

# CREACIÓN DE UNA LIBRERÍA METAGENÓMICA DEL APARATO DIGESTIVO DE *CHRYSOPERLA CARNEA*

Jiménez Castillo Sandra G. (1), Hernández Guzmán Gustavo (2)

1 [Ingeniería en Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [sg.jimenezcastillo@hotmail.com, sg.jimenezcastillo@ugto.mx]

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

## Resumen

El presente trabajo consta de un análisis preliminar en el que se pretenden obtener conocimientos básicos de las comunidades bacterianas presentes en el intestino de la larva de *C. carnea*, se comenzó con la disección del intestino de la crisopa, seguido de la extracción del DNA total y un concentrado bacteriano del contenido intestinal, a partir del cual fueron aisladas en medios LB y R2A, posteriormente se extrajo el DNA cromosómico bacteriano y se llevó a cabo un PCR 16S del mismo, la secuenciación nos permitirá identificar las bacterias, para sí poder asociar su actividad con la secreción digestiva que paraliza a sus presas.

## Abstract

This work consists of a preliminary analysis in which we tried to obtain basic knowledge of the bacterial communities present in the gut of *C. carnea*, we began with the dissection of Chrysoperla gut, followed by the extraction of the total DNA and a bacterial concentrate of the intestinal contents. Bacteria were isolated in LB and R2A plates, then bacterial chromosomal DNA was extracted and a 16S PCR was carried out, the sequencing will allow us to identify the bacteria, in order to be able to associate its activity with the digestive secretion that paralyzes their prey.

### Palabras Clave

DNA; Intestino; Géneros bacterianos; Secuenciación

## INTRODUCCIÓN

### Género *Chrysoperla*

Las larvas del género *Chrysoperla spp.* son agentes controladores muy exitosos de insectos plaga. Utilizan una estrategia eficiente para atrapar a su presa e inyectar un líquido que digiere sus tejidos internos. La secreción que produce *Chrysoperla* puede contener actividades enzimáticas muy interesantes y completamente nuevas por lo cual es muy necesaria una investigación que permita conocer los detalles bioquímicos y moleculares de la producción de la secreción digestiva, su composición y cuáles son los genes que participan en la producción de la misma.

*C. carnea* se encuentran en todos los ecosistemas del mundo, excepto en los polos y en Australia. Son insectos con ciclos biológicos que cuentan con un estado larvario y los adultos poseen alas. Los adultos son de coloración verdosa, miden cerca de 15 mm de longitud, tienen alas membranosas con numerosas venas transversales y longitudinales, antenas filiformes y aparato bucal masticador [1]; [2]; [3].

Tienen tres estadios larvarios (instar) con tamaños desde alrededor de 1 mm en el primer instar, hasta 6-8mm en el tercero. De todas las 8 especies de *Chrysoperla* identificadas en México, *C. carnea* es la más abundante en todos los ecosistemas [4] y se la considera como el insecto modelo de este tipo de depredadores. A pesar de ser insectos con características tan interesantes, se conoce poco sobre la estrategia predatoria que utiliza *Chrysoperla*. Una vez que la presa es localizada, *C. carnea* lo sujeta con sus mandíbulas, perfora su cutícula y sus puntas serradas ayudan a lacerar los tejidos internos [3]. Posteriormente *Chrysoperla* inyecta una secreción digestiva.

### Secreción digestiva de *Chrysoperla*

Los primeros estudios indican que inyecta un veneno cuya composición es desconocida y que era producido por unas glándulas situadas en la base de las mandíbulas [5]; [3] sin embargo estudios posteriores indicaron que muy probablemente este líquido es más complejo y es producido en el intestino superior (estomodeo y mesenterón) [6].

Después de la inyección del líquido, *Chrysoperla* succiona y vuelve a inyectar el mismo líquido (regurgitación) y luego de una serie de ciclos de inyección y regurgitación (no se sabe exactamente cuántos), succiona todo el licuado de la presa y abandona el exoesqueleto [7]. Esta estrategia de alimentación, también llamada digestión extra-oral [7]; [5], es altamente conservada en artrópodos predadores y evolucionó independientemente en Heteróptera, Neuróptera y Coleóptera [5].

### Metagenómica

Se trata de un campo nuevo en el que se persigue obtener secuencias del genoma de los diferentes microorganismos, bacterias en este caso, que componen una comunidad, extrayendo y analizando su ADN de forma global. Es una ciencia que surge como una rama de las ciencias genómicas, la cual se refiere al estudio del metagenoma de un nicho en particular [8]; [9]. La importancia de conocer qué tipo de bacterias coloniza determinado ambiente proporciona información para poder asociar actividades microbianas a ciertas poblaciones.

### Comunidad microbiana del intestino de *C. carnea*

Se observaron poblaciones bacterianas densas a lo largo del lumen del intestino medio de larvas de *C. carnea*, la función de dichas bacterias es desconocida [6].

Se sabe que muchas especies de insectos tienen relaciones simbióticas con microorganismos que se producen en sus canales alimentarios. Algunas especies están contenidas en células de bacteriocitos especializadas, mientras que en otras, los microorganismos están libres en la luz

intestinal [10]. Para las larvas de *C. carnea*, las bacterias están libres en el lumen [10]. Las bacterias también se encontraron en el canal alimenticio de *C. rufilabris* adultos [11]; [12], y sus datos indican que las bacterias son transitorias y no son verdaderos residentes de los canales alimentarios.

La identificación de las bacterias encontradas de *C. carnea* es de suma importancia, ya que de ser estas las productoras de la secreción y no las glándulas situadas en la mandíbula de la crisopa, su empleo en el manejo de plagas de insectos tendría un gran potencial. Es por eso que en el presente trabajo se pretende determinar el tipo de bacterias que colonizan el intestino de las larvas de *C. carnea* y conocer si poseen actividades enzimáticas relacionadas con las observadas en su intestino.

La investigación comienza con la disección del intestino de *C. carnea*, seguido del aislamiento del DNA del intestino y del DNA cromosómico de las bacterias presentes en este, así como un análisis morfológico de las mismas, posteriormente se realizó un amplificación por PCR del gen 16S para construir una librería metagenómica de la comunidad bacteriana del intestino de la crisopa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Disección de intestino de *C. carnea*

Fueron proporcionados lotes de larvas de *C. carnea* semanalmente, las cuáles fueron sacrificadas por congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Posteriormente se colocaron en RNA later y empleando un kit quirúrgico y un microscopio estereoscópico, se cortó el ano y extrajo el tubo digestivo, finalmente se cortó la cabeza. Las muestras fueron procesadas inmediatamente.

### Aislamiento de DNA total

Se colocaron los intestinos colectados en TE y posteriormente se siguió el protocolo del kit de extracción de ADN (PowerLyzer, Power soil DNA Isolation Kit, MO BIO).

### Preparación de DNA cromosómico bacteriano del intestino

Se extrajo el contenido intestinal, se extrajo un concentrado bacteriano-glicerol, se cultivaron las bacterias intestinales de la crisopa en los medios R2A y LB y posteriormente se hizo tinción de Gram de las diferentes colonias observadas; finalmente por un método químico enzimático se extrajo el DNA cromosómico bacteriano.

### Amplificación de gen ribosomal bacteriano 16S

Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa, usando como sustrato el DNA cromosómico bacteriano y adecuando una mezcla de reacción; para esto se programó el protocolo siguiente en el termociclador:  $94^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos (desnaturalización),  $45^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos (hibridación) y  $72^{\circ}\text{C}$  por 1:10 minutos (polimerización) durante 30 ciclos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

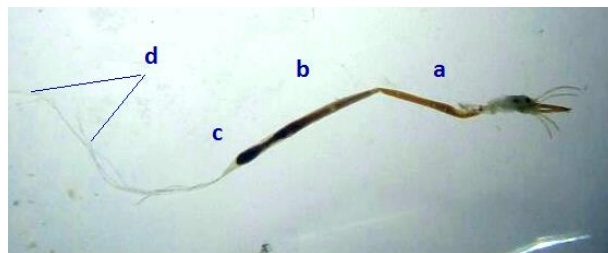
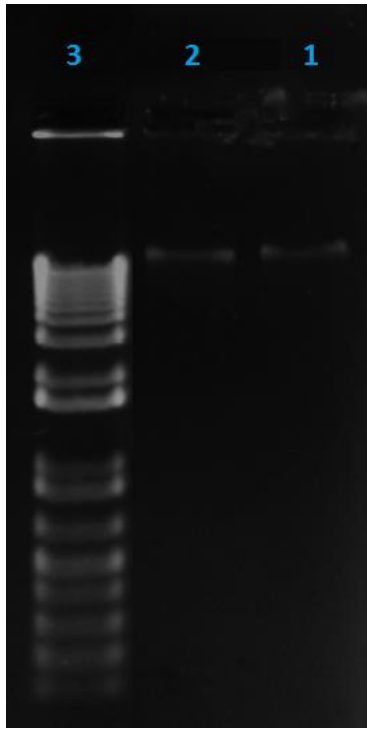
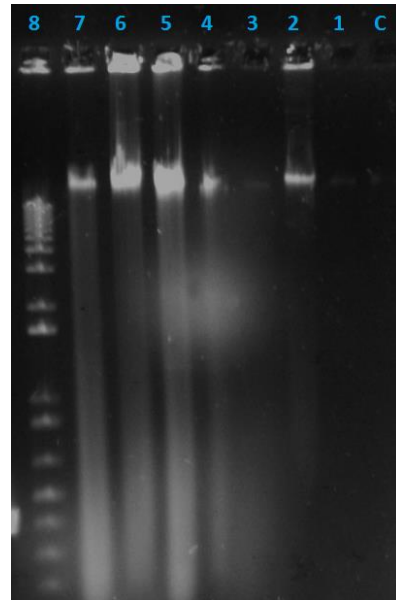


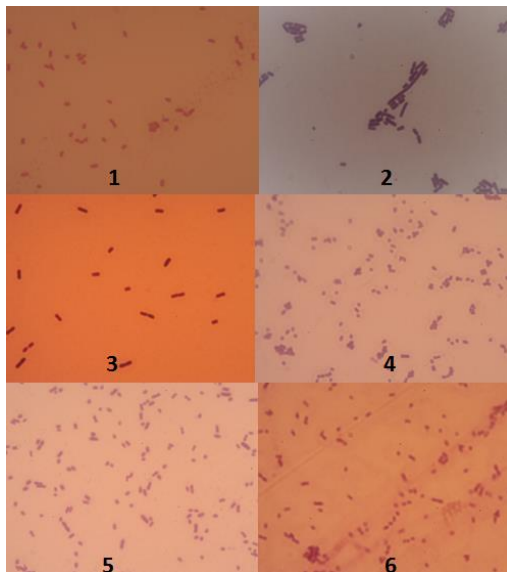
Figura 1: Intestino extraído de *C. carnea* (a) Estomodeo; (b) Mesénteron; (c) Proctodeo; (d) Túbulos de Malpighi



**Figura 2:** Aislamiento de DNA total del intestino de *C. carnea* (Carriles 1 y 2) Bandas correspondientes al DNA total (Carril 3) Marcador de peso molecular 1Kb



**Figura 4:** Extracción de DNA cromosómico bacteriano del contenido intestinal de *C. carnea* (Carriles1-7) Bandas correspondientes al DNA cromosómico bacteriano; (Carril c) Control establecido; (Carril 8) Marcador molecular

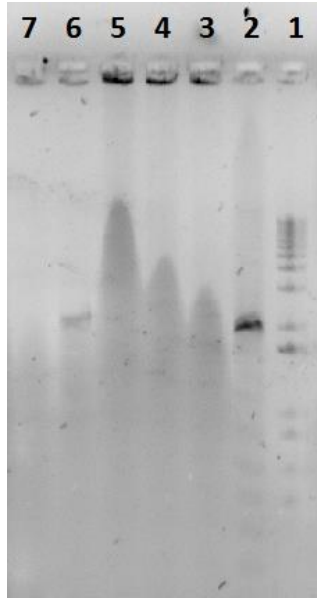


**Figura 3:** Bacterias aisladas del intestino de *C. carnea* (1,3) corresponden a bacterias Gram negativas; (2,4,5,6) corresponden a bacterias Gram positivas, comprobado con el método de KOH al 3% [13].

En la figura 1, se muestra el intestino de la crisopa completo, en el cual como se describe se pueden observar las 3 partes en las que se divide estomodeo (a), mesénteron (b) y proctodeo (c); además se logra apreciar claramente los túbulos de Malpighi (d). De las diferentes bacterias que habitan en dicho intestino y crecieron en los distintos medios, tras la tinción Gram y corroborando con el método de KOH 3% [13], se obtuvieron en la figura 3, en 1 y 3 bacterias Gram negativas, mientras que en las restantes Gram positivas; se puede observar la presencia de cocos y bacilos.

En la figura 2 se pueden observar ambas bandas bien definidas correspondientes al DNA total del intestino, cuyo tamaño es mayor a las 12000 pb. Por otro lado en la figura 4 correspondiente al DNA bacteriano en los carriles 1 y 3 se logra ver una banda definida, mientras que en el resto de los carriles las bandas no están tan definidas

debiéndose a que hay un exceso de DNA, en ambos casos el tamaño es mayor a las 12000 pb.



**Figura 5: PCR 16S del DNA cromosómico bacteriano**

Cómo podemos observar en la figura 5, el PCR que se llevó a cabo no fue exitoso, pudiendo deberse a que el sustrato no era el más puro, aun así en el carril 5 se logró una amplificación al igual que en carril 2 (control), cuyo tamaño aproximadamente es de 2200 pb.

## CONCLUSIONES

El método de extracción del DNA total del intestino es el adecuado, pues se lograron obtener unas bandas bien definidas. Por otra parte las bacterias encontradas en el intestino de *Crisopa* corresponden a bacilos y cocos, las hay tanto Gram positivas como negativas, predominando las últimas en los diversos campos analizados. La extracción del DNA cromosómico bacteriano fue buena, sin embargo aún se podría mejorar para obtener una pureza mayor que se verá reflejada en unas bandas bien definidas, relacionado a esto el PCR obtenido de estas muestras no fue bueno, pues solo se generó una amplificación y no bien definida. Se trabajará en una nueva extracción de

DNA bacteriano y PCR 16S del mismo, para así al obtener la secuenciación se nos proporcione información para poder asociar las actividades microbianas con la secreción digestiva, o bien en el caso contrario darnos cuenta que no existe tal relación.

## AGRADECIMIENTOS

Gustavo Hernández Guzmán

Dalia Rodríguez Ríos

Manuel Darío Salas Araiza

## REFERENCIAS

- Juárez, Fernando Bahena. 2008. *Enemigos Naturales de Las Plagas Agrícolas Del Maíz y Otros Cultivos*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
- Nájera-Rincón, Miguel B., and Brígida Souza. 2010. *Insectos Benéficos. Guía Para Su Identificación*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
- McEwen, Peter. 2001. *Lacewings in the Crop Environment*. Edited by Cambridge University Press.
- Valencia Luna, Luis Aurelio, Jesús Romero Napoles, Jorge Valdez Carrasco, Jose Luis Sanchez Carrillo, and Victor Lopez Martinez. 2006. "Taxonomía y Registros de Chrysopidae (Insecta: Neuroptera) En El Estado de Morelos, México." *Acta Zoologica Mexicana* 22 (1): 17–61.
- Cohen, Allen Carson. 1995. "EXTRA-ORAL DIGESTION IN PREDACEOUS TERRESTRIAL": 85–103.
- Chen, Tian-ye, Chang-chi Chu, Cui Hu, Ji-yuan Mu, and Thomas J. Henneberry. 2006. "Observations on Midgut Structure and Content of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae)." *Annals of the Entomological Society of America* 99 (5) (September 1): 917–919.
- Cohen, Allen Carson. 1998. "Solid-to-Liquid Feeding: The Inside(s) Story of Extra-Oral Digestion in Predaceous Arthropoda." *American Entomologist*: 103–116.
- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). *Metagenomics: genomic analysis of microbial communities*. *Annual Review of Genetics*, 38, 525–52.
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Status of the Microbial Census, 68(4), 686–691.

10. Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., Banfield, J. F. (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 428(March), 37–43.
11. Woolfolk, S. W., and G. D. Inglis. 2003. Microorganisms associated with field-collected *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae) adults with emphasis on yeast symbionts. *Biol. Control* 19: 155–168.
12. Woolfolk, S. W., A. C. Cohen, and G. D. Inglis. 2004. Morphology of the alimentary canal of *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae) adults in relation to microbial symbionts. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97: 796–808.
13. Buck, J. D. (1982). Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4), 992-993