expression of epithelial cell adhesion molecule in early phase of hepatocarcinogenesis of mice treated with diethylnitrosamine. *J. Bio. Res.* 13(3):243-247.
- Karuri, H.; Amata, R.; Amugune, N. and Waturu, C. 2013. Reproduction of root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on Bt cotton expressing Cry1Ac and Cry2Ab2 protein. *J. Appl. Bio.* 69:5487-5495.
- Kavanagh, I.; Jones, G. and Nayab, S. N. 2011. Significance of controls and standard curves in PCR. *PCR troubleshooting and optimization: the essential guide*. 67 p.
- Kranthi, K. R.; Naidu, S.; Dhawad, C. S.; Tatwawadi, A.; Mate, K.; Patil, E.; Bharose, A. A.; Behere, G. T.; Wadaskar, R. M. and Kranthi, S. 2005. Temporal and intra-plant variability of Cry1Ac expression in Bt-cotton and its influence on the survival of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Noctuidae: Lepidoptera). *Curr. Sci.* 89:291-298.
- Knight, K.; Head, G. and Rogers, J. 2013. Season-long expression of Cry1Ac and Cry2Ab proteins in Bollgard II cotton in Australia. *Crop Protec.* 44:50-58.
- Larbouga, B.; Denys, S.; Bernard, T. C.; Oula, T.; Jacob, S. and Karim, T. 2013. Assessment of Bollgard II cotton pollen mediated transgenes flow to conventional cotton in the farming conditions of Burkina Faso. *Afr. J. Biotechnol.* 12(33):5192-5199.
- Lipton, C.; Dautlick, J.; Grothaus, G.; Hunst, P.; Magin, K.; Mihaliak, C.; Rubio, F. and Stave, J. 2000. Guidelines for the validation and use of immunoassays for determining of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients. *Food Agric. Immunol.* 12:153-164.
- Monsanto. 2011. Bollgard II Cotton Technical Manual. <http://www.monsanto.com/global/au/products/documents/bollgard-ii-technical-manual.pdf>.
- Pla, M.; La Paz, J. L.; Peñas, G.; García, N.; Palaudelmás, M.; Esteve, T. and Melé, E. 2006. Assessment of real-time PCR based methods for quantification of pollen-mediated gene flow from GM to conventional maize in a field study. *Transgenic Res.* 15(2):219-228.
- Shan, G.; Embrey, S. and Schafer, B. 2007. A highly specific enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Cry1Ac insecticidal crystal protein in transgenic WideStrike cotton. *J. Agric. Food Chem.* 55(15):5974-5979.
- Sivasupramaniam, S.; Moar, W.; Ruschke, L.; Osborn, J.; Jiang, C.; Sebaugh, J. and Greenplate, J. 2008. Toxicity and characterization of cotton expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Ab2 proteins for control of lepidopteran pests. *J. Econ. Entomol.* 101(2):546-554.
- Wan, P.; Zhang, Y.; Wu, K. and Huang, M. 2005. Seasonal expression profiles of insecticidal protein and control efficacy against *Helicoverpa armigera* for Bt cotton in the Yangtze River valley of China. *J. Econ. Entomol.* 98:195-201.

- Wang, S.; Guo, A.; Zheng, W.; Zhang, Y.; Qiao, H. and Kennedy, I. 2007. Development of ELISA for the determination of transgenic Bt-cotton using antibodies against Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD-73. Eng. Life Sci. 7:1-7.
- Xia, L.; Xu, Q. and Guo, S. 2005. Bt insecticidal gene and its temporal expression in transgenic cotton plants. Acta Agron. Sin. 31:197-202.