

# EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADA EN LA PRODUCCIÓN DEL COCTEL ENZIMÁTICO DE *Chrysoperla carnea* (Stephens) BAJO CONDICIONES DE AYUNO Y ALIMENTO

Córdova López Gonzalo (1); Hernández Guzmán Gustavo (2)

1 [Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica del Centro] | [gonzalocorlop96mail.com]

2 [Departamento de alimentos, División de Ciencias de la Vida, Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [gustavohdz@ugto.mx]

## Resumen

Los procesos que implican la expresión de genes son de gran importancia para el desarrollo, la supervivencia y las funciones metabólicas que realicen los microorganismos y organismos entre otros aspectos. *Chrysoperla carnea* ha sido ampliamente reconocida como un excelente agente de control biológico y se sabe que la forma en cómo actúa depende de la capacidad de detección de la presa (volátiles) y la secreción de un coctel enzimático que afecta la capacidad motriz de la presa lo que culmina en la completa ingestión del material interno de la presa. Existen muy pocos reportes acerca de los mecanismos moleculares implicados en la secreción del coctel enzimático por lo que aún se desconoce su composición. En el presente trabajo se logran dar algunas herramientas capaces de ayudar a esta labor. La aplicación del Random Hexamers en el RT propicia a la síntesis más eficaz de las librerías de cDNA del contenido intestinal de la larva, el uso de los oligos LepF1 + MLepR1 y MLepF1 + Lep R1 para amplificación de COI en PCR dan mejores resultados que los oligos que amplifican fragmentos más grandes.

## Abstract

The processes that involve gene expression are of great importance for the development, survival and metabolic functions, among other aspects performed by microorganisms and multicellular organisms. *Chrysoperla carnea* has been widely recognized as an excellent agent of biological control and it is known their hunt success depends on the ability to detect the prey (volatile compounds) and the secretion of an enzyme cocktail that affects the motor capacity of the prey which culminates in the complete ingestion of the internal material of the prey. There are very few reports on the molecular mechanisms involved in the secretion of enzyme cocktail, so its composition is still unknown. In the present work we are able to give some tools able to help this work. The application of Random Hexamers in the RT favors the more efficient synthesis of cDNA libraries of the intestinal contents of the larva, the use of oligos LepF1 + MLepR1 and MLepF1 + Lep R1 for amplification of COI in PCR give better results than the oligos that amplify larger fragments.

## Palabras Clave

*Chrysoperla carnea*; Coctel enzimático; Citocromo oxidasa; Transcriptómica; cDNA

## INTRODUCCIÓN

En 2015 se estimó una población mundial total de 7 349 472 de personas [1] y se proyecta que para el 2050 crezca por encima de los 9 mil millones lo que contribuye a la creciente demanda en el aumento de la producción de alimentos [2], por tal motivo, actualmente y ante las continuas pérdidas de cultivos causadas por insectos la investigación se está enfocando en la búsqueda de nuevas herramientas que reduzcan las pérdidas causadas por estos [3] debido a que el control químico se ve comprometido por la habilidad de los organismos a desarrollar resistencia [2];[4].

Las medidas de control biológico representan una alternativa viable para el manejo y control de las plagas de entre las cuales destacan las crisopas verdes (Neuroptera: Chrysopidae) las cuales son importantes predadores de plagas de artrópodos y son encontradas en muchos cultivos hortícolas y hortalizas agrícolas, incluyendo vegetales, frutas, cascara de frutos y cultivos forrajeros, plantas ornamentales y cultivos de bosques [5] y debido a su alta tolerancia a diversos factores ambientales y pesticidas tiene potencial como agente de control biológico [6].

*Chrysoperla carnea* (Stephens) ha sido ampliamente reconocida como un predador [4], en México es la más abundante en todos los ecosistemas [7] y se encuentra como una de las especies de control biológico más usadas en Norte América [8].

La voracidad de las larvas las ha convertido en uno de los más importantes agentes de control biológico de insectos plaga, como áfidos, cóccidos, mosquitas blancas, psílidos, huevos y larvas de mariposas, escarabajos, moscas y otros neurópteros, además de ácaros y otros artrópodos de cuerpo blando que se localizan en el follaje de plantas de mucho interés económico [9], pero, ¿a qué se debe su eficacia como organismo de control biológico?.

Todas las larvas de crisoperla son característicamente voraces [8] y se sabe que sus mecanismos para localizar a sus presas incluyen la detección de ciertos volátiles inducidos por infestaciones de áfidos [10] a los que una vez localizados sujeta con sus mandíbulas (evitando que escape), con las cuales perfora su cutícula y

sus puntas serradas ayudan a lacerar los tejidos internos [11]. Posteriormente *Chrysoperla* inyecta un líquido que presumiblemente es producido en el aparato digestivo del insecto pero aún se desconoce la conformación de esta sustancia, por lo que resulta imprescindible el revelar los componentes de la misma, los cuales pueden estar regulados por procesos transcriptómicos ya que existen reportes de insectos en los que la exposición a ciertas condiciones inducen la expresión de algunos genes, tal es el caso de los insectos que viven a base de dietas de plantas ricas en inhibidores de tripsina los cuales han desarrollado dos mecanismos diferentes de digestión eficiente de proteínas, mientras que los Lepidópteros expresan un elevado número de diferentes isoformas de serina proteasa con diferentes estructuras de sitio activo para evitar la inhibición. Hemiptera desarrolló un sistema digestivo basado en cisteína proteasas, con máxima actividad en condiciones ácidas [12], en el caso de *Drosophila melanogaster* el mecanismo de protección altamente conservado se regula a nivel transcripcional por el factor de transcripción Heat-Shock (HS) el cual activa potentemente la expresión de HS genes, resultando en la acumulación de chaperones moleculares, las proteínas HS (HSPs), las cuales ayudan a la célula a lidiar con el estrés inducido. La expresión génica a nivel transcripcional es incluso fundamental para el desarrollo [13], como describe Ramalho-ortigão et al., 2007 para los flebótomos, la harina de sangre como estrategia de alimentación, es responsable de la inducción de varios procesos fisiológicos que culminan en el desarrollo y maduración del huevo.

Los procesos transcriptómicos son de gran importancia tanto en el desarrollo [14] como en condiciones que desafíen la naturaleza metabólica del organismo [12], por tal motivo el presente trabajo enfoca sus esfuerzos en la caracterización de los mecanismos moleculares involucrados en la secreción de la sustancia encargada de la parálisis de la presa [11] y posterior a la succión de todo el licuado de la presa y el abandono del exoesqueleto [15].

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta y tratamiento de larvas

Las larvas fueron proporcionadas por el Dr., Manuel Darío Salas Araiza profesor investigador de la DICIVA quien proporcionó un total de 71 larvas.

### Tratamientos

Se realizaron dos tratamientos de los cuales se llevó a cabo una repetición por tratamiento. El primer tratamiento consistió en la alimentación de las larvas con huevecillos de la especie *Plodia interpunctella* y se colectaron intestinos en las 0, 1, 3, 5 y 10 horas. El segundo tratamiento consistió en mantener a las larvas en ayuno y se hicieron las colectas de intestinos en las horas antes mencionadas. A continuación, se menciona el número de intestinos colectados por hora y repetición.

Tabla 1: Número de crisopas por hora y repetición.

Hora	T. Alimento		T. Ayuno	
	No. De larvas		No. De larvas	
		R1		R1
0	5	3	5	2
1	5	3	5	3
3	5	3	5	3
5	5	2	5	2
10	5		5	

### Colecta de intestinos

Los intestinos fueron colectados usando un equipo de disección y un estereoscopio para tener mejor visualización de las larvas. Posterior a la disección los intestinos fueron puestos en 400 µL de RNA<sup>later</sup>® Solution (Ambion®) y mantenidos a -20 °C hasta la extracción del RNA total.

### Extracción de RNA total

La extracción del RNA total fue llevado a cabo empleando el protocolo de extracción de TRIzol™ Reagent (Invitrogen).

### RT-PCR

La síntesis de la hebra de cDNA se llevó a cabo empleando el protocolo de SuperScript® (Invitrogen) empleando oligo dT y random hexamers.

La amplificación por PCR se llevó a cabo usando la metodología descrita en Hebert et al. 2004 utilizando oligonucleótidos para amplificar COI mitocondrial.

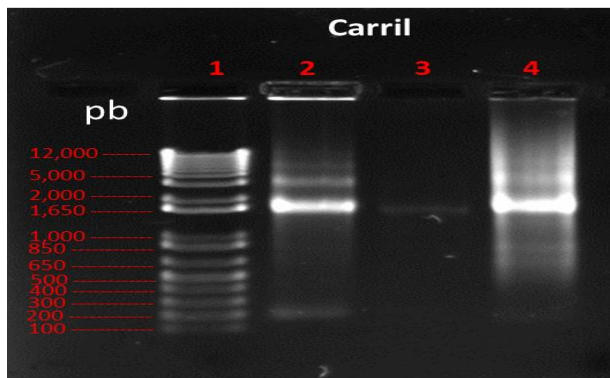
### Cuantificación y lectura en gel de electroforesis

La cuantificación y lectura de integridad se llevó a cabo usando un NanoDrop (Thermo Fisher).

Se cargaron 0.5 µg de RNA por carril en un gel de electroforesis con 0.8% de agarosa a 75 V por 42 minutos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

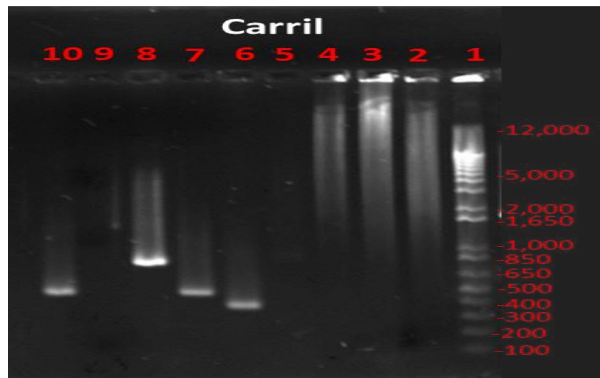
Se realizaron una serie de ensayos en los que el RNA total extraído correspondía a un total de 3 crisopas y las lecturas en gel de agarosa 0.8% daban muestra clara de que el protocolo de extracción había tenido éxito, aunque había ocasiones en los que el RNA total no era suficiente por lo que se prosiguió a realizar ensayos de extracción con 10 intestinos y la lectura de RNA en gel de agarosa mostraron una gran cantidad, a partir de este punto de referencia se prosiguió a realizar extracciones de 5 intestinos, lo que mostró buena cantidad y calidad del RNA total ya que incluso las lecturas en NanoDrop lo constataban; el protocolo de extracción con 5 intestinos fue el seleccionado por su efectividad con la mayoría de las muestras.



**IMAGEN 1:** Carril 2, extracción de RNA total de 5 intestinos; carril 3, extracción de RNA total de 3 intestinos; carril 4, extracción de RNA total de 10 intestinos.

Los RT-PCR fueron realizados siguiendo el protocolo ya mencionado, primeramente se realizó con los oligos dT; el primer motivo por el que se realizó la librería de cDNA primeramente con estos oligos fue para constatar que había presencia de mRNAs, debido a que estos transcriben los RNAs que poseen colas de poli(A) en el extremo 3' (esta cola es necesaria para el empalme, transporte, traducción y estabilidad [17]) los cuales pertenecen a mRNAs de células eucariotas [18]. Seguidamente se realizó el mismo procedimiento pero esta vez usando el Random Hexamers, el cual tiene la capacidad de alinearse a cualquier fragmento de RNA en cualquier posición de la cadena y posteriormente transcribir para cDNA, independientemente de la cola de poli(A) [18], posteriormente se amplificó mediante técnica PCR usando los oligos LepF1 + LepR1 los cuales amplifican un fragmento de 648 pb COI mitocondrial, de igual manera se hicieron las siguientes combinaciones de oligos LepF1 + MLepR1 y MLepF1 + Lep R1, estos amplifican fragmentos de 311 y 407 pb respectivamente.

De estas combinaciones de oligos se determinó que la síntesis de la hebra de cDNA se lleva a cabo de mejor forma empleando el Random Hexamers, lo cual se constató al usar los oligos que amplifican para 311 y 407 pb por técnica de PCR, lo que puede deberse a la gran cantidad de librerías de cDNA obtenidas gracias a la inespecificidad de alineamiento del Random Hexamers y que gracias a este es más probable que la síntesis de las hebras tenga mayor posibilidad de terminar en el extremo 5', aspecto contrario a la síntesis con los oligos dT [18].



**IMAGEN 2:** Carriles 2, 3 y 4, RT usando oligos dT; carriles 5, 6 y 7, RT usando oligos Random Hexamers; carriles 8, 9 y 10, DNA control. PCR: la mezcla de oligos LepF1 + LepR1 corresponde a los carriles 2, 5 y 8; la mezcla de oligos LepF1 + MLepR1 corresponde a los carriles 3, 6 y 9; la mezcla de oligos MLepF1 + Lep R1 corresponde a los carriles 4, 7 y 10.

## CONCLUSIONES

La extracción de RNA total a partir de 5 crisopas es efectiva, además que se reduce el uso de material, reactivos y tiempo.

El uso de Random Hexamers para la obtención de las librerías de cDNA muestran mayor éxito con el uso de los oligos LepF1 + MLepR1 y MLepF1 + Lep R1, en comparación con los oligos, dT los cuales muestran menor capacidad de obtención de librerías de cDNA.

Del experimento, en el tratamiento alimentado se espera que la expresión de serine proteasa en las horas 2, 3 y 5 sea mayor, así como la expresión de otros genes; en el tratamiento de ayuno se espera que la expresión sea mínima e incluso permanezca constante durante todo el experimento; aún nos encontramos trabajando sobre este propósito.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al financiamiento otorgado por el Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Tabasco (CCYTET) y a la Universidad Politécnica del Centro por la oportunidad que me dieron de poder participar en este verano de investigación científica, así como al Dr. Gustavo Hernández Guzmán quien me brindó las herramientas y el apoyo necesario para la realización de este proyecto.

## REFERENCIAS

- [1] U. Nations, "Population and Vital Statistics Report Population and," Econ. Soc. Aff., vol. LXIX, pp. 1–27, 2017.
- [2] B. C. Gerwick and T. C. Sparks, "Natural products for pest control : an analysis of their role, value and future," no. November 2013, 2014.
- [3] A. Flávia, C. Martinez, L. G. De Almeida, L. Alberto, B. Moraes, and F. L. Cônsoli, "Tapping the biotechnological potential of insect microbial symbionts : new insecticidal porphyrins," pp. 1–10, 2017.
- [4] A. Errard et al., "Metabolite Profiling Reveals a Specific Response in Tomato to Predaceous Chrysoperla carnea Larvae and Herbivore ( s ) -Predator Interactions with the Generalist Pests Tetranychus urticae and Myzus persicae," vol. 7, no. August, pp. 1–14, 2016.
- [5] K. G. Amarasekare and P. W. Shearer, "Life History Comparison of Two Green Lacewing Species Chrysoperla johnsoni and Chrysoperla carnea (Neuroptera : Chrysopidae) Life History Comparison of Two Green Lacewing Species Chrysoperla johnsoni and Chrysoperla carnea (Neuroptera : Chrysopidae)," BioOne, vol. 42, no. 5, pp. 1079–1084, 2013.
- [6] S. Koczor, F. Szentkirályi, J. A. Pickett, and M. A. Birkett, Aphid Sex Pheromone Compounds Interfere with Attraction of Common Green Lacewings to Floral Bait. 2015.
- [7] Valencia et al., "NEUROPTERA) EN EL ESTADO DE MORELOS, MÉXICO," 2006.
- [8] T. Chen, C. Chu, C. U. I. Hu, and J. Mu, "Observations on Midgut Structure and Content of Chrysoperla carnea (Neuroptera : Chrysopidae)," pp. 917–919, 2006.
- [9] M. B. Nájera Rincón and B. Souza, Insectos Benéficos. Guía Para Su Identificación. 2010.
- [10] J. Z. J. J. Obycki, S. A. Ochieng, T. C. Baker, and J. A. P. D. Smiley, "Attraction of two lacewing species to volatiles produced by host plants and aphid prey," pp. 277–281, 2005.
- [11] P. McEwen, T. New, and A. Whittington, Lacewings in the Crop Environment, Edited by. 2001.
- [12] P. J. Waniek, C. A. C. Araújo, M. M. Momoli, P. Azambuja, A. M. Jansen, and F. A. Genta, "Serine carboxypeptidases of Triatoma brasiliensis ( Hemiptera , Reduviidae ): Sequence characterization , expression pattern and activity localization," J. Insect Physiol., vol. 63, pp. 9–20, 2014.
- [13] F. M. Duarte, N. J. Fuda, D. B. Mahat, L. J. Core, M. J. Guertin, and J. T. Lis, "Transcription factors GAF and HSF act at distinct regulatory steps to modulate stress-induced gene activation," pp. 1731–1746, 2016.
- [14] M. Ramalho-ortigão et al., "Exploring the midgut transcriptome of Phlebotomus papatasi : comparative analysis of expression profiles of sugar-fed, blood-fed," vol. 17, pp. 1–17, 2007.
- [15] A. C. Cohen, "EXTRA-ORAL DIGESTION IN PREDACEOUS TERRESTRIAL," pp. 85–103, 1995.
- [16] P. D. N. Hebert, E. H. Penton, J. M. Burns, D. H. Janzen, and W. Hallwachs, "Ten species in one : DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*," 2004.
- [17] T. H. Beilharz and T. Preiss, "Widespread use of poly ( A ) tail length control to accentuate expression of the yeast transcriptome Widespread use of poly ( A ) tail length control to accentuate expression of the yeast transcriptome," Rna, vol. 13, no. 7, pp. 982–997, 2007.
- [18] ThermoFisher SCIENTIFIC, "Reverse Transcription Setup," 2017. [Online]. Available: [http://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-setup.html#rt\\_a4](http://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-setup.html#rt_a4). [Accessed: 18-Jul-2017].