



CIENCIAS AGRARIAS Y DE LA PESCA

Contribución al conocimiento de la resistencia a la toxina Vip3A de *Bacillus thuringiensis* mediante el estudio comparativo del transcriptoma intestinal de una población resistente de *Heliothis virescens* (F.) mediante la metodología HT-SuperSAGE

UNIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), BioCubaFarma

AUTORES PRINCIPALES: Lianet Rodríguez Cabrera, Camilo Ayra Pardo, María Elena Ochogavía

Otros autores: Claudia Rodríguez de la Noval, Ivis Morán Bertot, Pilar Téllez Rodríguez, Daily Hernández Hernández, Orlando Borrás Hidalgo, Milagro Ponce Castillo, José Ángel Silva.

Colaboradores: Albis Riverón Hernández, Cigry Pérez, Sergio Cruz Castillo, Ivón Menéndez Valdez, Regla C. Estrada Vázquez, Omar Gell Cuesta, Lilianne López Nocedo, Cecilia Clark Watson

Filiación: CIGB, Grupo de Control de Insectos

RESUMEN

Palabras clave

resistencia; toxina Vip3A; *Bacillus thuringiensis*; transcriptoma de *Heliothis virescens*; HT-SuperSAGE

El gusano cogollero del tabaco *Heliothis virescens* F. (Lepidoptera: Noctuidae) es una plaga polífaga de alta importancia económica para Cuba y gran parte del hemisferio occidental. Para su control se utilizan las formulaciones basadas en *Bacillus thuringiensis* (Bt), así como la obtención de cultivos transgénicos que expresan la proteína insecticida Vip3A de Bt. La evolución de insectorresistencia constituye el principal riesgo para ambas tecnologías. En Cuba, el uso extensivo de formulaciones de Bt y la posibilidad de utilizar en el futuro un maíz transgénico que expresa Vip3A hacen necesario profundizar en la resistencia. En este trabajo, se realiza el estudio comparativo del transcriptoma de *H. virescens* entre una cepa resistente a Vip3A y su contraparte susceptible vía HT-SuperSAGE. Los resultados permitieron identificar factores asociados a la proteólisis de tipo serin-proteasas, la función traduccional y la biogénesis ribosomal como los más representados en el proceso de adaptación a la toxina. La baja expresión de la proteína ribosomal S2, presunto receptor de Vip3A, sugiere la pérdida de unión entre los posibles mecanismos de resistencia. La expresión diferencial según HT-SuperSAGE fue corroborada mediante qRT-PCR para un grupo de genes seleccionados por sus altos niveles de expresión en la cepa resistente o su conexión con etapas importantes de la patogénesis de Bt. Entre las principales novedades se encuentran: 1) primera publicación dedicada al estudio de las bases moleculares de la insectorresistencia a Vip3A, donde se evidencia la posible relevancia de procesos de síntesis/degradación de proteínas y biogénesis ribosomal en la resistencia; 2) primera publicación en bases de datos internacionales

del transcriptoma asociado a la resistencia a Vip3A, y 3) primera vez que se utiliza exitosamente la técnica HT-SuperSAGE en un lepidóptero no modelo, plaga de gran importancia para la región. La importancia práctica del trabajo reside en la identificación de múltiples factores génicos con alteración constitutiva en *H. virescens* cuya caracterización funcional permitirá esclarecer las bases de la resistencia a Vip3A, seleccionar marcadores moleculares de la resistencia y diseñar estrategias de manejo. El trabajo cuenta con una publicación en *Insect Science* (SCOPUS), revista oficial de la Sociedad Entomológica de China, una publicación en la Base de Datos Transcriptómicos GEO, de NCBI, presentaciones en congresos internacionales y avales de científicos destacados en las temáticas insectorresistencia, biocontrol y transcriptómica.

Las formulaciones basadas en la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Bt) comprenden el 99 % del mercado de los bioplaguicidas. Por otro lado, los genes de las proteínas insecticidas Cry1 y Vip3A de Bt se utilizan para conferir resistencia a lepidópteros plagas en los cultivos transgénicos de maíz, algodón y soya resistentes al ataque de insectos. La proteína Vip3A resulta de interés por su elevada actividad insecticida y su mecanismo de acción diferente a las tradicionales toxinas Cry1. La evolución de insectorresistencia a Bt y sus toxinas insecticidas continúa siendo el mayor riesgo que enfrentan ambas tecnologías. Aunque los principales mecanismos involucrados en la insectorresistencia contra las toxinas Cry1 se han comenzado a dilucidar, las bases moleculares de la resistencia hacia Vip3A siguen siendo una incógnita. En el presente trabajo se profundiza en los mecanismos de resistencia a Vip3A mediante el estudio comparativo del transcriptoma del gusano cogollero del tabaco *Heliothis virescens* F. (Lepidoptera: Noctuidae) entre una cepa resistente a Vip3A y su contraparte susceptible (línea isogénica).

En Cuba y gran parte de la región, el insecto *H. virescens* es una plaga importante del cultivo del tabaco, y de muchos otros, más por su naturaleza polífaga. Mediante una colaboración científica con el departamento de Ciencias de la Vida del Imperial College de London (Reino Unido) se pudo acceder a colonias de *H. virescens* resistentes (Vip-Sel) y susceptibles (Vip-Unsel) a Vip3A. Para el estudio del transcriptoma del insecto se utilizó la novedosa técnica HT-SuperSAGE, un método de secuenciación profunda basado en secuencias tag, que busca realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de la expresión génica. La expresión diferencial según HT-SuperSAGE fue corroborada mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR).

Desarrollo

La población Vip-Sel de *H. virescens* fue la primera que se obtuvo con resistencia a Vip3Aa. Las colonias de Vip-Sel

y la contraparte susceptible Vip-Unsel, se mantuvieron en el Imperial College London a una temperatura de 25 ± 2 °C, 70 % \pm 5 % de humedad relativa y fotoperiodo de 16:8h (luz:oscuridad) sobre dieta artificial. Inicialmente, Vip-Sel mostró una resistencia a Vip3Aa de más de 1000 veces que Vip-Unsel. Con el empleo de este valioso material se construyeron las genotecas SuperSAGE para estudiar el transcriptoma asociado a la resistencia a Vip3Aa y la información digital se empleó para análisis *in silico* de la expresión génica.

Antes del análisis molecular y producto de que la población Vip-Sel fue mantenida sin selección por varias generaciones para evitar interferencias con el efecto materno se realizaron nuevos bioensayos para determinar la tasa de resistencia. En este estudio, la cepa Vip-Sel resultó ser aún 234 veces más resistente ($LC_{50} = 103$ ppm; FL 95 % 46-226; pendiente \pm ES = 0.89 ± 0.15) a la protoxina Vip3Aa que la cepa Vip-Unsel ($LC_{50} = 0,44$ ppm; FL 95 % 0,30-0,64; pendiente \pm ES = $0,21 \pm 0,21$). El esquema utilizado para el análisis transcriptómico de la resistencia a Vip3Aa en *H. virescens*, así como los principales resultados del HT-SuperSAGE se muestran en la figura 1.

De los 17,751 UniTags obtenidos luego del procesamiento de la información para eliminar los Tags aberrantes, 11,668 pertenecieron al transcriptoma de Vip-Sel mientras que 6,083 provinieron de Vip-Unsel, lo que demuestra una mayor alteración del transcriptoma de la cepa resistente. A pesar de que cambios pequeños en la expresión génica pueden tener un significado biológico, en el presente trabajo se enfocó el análisis a las secuencias cuyo cambio en la expresión (FC, del inglés) se encontró entre $\geq 2,5$ o $\leq 0,4$. La anotación de las secuencias de 1845 Unitags se realizó mediante el algoritmo de búsqueda BLASTN en una base de datos de secuencias contiguas (contigs) de *H. virescens*. Solamente un número limitado de estas secuencias únicas (419 Unitags; 109 sobreexpresados y 310 subexpresados) obtuvieron una homología perfecta de los 26 nucleótidos (E-value $\leq 10^{-4}$). Esto puede ser explicado por una insuficiente profundidad de secuenciación

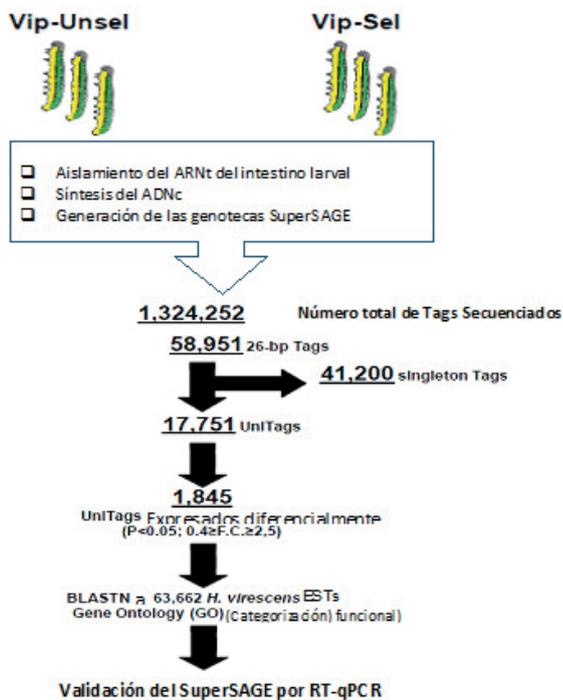


Fig. 1. Representación esquemática del flujo de trabajo para el análisis transcriptómico de la cepa de *H. virescens* resistente a Vip3Aa. Los resultados específicos del HT-SuperSAGE se muestran subrayados.

en los datos aportados del transcriptoma de *H. virescens* hasta la fecha.

Para clasificar las 419 secuencias únicas expresadas diferencialmente con respecto a su función molecular y los procesos biológicos a los que se asocian se realizó la anotación en Gene Ontology (GO) mediante la búsqueda de homología por BLASTX en las bases de datos no redundantes GenBank y UniProtKB/TrEMBL. Un total de 416 Unitags pudieron ser anotados sin ambigüedad como proteínas en la base de datos NCBI. En la figura 2 se muestra el análisis de las secuencias de acuerdo con el grado de expresión diferencial (Fig. 2A); los organismos encontrados con mayor homología (Fig. 2B) —donde *Amyelois transitella* y *Bombyx mori* fueron los más representados—, y la función molecular o proceso biológico asignado a 345 Unitags.

Las secuencias con homología a proteínas de función conocida se distribuyeron en 14 categorías funcionales (Fig. 2C). Entre los procesos biológicos más representados se encontraron el metabolismo (25,96 %) y los procesos de síntesis de proteínas y biogénesis ribosomal (15,87 %). Esto último sugiere que los cambios en estos procesos son im-

portantes para la adaptación de del células del intestino de *H. virescens* frente a la protoxina Vip3Aa. Con respecto a la categoría de metabolismo, 108 Unitags con expresión diferencial en la población resistente se distribuyeron en 7 actividades catalíticas (Fig. 2D), en las cuales predominaron las actividades hidrolasa (~56 %) y oxidoreductasa (~31 %).

Resulta interesante que casi la mitad de las secuencias con actividad hidrolasa correspondieron a endopeptidasas de tipo serin-proteasa. Esto sugiere que el proceso de proteólisis puede tener un componente importante en la resistencia a la toxina Vip3Aa en *H. virescens*. Se conoce que la regulación diferencial de serin-proteasas es crucial para la supervivencia de los insectos a la patogénesis por Bt, por lo que es de esperar cambios compensatorios en la regulación génica de esta familia de proteasas para remplazar la pérdida de funcionalidad de algunos genes.

En la cepa Vip-Sel, los genes sobreexpresados de serin-proteasas correspondieron mayormente con actividades de tipo tripsina excepto por dos secuencias de tipo quimotripsina. En cambio, todas las secuencias de este tipo en el grupo de los genes subexpresados correspondieron a quimotripsinas. Futuros estudios deben concentrarse en investigar si las quimotripsinas sobreexpresadas participan en algún mecanismo de degradación proteolítica de Vip3Aa durante la resistencia, como se ha informado en ensayos *in vitro* de activación y degradación proteolítica de esta toxina.

La figura 3 muestra los perfiles de expresión por qRT-PCR de 10 secuencias seleccionadas para la validación de los resultados del HT-SuperSAGE. Estas secuencias correspondieron a las sobreexpresadas con similitud a serin-proteasa 37, repat 39, proteína ribosomal S20, proteína ribosomal S6 y aminopeptidasa N, así como a las secuencias subexpresadas con homología a las proteínas serin proteasa de tipo quimitripsina C9, tripsina T7, lipasa neutral, RpS2 y proteína 3 unidora de quitina. El análisis de la expresión diferencial de estas moléculas y la asociación de algunas de ellas a los mecanismos de acción de las toxinas Cry y Vip, o a mecanismos de resistencia a las Cry, permite proponer algunas secuencias para su evaluación funcional, a la vez que aporta nuevos elementos sobre la resistencia en *H. virescens*.

En resumen, los resultados del presente trabajo permiten concluir que el transcriptoma de la resistencia a Vip3Aa muestra una respuesta adaptativa compleja, multigénica, donde los procesos de síntesis y degradación de proteínas predominan. Lo anterior sugiere la homeostasis de las proteínas del intestino como un blanco importante de la toxina y de la respuesta del insecto.

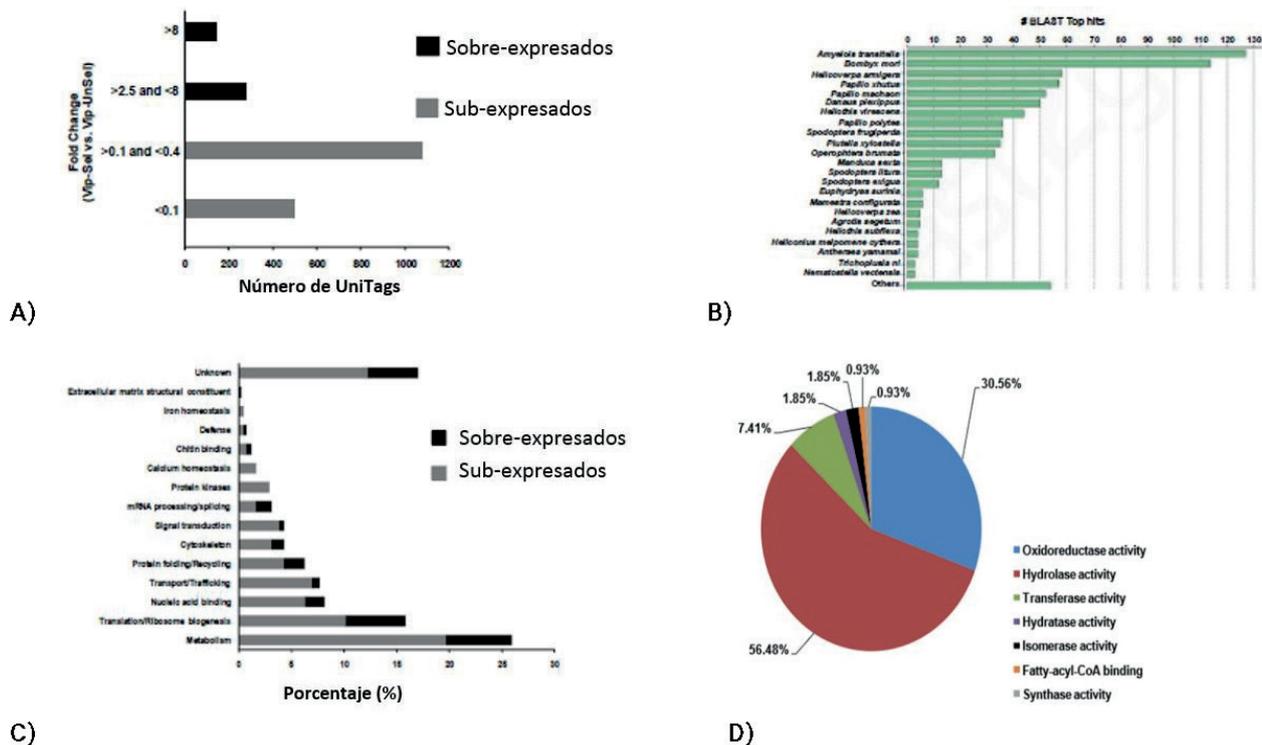


Fig. 2. Análisis de las secuencias únicas (UniTags) expresados diferencialmente. A) Distribución de los 1989 UniTags de acuerdo a la magnitud de la expresión diferencial (Vip-Sel *versus* Vip-UnSel). B) Distribución de las especies más representadas cuyas secuencias tuvieron una homología significativa por BLASTN (E-value < 1E-04) con los UniTags identificados por su expresión diferencial. C) Distribución de las 416 secuencias anotadas de acuerdo a las diferentes categorías funcionales asignadas en Gene Ontology (GO) sobre la base de la función molecular y los procesos biológicos. D) Clasificación de los 108 genes únicos con expresión diferencial asociados con el metabolismo de acuerdo con las diferentes actividades catalíticas.

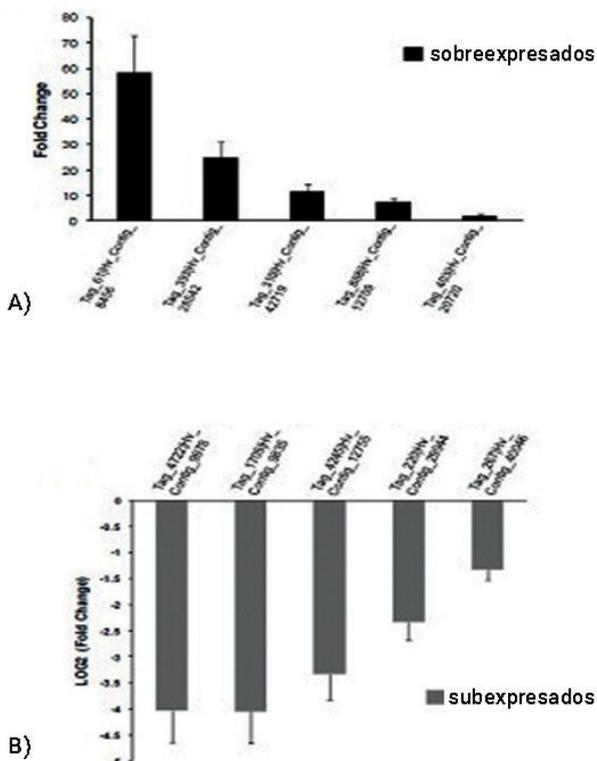


Fig. 3. Análisis de expresión de secuencias seleccionadas mediante qRT-PCR. El parámetro Fold Change es la relación de los valores de expresión media normalizada (calculada por el programa Q-Gene) empleando como ADN molde el ADNc de Vip-Sel y Vip-Unsel correspondientes para cada gen único analizado. Las barras representan las medias para dos replicas independientes el error estándar.

Por otra parte, la identificación de secuencias con homología a serín-proteasas entre los genes que se encontraron sobreexpresados en la población resistente confirma que la proteólisis puede desempeñar un papel importante en la resistencia a la toxina Vip3A. La identificación de una proteína ribosomal, previamente identificada como posible receptor de la toxina Vip3A entre los genes altamente subexpresados en la cepa resistente aporta evidencias sobre la posible participación de esa molécula en la ruta toxica y la posibilidad de desarrollar un mecanismo de resistencia basado en la reducción de la unión al receptor.

Finalmente, el análisis de la expresión génica por qRT-PCR de 10 secuencias identificadas en la genoteca permitió

validar la calidad de los datos del HT-SuperSAGE. El presente trabajo constituye el primer informe donde se aplica exitosamente la metodología HT-SuperSAGE al estudio transcriptómico de una especie de lepidópteros.

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:

Dra. Lianet Rodríguez Cabrera. *Grupo de Control de Insectos. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa. Apartado Postal 6162, La Habana, Cuba. CP 10600. Correo electrónico: lianet.rodriguez@cigb.edu.cu*