

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA
CURSO 2020-2021
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO
EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS
(*Rhynchophorus ferrugineus*)

Autor: Noelia Antón Ruiz

Tutor académico: Prof. Dra. María Trinidad León Quinto

Co-tutor: Prof. Dr. José Manuel Pérez Pérez

Antón Ruiz, Noelia
RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

Declaración del tutor o tutores

D.ª MARIA TRINIDAD LEÓN QUINTO, Doctora y Profesora Titular del área de Zoología del Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

D. JOSÉ MANUEL PÉREZ PÉREZ, Doctor y Catedrático de Universidad del área de Genética del Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado:

“RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS
(*Rhynchophorus ferrugineus*)”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

D.ª NOELIA ANTÓN RUIZ

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Bioingeniería, cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 21 de junio de 2020.

Fdo.: Prof. María Trinidad León Quinto

Fdo.: Prof. José Manuel Pérez Pérez

RESUMEN

El picudo rojo de las palmeras, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) es una de las peores plagas de palmáceas en todo el mundo. Al ser un insecto tropical, su respuesta frente al frío ha sido poco estudiada. Considerando la relevancia que tienen las proteínas de choque térmico (o Hsp) y las acuaporinas en la respuesta frente al estrés térmico, en este trabajo se ha estudiado por primera vez en *Rhynchophorus ferrugineus*, los niveles de expresión de algunos genes de las familias Hsp60, Hsp70 y Hsp90, así como las acuaporinas PRIP, DRIP, AQP12L y EGLPA2, en respuesta a una disminución brusca y temporal en la temperatura ambiental. El estudio se ha realizado en cuerpo graso y tegumento de larvas prepupa control, tratadas a una temperatura fría (7 días a $5,0 \pm 0,5$ °C) y sin tratar (7 días a 23 ± 1 °C). Para ello se optimizó la extracción de ARN, se diseñaron cebadores específicos para los genes y finalmente se llevó a cabo la cuantificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados indicaron que el procedimiento de extracción de ARN optimizado para *Rhynchophorus ferrugineus* es válido y puede utilizarse en experimentos futuros tanto en cuerpo graso como tegumento. Además, los cebadores diseñados para los genes *Hsp60*, *Hsp70*, *DRIP*, *AQP12L* y *EGLPA2* parecen funcionar adecuadamente. Los genes *Hsp90* y *PRIP* parecen estar codificando diferentes isoformas de la proteína mediante procesamiento alternativo. A partir de los resultados obtenidos mediante qPCR, se puede concluir lo siguiente: 1) Los genes *Hsp60* y *Hsp70* parecen expresarse en mayor cantidad en el tejido del tegumento que en cuerpo graso; 2) Los genes *Hsp70*, *AQP12L* y *DRIP* parecen disminuir su expresión en respuesta a estrés por frío en tejido de cuerpo graso; 3) Los genes *EGLPA2* y la *Hsp60* no parecen variar su expresión tras la exposición a un tratamiento de frío con respecto al control sin tratamiento en *Rhynchophorus ferrugineus*. Estos resultados iniciales se completarán posteriormente con la finalidad de tener un conocimiento mayor sobre los procesos de adaptación en esta plaga para disponer, por tanto, de mejores herramientas para su control.

ABSTRACT

The red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) is one of the worst pests of palm trees in the world. Being a tropical insect, its response to cold has been little studied. Considering the relevance of heat shock proteins (or Hsp) and aquaporins in the response to heat stress, in this work the expression levels of some genes of the Hsp60 families have been studied for the first time in *Rhynchophorus ferrugineus*, Hsp70 and Hsp90, as well as the aquaporins PRIP, DRIP, AQP12L and EGLPA2, in response to a sudden and temporary decrease in ambient temperature. The study was carried out on the fat body and integument of control prepupal larvae,

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

treated at a cold temperature (7 days at 5.0 ± 0.5 ° C) and untreated (7 days at 23 ± 1 ° C). In that way, the RNA extraction was optimized, specific primers were designed for the genes and finally the quantification was carried out by means of quantitative PCR in real time. The results indicated that the optimized RNA extraction procedure for *Rhynchophorus ferrugineus* is valid and can be used in future experiments on both the fat body and the integument. Furthermore, primers designed for the *Hsp60*, *Hsp70*, *DRIP*, *AQP12L* and *EGLPA2* genes appear to work well. The *Hsp90* and *PRIP* genes seem to be encoding different isoforms of the protein by alternative processing. From the results obtained by qPCR, we can be concluded: 1) The *Hsp60* and *Hsp70* genes seem to be expressed in greater quantity in the integument tissue than in the fat body; 2) The *Hsp70*, *AQP12L* and *DRIP* genes seem to decrease their expression in response to cold stress in fat body tissue; 3) *EGLPA2* and *Hsp60* genes do not seem to vary their expression after exposure to a cold treatment in contrast with the control without treatment in *Rhynchophorus ferrugineus*. These initial results will be completed later in order to have a better understanding of the adaptability processes in this pest to have, therefore, better tools for its control.

PALABRAS CLAVE

Rhynchophorus ferrugineus, picudo rojo, cuantificación de ARN, Heat Shock Protein (Hsp), acuaporina.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este Trabajo de Fin de Máster ha sido posible gracias en primer lugar;

A Trinidad León Quinto y José Manuel Pérez Pérez por haberme permitido realizar este trabajo en su laboratorio y ofrecerme la oportunidad de crecer personal y profesionalmente.

A José Luis Micol, por ofrecernos el NanoDrop para cuantificar el ARN tras las extracciones.

A Miguel Sogorb y Eugenio Vilanova, por prestarme el termociclador de PCR cuantitativa.

A Ana Belén Sánchez García por su gran ayuda y a María Salud Justamente Clemente por hacerme sentir tan integrada en el laboratorio y amenizar el tiempo que he pasado junto a ellas.

A mi familia, a mis padres y mis hermanos por todo el apoyo y la confianza recibida durante todos estos años, porque sin ellos no podría haber llegado hasta aquí.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	7
1.1.	<i>Rhynchophorus ferrugineus</i> . Características generales.....	7
1.1.1.	Ciclo biológico.....	7
1.1.2.	Distribución.....	9
1.1.2.1.	A nivel global.....	9
1.1.2.2.	En España.....	10
1.1.3.	Papel como plaga.....	10
1.2.	Respuesta frente al frío en <i>Rhynchophorus ferrugineus</i>	11
1.2.1.	Proteínas de choque térmico o Hsp.....	12
1.2.2.	Acuaporinas.....	14
2.	OBJETIVOS.....	17
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1.	Insectos.....	18
3.2.	Extracción de ácido ribonucleico (ARN) total.....	19
3.2.1.	Medida de la concentración y pureza del ARN.....	20
3.2.2.	Medida de la integridad del ARN.....	21
	a) Electroforesis en gel de agarosa.....	21
	b) <i>Bioanalyzer Agilent 2100</i>	22
3.3.	Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc).....	22
3.4.	Diseño de cebadores específicos.....	23
3.5.	Amplificación génica mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	30
3.6.	Cuantificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	30
3.6.1.	Validación de cebadores.....	31
3.6.2.	Cuantificación génica de las muestras.....	33
4.	RESULTADOS.....	34
4.1.	Extracciones de ARN total.....	34
4.1.1.	Concentración de ARN.....	34
4.1.2.	Integridad y calidad del ARN.....	35
4.2.	Validación de cebadores específicos.....	37
4.3.	Síntesis de ADNc.....	41
4.4.	Cuantificación mediante RT-qPCR.....	42
5.	DISCUSIÓN.....	48
6.	CONCLUSIONES.....	53
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	55
8.	ANEXOS.....	61

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

Antón Ruiz, Noelia
RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1. *Rhynchophorus ferrugineus*. Características generales.

El picudo rojo o gorgojo de las palmeras, *Rhynchophorus ferrugineus*, fue descubierto y catalogado por Guillaume-Antoine Olivier en 1790. Representa actualmente, a nivel mundial, uno de los insectos plaga más destructivos para las palmeras, provocando generalmente la muerte de los ejemplares infestados.

Pertenece al Phylum Arthropoda, Clase Insecta, Orden Coleoptera y Familia Curculionidae. Dentro de la familia de los curculiónidos también se encuentran otras especies conocidas, como el escarabajo del pino de montaña (*Dendroctonus ponderosae*), el escarabajo del pino blanco (*Dendroctonus armandi*) o el gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae*), entre otros.

Debido a su potencial colonizador y la probabilidad de constituir una amenaza grave para las especies autóctonas, esta especie ha sido incluida en el Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras, aprobado por Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto.

1.1.1. Ciclo biológico

Rhynchophorus ferrugineus Olivier es un insecto herbívoro que vive y se alimenta en el interior de las palmeras, condición que hace difícil detectar su presencia con una simple inspección visual. Es holometábolo, por tanto, tiene metamorfosis completa, cuyo desarrollo comprende las fases de huevo, larva, pupa y adulto. Además, estos cuatro estadios diferentes a menudo se encuentran conviviendo simultáneamente en la misma palmera.

Se trata de un insecto con una gran capacidad reproductiva ya que en tan solo 3-4 meses pasa por todas las fases de su ciclo biológico (tres generaciones al año). Los adultos abandonan la planta volando o caminando cuando ésta no puede acoger a la próxima generación o no queda material vegetal interno para su alimentación. Son insectos sensibles a las kairomonas que desprenden las palmeras debido a heridas realizadas por golpes o podas sin tratar, por lo que éstas tienen un gran poder de atracción sobre ellos [1]. Las diferentes fases del ciclo podemos observarlas en la **Figura 1** y se detallan a continuación:

a) Huevo

Mide de 1,0 a 2,5 milímetros y se localizan en el interior de pequeños agujeros realizadas por las hembras. No entran en contacto unos con otros y son fijados con una secreción mucosa materna. Se realizan puestas de 300-400 huevos de media.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

b) Larva

Al eclosionar los huevos salen las larvas, que pasan por varios estadios durante un periodo de 1 a 3 meses muy influenciado por la temperatura. Los estadios larvarios se diferencian únicamente en el tamaño del cuerpo, de la cabeza y en la coloración, pasando ésta de un color blanquecino a una tonalidad cada vez más amarillenta (ver **Figura 1**). Es ápoda, alargada, segmentada y con una cabeza dura de color-marrón oscuro, dotada de unas fuertes mandíbulas cónicas. Al final de la fase, la larva puede llegar a tener 5 cm de longitud. La larva se alimenta del tejido vegetal interno de la palmera, especialmente del tejido meristemático, y como consecuencia forma galerías internas que pueden llegar hasta un metro de longitud. Es la fase del insecto que más perjuicio causa a la palmera [1].

c) Pupa

En este estadio la larva sale al exterior y construye sobre sí misma una envoltura en forma oval con fibras vegetales del interior de la palmera. Miden de 4 a 6 cm y esta fase dura aproximadamente entre 15 y 30 días. Una vez finalizada la metamorfosis el adulto permanece en el interior unos 10 días más [1].

d) Adulto

Pueden llegar a vivir hasta 90 días y su cuerpo endurecido mide de 19 a 45 mm de longitud. Presentan coloración variable, predominando pardo anaranjado claro o rojo ferruginoso, con o sin manchas negras en el pronoto de forma y números variables. Abandonan la palmera solo cuando ya está en avanzado estado de descomposición y tienen actividad diurna [1].

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

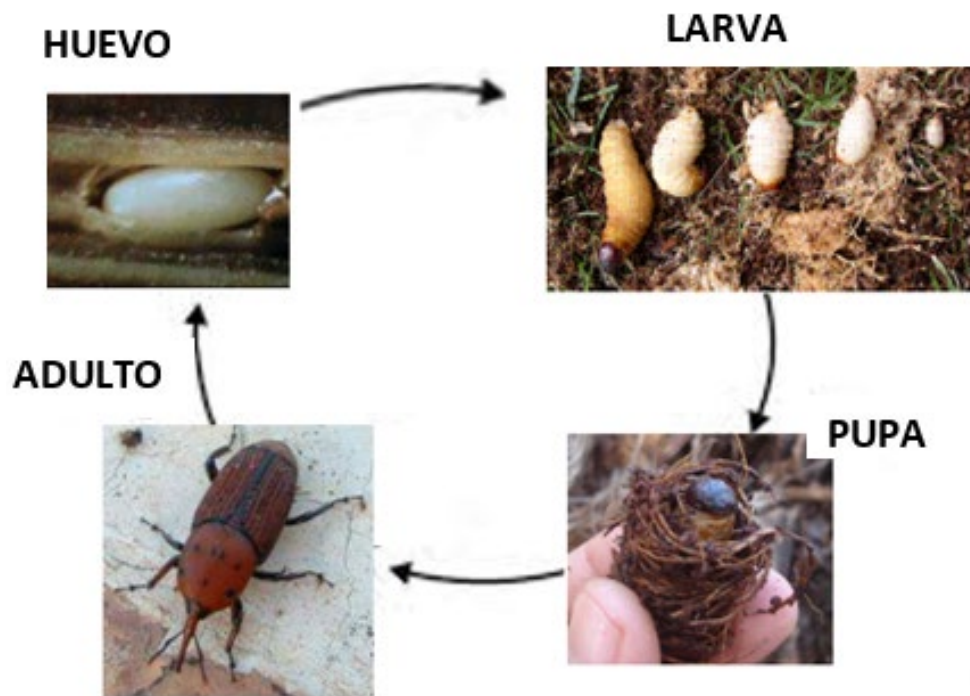


Figura 1. Ciclo biológico de *Rhynchophorus ferrugineus*. Se observan las diferentes fases por las que pasa el insecto durante su desarrollo: Huevo, estado larvario (diferentes estadios), pupa e insecto adulto.

1.1.2. Distribución

1.1.2.1. A nivel global

Rhynchophorus ferrugineus es originario de las regiones tropicales del Sudeste Asiático y Polinesia, donde es una plaga de las palmeras de coco. Los primeros registros de invasión datan de 1906, cuando la especie fue declarada plaga severa para las palmeras de coco en la India. Posteriormente, en 1917 se consideró también plaga para las palmeras datileras. Un año después se detectó en Irak y alrededor de los años 80 la especie apareció en gran parte de la península arábiga desde donde se expandió al resto de los países de Oriente Medio. Entró en el norte de África a través de Egipto en el año 1993, continuando su expansión hacia países europeos como Italia, Francia, Portugal y España, siempre ligado a la importación de palmeras (**Figura 2**) [2, 3].

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

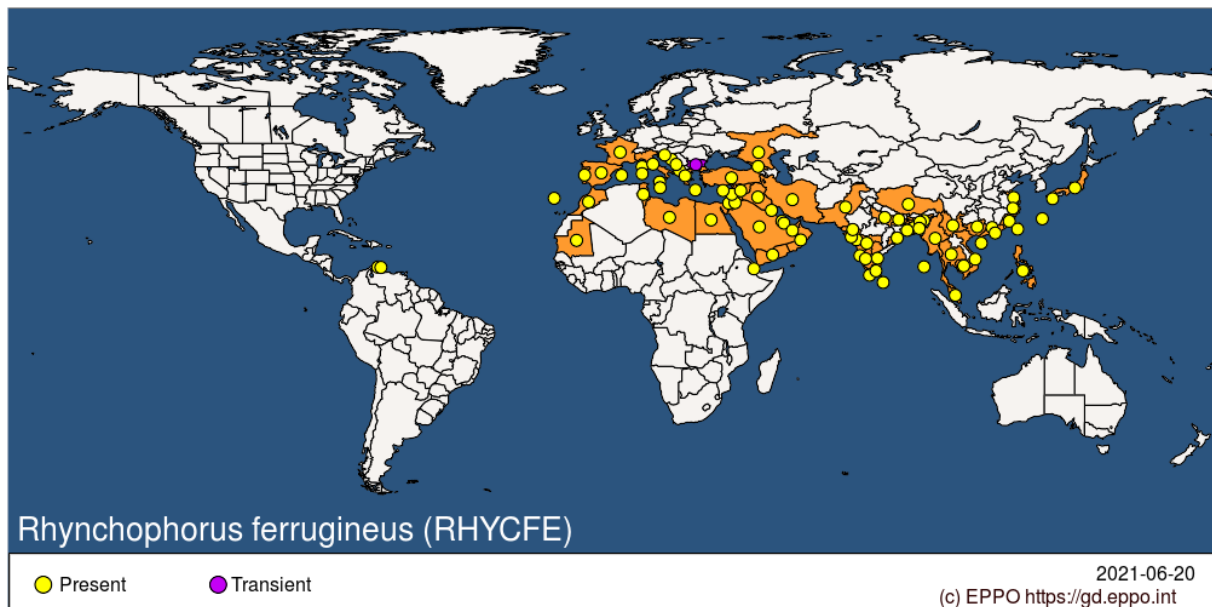


Figura 2. Mapamundi de países afectados por la plaga actualizado hasta 2020. Se destacan en naranja los países afectados. En círculos amarillos aquellos lugares donde la plaga sigue presente y en morado aquellos en los que está en proceso de desaparición. Fuente: European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).

1.1.2.2. En España

En 1993 fue detectada por primera vez en España, concretamente en la provincia de Granada, donde se introdujo con la importación de palmeras ornamentales infestadas por la especie desde el Norte de África. Posteriormente extiende su área de distribución, colonizando también las provincias de Almería, Huelva, Valencia, Castellón, Alicante, Murcia y Barcelona, así como las Islas Canarias y Mallorca [1,3]. En 2005 el picudo se detectó en el palmeral de Elche, declarado patrimonio de la humanidad por la UNESCO y considerado el mayor palmeral de Europa. En las Islas Canarias representó una amenaza importante, puesto que atacaba a *Phoenix canariensis* (palmera canaria), endemismo de las Islas, sin embargo, en 2016 fue erradicada.

1.1.3. Papel como plaga

El picudo rojo, como se ha comentado, es un insecto parásito de varios géneros de la familia *Palmae*, como *Cocos nucifera*, *Phoenix canariensis* o *Phoenix dactylifera* entre otras. Los síntomas observados en las palmeras son debidos fundamentalmente a la actividad alimenticia de las larvas y, en menor medida, a los adultos. A menudo, cuando los síntomas de la infestación se hacen patentes y visibles es demasiado tarde y suelen ser tan graves que tienen como resultado la muerte de la palmera.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

Los principales signos visuales que se perciben tras la infestación son:

- Amarillamiento y marchitado de las hojas centrales.
- Decaimiento de las hojas tanto externas como internas del penacho central.
- Desplomado general de la corona de hojas.

La plaga ha demostrado una gran capacidad de adaptación a entornos diferentes y que, en principio, podrían parecer adversos para su supervivencia. Actualmente, con el fin de controlar la plaga es fundamental, en primera instancia, la vigilancia periódica de las palmeras, siendo la principal herramienta en la lucha contra el picudo la detección precoz de ataques incipientes. La eficacia de los tratamientos es mayor cuanto menor es la gravedad del ataque, por ello se llevan a cabo no solo tratamientos curativos sino también preventivos. Entre ellos, generalmente, y, dependiendo del nivel de infestación de la planta, se utilizan diferentes tratamientos autorizados como el tratamiento con nematodos entomopatógenos (fundamentalmente *Steinernema carpocapsae*), esporas de hongos entomopatógeno (fundamentalmente *Beauveria bassiana*) o bien productos químicos (como Imidacloprid, Clorpirifos o Tiametoxan) dependiendo de la época del año.

Por otro lado, el saneamiento mecánico es una labor necesaria en palmeras gravemente afectadas, ya sea para la eliminación de las formas vivas de la plaga o de los daños causados, como la podredumbre de tejidos. Finalmente, el uso de trampas tiene dos utilidades frente al picudo rojo, reduce poblaciones mediante el trampeo masivo (captura un mayor porcentaje de hembras) y es una herramienta que permite tomar decisiones sobre los tratamientos (cadencia) en función de la presencia o ausencia de capturas. Estos dispositivos deben contener los siguientes componentes: una feromona de agregación (ferrugineol), restos vegetales y agua, que evita que los adultos puedan volar y escapar de la trampa [4].

1.2. Respuesta frente al frío en *Rhynchophorus ferrugineus*

Los insectos que sobreviven a bajas temperaturas han desarrollado un complejo de estrategias que comprenden adaptaciones morfológicas, ecológicas, etológicas, fisiológicas y bioquímicas [5]. Gran parte de las especies desarrollan una combinación de estas estrategias de supervivencia, pero hay una gran variabilidad de una especie a otra. La mayoría de los estudios sobre la resistencia al frío en insectos se realizan con especies nativas de zonas frías, siendo por tanto mucho más desconocidas las repuestas en insectos que habitan zonas cálidas y tropicales.

Conocer cómo una disminución repentina en la temperatura ambiental afecta al picudo rojo es importante para intentar avanzar en el control de plagas, pero también para profundizar en el

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

conocimiento de la adaptación al frío en insectos de zonas cálidas, especialmente en un contexto de variaciones de temperatura impredecibles vinculadas al cambio climático global [5]. Un estudio reciente publicado en 2020 cuantificó por primera vez los cambios morfológicos ocurridos en el picudo rojo cuando éste era sometido a una disminución anómala en la temperatura ambiental. De esta forma, las prepupas silvestres se sometieron durante 7 días a temperatura baja ($5,0 \pm 0,5$ °C) o temperatura ambiente (23 ± 1 °C), simulando las condiciones de una anomalía térmica brusca y temporal que pudiera afectar a la etapa larvaria más expuesta a las condiciones ambientales, la etapa prepupa, que es cuando la larva sale de la palmera para formar el capullo y entrar en fase de pupa. Mediante Tomografía Computarizada (TC) de Rayos X y Microscopía Holográfica Digital (MHD) se cuantificaron los cambios sufridos en la morfología interna de sus tejidos y en la arquitectura del tegumento, respectivamente. A partir de la TC de rayos X se encontró que, tanto las prepupas sometidas al frío como las que permanecen a temperatura ambiente siguen un desarrollo similar, no habiendo diferencia entre ambos grupos. A través de MHD se obtuvo nuevamente que las prepupas sometidas a frío no experimentaban una parada en su desarrollo. No obstante, en este caso se observó un retraso en el desarrollo más obvio en el grupo sometido a frío a nivel de la rugosidad del tegumento. Estos resultados previos proporcionan una evidencia cuantitativa que demuestra que la transición larva-pupa del picudo continúa casi sin perturbaciones incluso durante el estado de latencia inducido por un evento frío repentino y severo como es la quiescencia [6].

Como continuación a este trabajo previo, se pone de relevancia el interés por estudiar qué genes se expresan en el picudo rojo relacionados con su capacidad de resistencia al frío, a pesar de ser un insecto tropical.

1.2.1. Proteínas de choque térmico o Hsp

Las proteínas de choque térmico o Hsp (del inglés, *heat shock proteins*) son un grupo de chaperonas moleculares que desempeñan un papel importante en el plegamiento correcto y el bloqueo de la agregación de proteínas desnaturalizadas [7-9]. Las Hsp representan una gran superfamilia y están presentes universalmente en la mayoría de los organismos vivos, desde bacterias hasta mamíferos. Basándose en la similitud de secuencia, el peso molecular y la función biológica, una de las clasificaciones más extendida en insectos subdivide a las Hsp en cuatro familias: Hsps pequeñas (small Hsp; sHsp), Hsp60, Hsp70 y Hsp90 [8]. Las Hsp pequeñas son independientes del trifosfato de adenosina (ATP) y previenen la desnaturalización de las proteínas cuando las células se encuentran con estrés siendo la primera línea de defensa celular [10]. Las proteínas grandes dependientes de ATP, Hsp60, Hsp70 y Hsp90, interactúan con proteínas y promueven el

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

plegamiento, degradación, desagregación y localización adecuados de proteínas, lo que influye en los procesos biológicos esenciales, incluida la síntesis de proteínas, la transcripción, la señalización celular y el metabolismo [11,12].

Las Hsp son proteínas relacionadas con el estrés que se expresan en gran medida en respuesta a tensiones externas, incluida la exposición a temperaturas extremas [13-16] y la diapausa en insectos como *Antheraea pernyi* Guérin-Méneville (Lepidoptera: Saturniidae) [17], *Paratlanticus ussuriensis* (Uvarov) (Orthoptera: Tettigoniidae) [18], *Apis cerana cerana* Fabricius (Hymenoptera: Apidae) [19] y *Calanus finmarchicus* (Gunnerus) (Calanoida: Calanidae) [20]; la radiación ultravioleta como ocurre en *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) [21]; la exposición a metales pesados [22,23], las infecciones parasitarias [24-25] y las sustancias químicas [26]; así como en respuesta a la inanición [27] y la oxidación [28]. Además, las Hsp exhiben una variedad de funciones biológicas en la embriogénesis temprana [29] y morfogénesis [30], también en el picudo rojo [31].

Muchos factores afectan a la distribución de especies en la naturaleza y la temperatura es uno de los más importantes. En animales poiquilotermos como los insectos, la capacidad de adaptación a diferentes temperaturas es especialmente importante. La modulación de la expresión de Hsp en respuesta a temperaturas extremas, está bien caracterizada en diferentes tejidos, siendo en muchas ocasiones el cuerpo graso y en el tegumento del insecto, donde su expresión es más significativa. En los últimos años varios grupos de investigación han realizado diferentes trabajos con respecto a esto en el Orden Coleoptera. Se ha visto que en larvas de *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae), la expresión de Hsp60, Hsp70 y Hsp90 se incrementa en respuesta al frío y al calor, siendo estas Hsp especialmente sensibles al calor. Además, el nivel relativo de ARNm de Hsp60 en el cuerpo graso fue más alto que los niveles de ARNm de Hsp70 y Hsp90 en el tegumento, mientras que la expresión de Hsp70 es más elevada en el tegumento que Hsp60 y Hsp90 [32]. Estas condiciones también se asociaron con la regulación positiva de tres Hsp en el gorgojo adulto del maíz *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), aunque no en el cuerpo graso [33].

En individuos adultos de la plaga invasiva del gorgojo del agua de arroz *Lissorhoptus oryzophilus* Kuschel (Coleoptera: Curculionidae) ocho genes codificantes de Hsp90, Hsp70 y sHsp se incrementaron bajo condiciones de estrés térmico, mientras que sólo un gen *Hsp70* y un gen *Hsp90* se incrementaron bajo condiciones de estrés por frío indicando que las Hsp de todas las familias menos la Hsp60 podrían ser responsables en la tolerancia al estrés por temperatura, aunque más genes fueron incrementados más rápidamente bajo condiciones de estrés por calor que bajo estrés por frío [34]. Algo parecido se vio para el escarabajo adulto de la patata de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*) donde además se observó la regulación a la baja de los niveles de transcripción de

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

Hsp70 en insectos sometidos a condiciones frías, así como una mortalidad significativa de insectos tras la eliminación basada en ARNi de *Hsp60* [35].

En el escarabajo del tabaco, *Lasioderma serricorne* Fabricio se analizaron los patrones de expresión de cuatro sHsp a diferentes temperaturas y en diferentes tejidos adultos. Por un lado, se vio que la mayoría de ellas se expresaban más en el cuerpo graso que en el tegumento y, por otro lado, los patrones de expresión en respuesta al estrés térmico difirieron sustancialmente. Durante el tratamiento de choque de frío, los niveles de expresión de tres genes sHsp se regularon notablemente al alza y, durante el tratamiento de choque de calor, la expresión de los cuatro genes aumentó significativamente [13].

En la mayoría de los casos, el aumento de la expresión de este tipo de proteínas se da en condiciones de calor, pero otros estudios demuestran que esto también ocurre por estrés al frío. En un análisis transcriptómico para el contenido de las larvas de *Dendroctonus ponderosae* Hopkins se vio que, entre septiembre y noviembre, dos Hsp (anotadas como similares a Hsp68 en *Tribolium castaneum*) estaban fuertemente reguladas al alza y dos adicionales (una proteína de 90 kDa y una pequeña proteína de 21 kDa) se regulan significativamente al alza, aunque en menor medida [36]. De manera similar, en un análisis de secuenciación de ARN (RNA-Seq) de las larvas de *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) en cinco etapas larvianas en los meses de hibernación se identificaron 6876 genes expresados diferencialmente, de los que algunas sHsp y Hsp70 aumentaron durante el proceso de hibernación (pre-pupa/pupa) concluyendo nuevamente que los niveles de expresión se alteraron debido a la baja temperatura durante el invierno [37].

Si bien como vemos, se ha investigado la relevancia de las Hsp para hacer frente a diversos tipos de estrés en varios insectos, la información sobre la respuesta de las Hsp en la adaptación al estrés térmico en *Rhynchophorus ferrugineus* todavía no se ha estudiado y podría proporcionar información de utilidad para el control de plagas.

1.2.2. Acuaporinas

El transporte de agua a través de la membrana celular es un requisito para la viabilidad celular. Sin embargo, el agua no puede pasar fácilmente a través de la bicapa lipídica. Las acuaporinas son la principal superfamilia de proteínas integrales de membrana que actúan como canal para el transporte de agua y otros solutos de bajo peso molecular, como el glicerol o la urea en algunos casos [38]. Son un tipo de proteínas de distribución ubicua en todo tipo de seres vivos, incluidos los insectos donde estudios recientes sugieren que las acuaporinas son indispensables para

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

el manejo celular del agua en condiciones que conducen a la deshidratación y el estrés por frío [39,40].

Recientemente, las acuaporinas de invertebrados se han agruparon en seis subfamilias principales: Big Brain cation channel proteins (BIB), *Drosophila* integral protein (DRIP) y *Pyrocoelia rufa* integral protein (PRIP); altamente selectivas para el transporte de agua, y; entomogliceroporinas (EGLPS), las parientes lejanas de Aquaporin 12-like de humanos (AQP12L) y acuaglicerolporinas (GLPs) [41-44,45]; en las que además del transporte de agua, se produce el paso de pequeños solutos, como el glicerol que funciona en numerosas especies como agente crioprotector frente al estrés por frío [49,50]. Las GLPs son las únicas no presentes en insectos holometábolos como el picudo rojo, en estos insectos parecen haber sido sustituidas por la subfamilia EGLP [44-48]. Complementando a lo anterior, un análisis filogenético de acuaporinas llevado a cabo recientemente en larvas del coleóptero *Dendroctonus armandi* mostró que, en el caso de EGLP clado A (EGLPA) existen también dos miembros distintos (EGLPA1 y EGLPA2) y en el caso de DRIP y EGLPA1 tres isoformas distintas en cada uno respectivamente [49].

En este estudio se analizó la expresión, en diferentes tejidos y a diferentes temperaturas, de las acuaporinas PRIP, DRIP, AQP12L, EGLPA1 y EGLPA2 encontrándose que, en general, estaban distribuidas a diferentes niveles en múltiples tejidos, pero, a excepción de DRIP en su isoforma 3, todas las demás acuaporinas se expresaron en gran medida en el cuerpo graso, y la expresión de EGLPA1 en su isoforma 3 fue predominante en este tejido [49].

Por otro lado, el nivel proteico de una acuaglicerolporina en el cuerpo graso de la cucaracha *Gromphadorhina coquereliana* (de ambiente tropical) disminuyó ~40% después de la exposición al frío durante 3 horas [51]. Estas disminuciones sugieren que esta acuaporina puede estar involucrada en el mecanismo fisiológico que protege a los insectos de la pérdida de agua debido a las bajas temperaturas. Estos resultados complementan a los datos recogidos en otro estudio anterior de los mismos autores sobre cucarachas sometidas a 8 h de estrés por frío y 8 h de tiempo de recuperación [50]. En esta investigación anterior, por el contrario, la expresión de la acuaglicerolporina aumentó ~50% en la grasa corporal, pero probablemente estuvo relacionada con un tiempo mayor de exposición al frío, así como por el tiempo de recuperación del tratamiento.

Otros estudios han demostrado que la inhibición con cloruro de mercurio de la actividad de las acuaporinas puede disminuir significativamente la supervivencia celular de los tejidos del cuerpo graso y del intestino medio a baja temperatura en el díptero *Eurosta solidaginis* [39]. Y, al igual que pasaba en las Hsp, en un estudio de genes clave asociados con la hibernación en larvas del coleóptero *Anoplophora glabripennis* [37], los niveles de expresión de dos genes correspondientes a

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

acuaporinas aumentaron gradualmente durante el proceso de hibernación y disminuyeron después. De esta manera, las bajas temperaturas externas incrementan los niveles de acuaporina que a su vez promueve la acumulación de crioprotectores de bajo peso molecular para evitar lesiones por frío.

De manera parecida, en un trabajo con nueve acuaporinas en larvas del coleóptero *Tribolium castaneum*, se encontró que la inactivación genética de varias de ellas causa problemas en el transporte de agua, lo que sugiere una función redundante de estas acuaporinas. Según sus resultados, la función de BIB, DRIP, PRIP, AQP12L o algunas EGLPs podría rescatarse parcialmente con el incremento de expresión de diferentes isoformas de otras EGLPs. Además, en esta misma investigación se concluyó que BIB está presente en casi todos los tejidos estudiados, las EGLPs en gran medida en cuerpo graso y PRIP y AQP12L parecen más abundantes en tegumento [52].

Como vemos, al igual que pasaba en el caso de las Hsp, se ha investigado la relevancia de muchas familias de acuaporinas para hacer frente al estrés por temperatura, y, más concretamente al estrés por frío, pero la información presente es a menudo contradictoria y hacen falta más estudios en un mayor número de insectos adaptados a diferentes ambientes. En lo que concierne al picudo rojo, no existe información sobre la respuesta de las acuaporinas en la adaptación al estrés térmico y también podría ser útil para el manejo de plagas.

2. OBJETIVOS

El picudo rojo de las palmeras, *Rhynchophorus ferrugineus*, es una de las peores plagas de las palmáceas en todo el mundo. Recientemente se ha demostrado que las larvas en estadio prepupa no detienen su desarrollo cuando son sometidas a una bajada brusca y temporal en la temperatura ambiental [6]. Tales condiciones ambientales simularían un contexto de variaciones de temperatura impredecibles relacionadas con el cambio climático global. De hecho, los períodos cálidos o fríos no estacionales y los eventos de anomalías térmicas extremas son cada vez más frecuentes [53-55]. En base a la importante función de las proteínas Hsp y las acuaporinas en respuesta al estrés térmico en otros insectos, se plantea como objetivo principal de este trabajo cuantificar, por primera vez en el picudo rojo de las palmeras, los niveles de expresión de los genes que codifican algunas de estas proteínas con la finalidad de profundizar en el conocimiento de los mecanismos que subyacen en la capacidad de adaptación de este insecto a condiciones adversas para su supervivencia.

A tal efecto, considerando varios protocolos utilizados por otros grupos de investigación en otros insectos, se plantean los siguientes objetivos específicos a seguir en el presente trabajo:

- Optimizar el proceso de extracción de ARN en *Rhynchophorus ferrugineus* y comprobar la integridad y calidad del ARN extraído en tejido del cuerpo graso y del tegumento de larvas prepupa.
- Diseñar parejas de cebadores para algunos genes de las familias Hsp60, Hsp70, Hsp90, PRIP, DRIP, AQP12L y EGLPA2 y comprobar su eficacia y reproducibilidad en la amplificación.
- Determinar los niveles de expresión relativos de algunos genes de las familias Hsp60, Hsp70 y Hsp90 en diferentes tejidos (cuerpo graso y tegumento) así como en el tratamiento con frío.
- Determinar los niveles de expresión relativos de algunos genes de las familias de acuaporinas PRIP, DRIP, AQP12L y EGLPA2 en cuerpo graso, así como en el tratamiento con frío.
- Comparar los resultados obtenidos de expresión con los ya publicados para diferentes insectos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Insectos

Con el objetivo de determinar los niveles de expresión de los genes en diferentes condiciones ambientales se dispusieron diferentes grupos experimentales de larvas silvestres de *Rhynchophorus ferrugineus* recolectadas en primavera y otoño de 2019 y 2020 de palmeras infestadas, *Phoenix canariensis* y *Phoenix dactylifera*, ubicadas en el palmeral de Elche, España, declarado Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO. La remoción de larvas fue realizada por personal calificado de TRAGSA, la empresa pública que realiza la conservación de este palmeral. Después de la recolección, las larvas se llevaron inmediatamente al laboratorio, donde seleccionamos aquellas en estado de prepupa. A continuación, se dividió a los animales seleccionados en tres grupos:

a) Grupo de control: formado por 6 individuos inmediatamente después de la retirada de su medio natural. Todos estos individuos se han alimentado de palmeras en condiciones silvestres y se sometieron a los diferentes experimentos el mismo día de su llegada al laboratorio.

b) Grupo de tratamiento en frío: formado por 9 individuos colocados durante siete días en una cámara climática en condiciones de baja temperatura ($5,0 \pm 0,5$ grados Celsius, °C). Estos individuos entraron en un estado de latencia, conocido como quiescencia, donde permanecieron hasta que regresaron a temperaturas cálidas.

c) Grupo sin tratamiento (temperatura ambiente, TA): formado por 6 individuos que permanecieron siete días en una habitación a temperatura ambiente controlada (23 ± 1 ° C). Esta temperatura corresponde a la media encontrada en otoño y primavera para la periferia de los tallos de las palmeras en el sureste de España [56]. Los individuos de este grupo generalmente tuvieron un comportamiento de interrupción de la alimentación, muy probablemente debido a su etapa prepupa. No obstante, para homogeneizar las condiciones de este grupo, todos sus individuos fueron sometidos a ayuno. Dado que los individuos tratados con frío también dejan de comer debido a su estado quiescente, la temperatura ambiental fue el principal factor externo que difiere durante el desarrollo de siete días entre los grupos b y c.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

3.2. Extracción de ácido ribonucleico (ARN) total

La extracción de ARN total para la posterior obtención de fragmentos de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) de los genes de las Hsp y las acuaporinas se realizó a partir de, por un lado, tejido del cuerpo graso y por otro, a partir de tejido del tegumento del insecto.

Para la extracción se utilizó una cantidad de entre 77 y 89 miligramos (mg) de tejido congelado a -80°C de cada individuo (Ver **Tabla 1** y **2**). Se colocó la muestra en un mortero cerámico estéril y se procedió a su trituración mecánica en presencia de N_2 líquido hasta la obtención de un polvo fino que se transfirió a un tubo tipo Eppendorf de 1,5 mililitros (ml). A continuación, se mezcló con 800 microlitros (μl) de TRIzol (TRI Reagent) y se comenzó a disgregar al máximo el tejido con palillos disgregadores estériles hasta la obtención de una mezcla turbia homogénea. Este material se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, el tejido homogenizado se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 5 minutos. El sobrenadante (**Figura 3**) fue transferido a un nuevo tubo estéril, se le adicionó 160 μl de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos en vórtex. Inmediatamente, se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 10 minutos.



Figura 3. Resultado de la centrifugación durante 5 minutos a $12.000 \times g$ tras la adición de Trizol. Se puede observar un pellet de restos sólidos y una fase superior amarillenta correspondiente a la grasa del animal que se desecha. La fase inferior de tono rosado es recogida y mezclada con cloroformo.

La fase acuosa superior (**Figura 4**) fue transferida a un nuevo tubo estéril, se agregaron 700 ml de etanol absoluto y se mezcló enérgicamente en el vórtex antes de hacer pasar el todo el volumen a través de una columna del *Kit Direct-zol RNA Miniprep* de Zymo Research. A partir de este

Antón Ruiz, Noelia
RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

momento se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante hasta la obtención final del eluido de 35 μ l de ARN total que fue guardado en congelador a -80 °C.

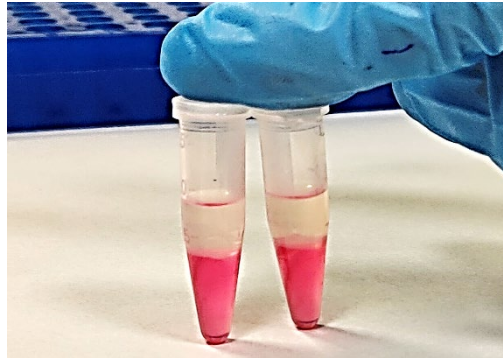


Figura 4. Resultado en dos fases tras la adición de cloroformo y la centrifugación durante 10 min a $12.000 \times g$ de la muestra. Se observa una fase acuosa superior transparente donde residen los ácidos nucleicos que posteriormente es mezclada con etanol.

El uso del reactivo TRIzol mantiene la integridad del ARN gracias a la inhibición de la actividad de ARNasa, a la vez que destruye las células y disuelve los componentes celulares durante la homogeneización de muestras. Por otro lado, el uso combinado de columnas con afinidad por ácidos nucleicos agiliza y optimiza el proceso en comparación con los métodos tradicionales de extracción.

3.2.1. Medida de la concentración y pureza del ARN total

Una vez llevada a cabo la extracción de ARN se procedió a su cuantificación y para ello se realizó un barrido de longitudes de onda entre 230 nanómetros (nm) y 320 nm en un espectrofotómetro tipo Nanodrop (ThermoFisher). La cuantificación de los ácidos nucleicos presentes en la muestra se realiza a partir de 260 nm (A260), asumiendo que se trata de moléculas monocatenarias de ARN. Este espectrofotómetro es muy útil debido a que es capaz de medir la concentración de las muestras utilizando únicamente 1 μ L de las mismas.

Además, con el fin de tener un valor fiable de la pureza del ARN extraído, este instrumento nos proporciona la ratio A260/A280, es decir, la relación de absorbancia de la cantidad de ADN o ARN medida a 260 nm sobre la cantidad de proteínas medida a 280 nm. La relación A260/A280 es muy estable y se considera que un ARN de pureza óptima tiene un valor entre 1,8-2,0. Un ARN de pureza aceptable debe tener al menos una relación A260/A280 $> 1,6$. Un valor A260/A280 $< 1,6$ indica una posible contaminación por compuestos aromáticos de la extracción como fenoles.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

3.2.2. Medida de la integridad del ARN total

Debido a su estructura química, el ARN es una molécula frágil y susceptible a la degradación por RNAsas durante el proceso de extracción y purificación de ARN. El tipo de muestra y la manera en que se toma, ya comienza a influir en las características del ARN extraído. Por ello, con el objetivo de verificar que el ARN extraído de la forma en la que se explica en el **punto 3.2** no estaba degradado y se mantenía íntegro para los posteriores experimentos se llevaron a cabo dos procedimientos:

a) Electroforesis en gel de agarosa

Se tomaron 4 μ l de cada muestra extraída en nuevos Eppendorf y se les agregó 2 μ l de tampón de carga 5x (Glicerol 0,25%, Colorante Orange G 30%, agua). Posteriormente se hicieron correr las alícuotas en un gel de agarosa preparado al 1% y teñido con 3 μ l de Safeview/100 mL gel para llevar a cabo una electroforesis y comprobar la pureza e integridad de las muestras, así como la ausencia de ADN genómico. Se compararon las bandas con el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermofisher). Para ello, se sometió a las muestras a un voltaje constante de 110 voltios (V) durante unos 45 minutos.

Esta técnica también fue utilizada posteriormente para la visualización del tamaño de los fragmentos amplificados en las diferentes PCR (*Polymerase Chain Reaction*, por sus siglas en inglés) llevada a cabo con los cebadores específicos tal y como se explica en el **punto 3.3**. El gel de agarosa se preparó al 2,0-2,5% para una mejor separación de los pequeños fragmentos amplificados que se quería visualizar.

Las técnicas electroforéticas separan las moléculas cargadas negativamente como el ARN (los grupos del fosfato tienen una carga negativa) en un campo eléctrico. Durante la electroforesis, los ácidos nucleicos se mueven hacia el electrodo cargado positivamente. La movilidad de las moléculas es inversamente proporcional a su tamaño y directamente proporcional a su carga.

Una vez terminada la electroforesis, se sacó el gel de la cubeta de electroforesis y se observaron las bandas resultantes mediante el uso de un transiluminador de luz ultravioleta (UV).

b) BioAnalyzer Agilent 2100

El Bioanalizador Agilent 2100 es un equipo basado en la tecnología de microfluidos diseñado para determinar la calidad de los ácidos nucleicos a través de la realización de electroforesis en pequeños chips. Los resultados se obtienen en un corto espacio de tiempo de forma automatizada, directamente en formato digital, aunque la principal ventaja frente a las técnicas convencionales es el aumento de precisión y reproducibilidad de los datos.

Es por esta razón por la que se decidió utilizar esta técnica para confirmar de una forma más precisa que las extracciones de ARN habían sido homogéneas y de calidad utilizando las mismas condiciones en el mismo rango de tiempo en cada chip. Además, se comprobó que el patrón de picos para el ARN ribosómico 18S y 28S era similar al que aparece en otros insectos [57]. Para preparar cada uno de ellos se siguieron las instrucciones del fabricante del Kit *Agilent RNA 6000 Nano*. En el **apartado 4.1.2** de Resultados se puede observar un ejemplo de electroforesis de las muestras usando este método.

3.3. Síntesis de ADNc

Previamente a la síntesis de ADNc se prepararon tres réplicas de cada tratamiento o grupo experimental (control, frío y TA) combinando de forma aleatoria el ARN de los individuos utilizados. De esta manera, utilizando las concentraciones proporcionadas por el NanoDrop de la forma en que se explica en el **punto 3.2.1**, las réplicas fueron preparadas de forma que finalmente hubieron 4 µg de ARN total (1000 nanogramos (ng) de cada individuo en las réplicas con cuatro muestras (grupo control y grupo TA) y unos 667 ng de cada individuo en las réplicas con seis muestras (grupo frío). El volumen final de las réplicas fue de 15 µL (265 ng de RNA total/µL) y se utilizaron 5 µL (unos 1325 ng de RNA total) por retrotranscripción. En total se obtuvieron nueve réplicas para tejido del cuerpo graso y nueve réplicas para tejido del tegumento (en ambos casos tres de grupo control, tres de grupo frío y tres de grupo TA).

Con el fin de obtener el ADNc a partir de las réplicas de ARN utilizando la enzima transcriptasa reversa iScript del Kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad), se mezcló en cada tubo de reacción libre de nucleasas:

- 10 µL de agua destilada estéril proporcionado en el Kit (*nuclease free water*)
- 4 µL de tampón de reacción 5X (Buffer 5x iScript mix)
- 1 µL de la transcriptasa inversa iScript
- 5 µL de molde de ARN de cada réplica.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

El volumen final de cada reacción fue de 20 μ L. Se mezcló suavemente y se dispuso en el termociclador con el programa:

Lid OFF (tapa sin calor)

5 minutos a 25°C (Unión de los cebadores aleatorios)

30 minutos a 42°C (Retrotranscripción)

5 minutos a 85°C (Inactivación de la enzima)

Mantener a 12°C hasta la recogida de las muestras.

Como se ha comentado, el volumen final de la mezcla de reacción fue de 20 μ l, pero se realizaron 2 reacciones por réplica de ARN, de forma que se obtuvieron en total 40 μ l de cada réplica de ADNc a los que se añadió una vez finalizada la transcripción inversa 60 μ l de agua destilada estéril para conseguir un volumen total de 100 μ l de ADNc de cada réplica. Finalmente fueron congeladas a -20°C hasta su uso posterior.

3.4. Diseño de cebadores específicos

Con el fin de poder comprobar los niveles de expresión utilizando RT-qPCR de los diferentes genes mencionados en el apartado de **Introducción y Antecedentes** en las distintas condiciones que se llevaron a ensayo, se diseñaron cebadores específicos con ayuda de la aplicación online *Benchling* así como diferentes datos de la bibliografía. *Benchling* es una plataforma informática basada en la nube que ayuda a gestionar flujos de trabajo y datos.

Para el diseño, el principal problema fue la falta de información y de anotación funcional de genes en la especie *Rhynchophorus ferrugineus* en las bases de datos de secuencias, por ello, se optó por iniciar el proceso utilizando datos de ortología en otras especies del mismo orden (Coleoptera) y, a ser posible, de la misma familia (Curculionidae).

En el caso de los controles positivos de los genes tubulina y β -actina se tomaron las secuencias de los cebadores de los datos de bibliografía [58], para el resto de genes, la dinámica seguida fue la siguiente:

1. Se realizó una búsqueda en la base de datos de proteínas *Uniprot* intentando encontrar proteínas estudiadas en insectos del mismo orden y familia como se ve en el ejemplo de la

Antón Ruiz, Noelia
RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

Figura 5. Para ello se utilizó la búsqueda avanzada añadiendo los términos del gen que se buscaba, el orden y la familia.

UniProtKB search results for "hsp60 coleoptera curculionidae".

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism	Length
A0A6J2YQ07	A0A6J2YQ07_SITOR	heat shock protein 60A	LOC115889530	Sitophilus oryzae (Rice weevil) (<i>Curculio oryzae</i>)	574
N6UDH4	N6UDH4_DENPD	Uncharacterized protein	D910_12498, YQE_04848	<i>Dendroctonus ponderosae</i> (Mountain pine beetle)	611
C9K5T0	C9K5T0_9GAMM	60 kDa chaperonin	groEL	endosymbiont of <i>Euscepes postfasciatus</i>	308
J3JTW1	J3JTW1_DENPD	Uncharacterized protein		<i>Dendroctonus ponderosae</i> (Mountain pine beetle)	574
A0A191URV6	A0A191URV6_SERMA	60 kDa chaperonin	groEL	<i>Serratia marcescens</i>	251

Figura 5. Ejemplo de búsqueda en la base de datos Uniprot de la proteína Hsp60. Vemos rodeado en rojo las palabras clave de la búsqueda. Aparecen un listado de 5 diferentes proteínas posibles de especies cercanas filogenéticamente a *Rhynchophorus ferrugineus* y su número de aminoácidos en las dos últimas columnas respectivamente. En este caso, en la fila 3 de la tabla aparece una entrada para una bacteria endosimbionte de una especie, descartamos por ello el uso de su secuencia.

- Se anotaron las entradas de aquellas especies cercanas como *Dendroctonus armandi*, *Dendroctonus ponderosae*, *Sitophilus oryzae*, etc. y se utilizaron sus diferentes secuencias aminoacídicas en formato FASTA para realizar una búsqueda por homología proteica con *Rhynchophorus ferrugineus* utilizando la herramienta *BlastP* del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (**Figura 6**). Tras ver los resultados que aparecieron enfrentando la secuencia de diferentes especies y las de picudo, se eligió aquella entrada más repetida en todas las búsquedas que tuviera una mayor identidad de secuencia, un menor valor e y una mayor cobertura en picudo. Podemos ver un ejemplo en la **Figura 7**.

Antón Ruiz, Noelia
RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

Figura 6. Ejemplo de búsqueda en BlastP frente a los datos de proteínas (opción non-redundant protein sequences) de *Rhynchophorus ferrugineus* depositados en las bases de datos proteicas utilizando como consulta una de las secuencias obtenidas de una de las especies cercanas filogenéticamente que aparecían en Uniprot.

Job Title	Protein Sequence	Filter Results	
RID	AZ2SSNT601R <small>Search expires on 05-28 20:05 pm</small> Download All ▾	Organism	<input type="checkbox"/> exclude
Program	BLASTP Citation ▾	Type common name, binomial, taxid or group name	
Database	nr See details ▾	+ Add organism	
Query ID	lcl Query_649244	Percent Identity	<input type="text"/> to <input type="text"/>
Description	None	E value	<input type="text"/> to <input type="text"/>
Molecule type	amino acid	Query Coverage	<input type="text"/> to <input type="text"/>
Query Length	574	<input type="button" value="Filter"/> <input type="button" value="Reset"/>	
Other reports	Distance tree of results Multiple alignment MSA viewer ?		

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy					
Sequences producing significant alignments Download ▾ New Select columns ▾ Show 100 ▾ ?									
<input checked="" type="checkbox"/> select all	5 sequences selected GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment New MSA View								
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein GWI33_000854 [<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>]	Rhynchophorus ferrugineus	1079	1079	97%	0.0	96.24%	574	KAF7283343.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein GWI33_002947 [<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>]	Rhynchophorus ferrugineus	67.0	67.0	11%	6e-14	46.97%	86	KAF7277639.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein GWI33_004942 [<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>]	Rhynchophorus ferrugineus	48.1	48.1	29%	8e-06	27.27%	519	KAF7286539.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein GWI33_000669 [<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>]	Rhynchophorus ferrugineus	53.5	53.5	32%	1e-07	26.06%	530	KAF7264082.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein GWI33_000662 [<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>]	Rhynchophorus ferrugineus	64.7	64.7	88%	4e-11	22.10%	530	KAF7264091.1

Figura 7. Ejemplo para el diseño de los cebadores de la proteína Hsp60 de los resultados obtenidos tras utilizar la herramienta BlastP del NCBI. Vemos en la parte inferior de la imagen un listado de 5 posibles proteínas de picudo que se adecuarían a la búsqueda por homología. En este caso, se optó por la proteína KAF7283343.1

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

puesto que era la que mejor cobertura e identidad de secuencia tenía frente a las demás, así como menor valor e.

3. Con la referencia de la proteína elegida, se realizó otra búsqueda en el NCBI pero, esta vez utilizando la herramienta *tBlastn* y basando la búsqueda en las bases de datos de genoma secuenciado utilizando la opción *Whole-genome shotgun contigs* (WGS). Esta herramienta busca en bases de datos de nucleótidos traducidas la similitud mediante la traducción simultánea de la secuencia proteica que se le aporta. Entre los diferentes contigs que nos aparecen de los diferentes experimentos de secuenciación llevados a cabo en picudo, en este caso 3 (Códigos de acceso en GenBank: JAACXW000000000, JAACXV000000000 y JABAOJ000000000), se eligió para todos los cebadores que se crearon el mismo, en este caso, el experimento JAACXV000000000, para de esta forma seguir el mismo procedimiento en todos los genes (**Figura 8-9**).

The image shows the NCBI tBlastn search interface. The 'Enter Query Sequence' section contains the accession number 'KAF7283343.1' and the job title 'KAF7283343: hypothetical protein GWI33_000854...'. The 'Choose Search Set' section shows the database 'Whole-genome shotgun contigs (wgs)' selected, and the organism 'Rhynchophorus ferrugineus (taxid:354439)' selected under the 'Limit by' section. The 'BLAST' button is visible at the bottom.

Figura 8. Ejemplo para el diseño de los cebadores de la proteína Hsp60 de los parámetros de búsqueda para la proteína KAF7283343.1 supuestamente correspondiente a Hsp60 con la herramienta *tBlastn* del NCBI. Rodeado en rojo los parámetros seleccionador para la búsqueda.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (Rhynchophorus ferrugineus)

← Edit Search
Save Search
Search Summary ▾
How to read this report?
BLAST Help Videos
Back to Traditional Results Page

Job Title KAF7283343:hypothetical protein GWI33_000854...

RID AZ3YX3UT016 Search expires on 05-28 20:26 pm [Download All ▾](#)

Program TBLASTN [Citation ▾](#)

Database wgs (3 databases) [See details ▾](#)

Query ID [KAF7283343.1](#)

Description hypothetical protein GWI33_000854 [Rhynchophorus ferru...]

Molecule type amino acid

Query Length 574

Other reports ⓘ

Filter Results

Percent Identity to

E value to

Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Sequences producing significant alignments

Download ▾ New Manage columns ▾ Show ⓘ

select all 8 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhynchophorus ferrugineus isolate male - UAE -farm-1 Pseudo_005_ whole genome shotgun sequence	462	1042	97%	0.0	100.00%	60505302	JABAOJ010000005.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhynchophorus ferrugineus isolate male - UAE -farm-1 Pseudo_003_ whole genome shotgun sequence	462	1019	97%	0.0	100.00%	121234641	JABAOJ010000003.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhynchophorus ferrugineus isolate AA-2017 scaffold_117_ whole genome shotgun sequence	462	1046	97%	0.0	100.00%	993658	JAACXW010000116.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhynchophorus ferrugineus isolate AA-2017 scaffold_117_ whole genome shotgun sequence	462	1046	97%	0.0	100.00%	991764	JAACXV010000116.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhynchophorus ferrugineus isolate male - UAE -farm-1 Pseudo_007_ whole genome shotgun sequence	511	511	92%	6e-160	49.53%	72135395	JABAOJ010000007.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhynchophorus ferrugineus isolate male - UAE -farm-1 Pseudo_004_ whole genome shotgun sequence	338	515	92%	2e-137	52.17%	75414022	JABAOJ010000004.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhynchophorus ferrugineus isolate AA-2017 scaffold_18253_ whole genome shotgun sequence	67.8	67.8	9%	3e-10	52.63%	1219	JAACXW010000548.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhynchophorus ferrugineus isolate AA-2017 scaffold_18253_ whole genome shotgun sequence	67.8	67.8	9%	3e-10	52.63%	1219	JAACXV010000548.1

Figura 9. Ejemplo para el diseño de los cebadores de la proteína Hsp60 de los cóntigos resultantes obtenidos tras la búsqueda con la herramienta tBlastn del NCBI. Subrayado en rojo el cóntigo seleccionado para continuar con el diseño en este caso.

4. Cuando se accedió al cóntigo seleccionado, nos trasladó a la herramienta GenBank del NCBI, la cual nos proporcionó la región codificante del cóntigo (CDS) y es, esa región la que se descargó en formato FASTA (**Figura 10**) y se depositó en la aplicación *Benchling* para su posterior tratamiento.

```

583261 cccataccac ctgatggaat ggcaggcttc tctttaggaa ttccgtaat tacaccttc
583321 gcattgttta ataatggggc aacaccggaa gcatctacaa tgcattcttc taacaactta
583381 aaaaataaaa aatagtggc attcacctta taatagggta aatcaattat agcagtgtaa
583441 atttaacct aacactta tgggtlggal caatattca tctctcaaac atattgaact
583501 attcaattt agggacata taaccataa ctccagactc tigtcttaet ttgctcaaa
583561 ggcagcgc atctacacca gcatittttg cgaattctat gcatggaaat ctcaagcttc
583621 ttttcaaat ttcaatadct tcaataaata aatgttaaa aaacagaca agcgaattg
583681 ggtggggta tagacatac caattcttg gctttatta gctgcttta atgactcag
583741 actggaggag catcttaaca aagcattacc acctccaggc acaatactt ctctacagc
583801 agctcttg gcattnaag catcagtaac ctgtctttt tctcattaa ctatgaaaa
583861 cattaatat tattatcagc atataaaat aaatccataa tgatttacc caacttacc
583921 acttccct acttttaga cgcctactcc agaagctagt cgagctaac tttcttgtaa
583981 ttttcttc tcaattctg agtgatatt atcaattga tcccaattt ggcagcttc
584041 gcttcaaca tctcttttc tcccttacc tctgtagct tcaaaatcg tatggattt
584101 acataaaat tagactcac cttaacagt taagatata tctgtgta tggcaattt
584161 acaacttg ccaagtcag ataattaac atctcaagt ttcaaatgt ctgctcac
584221 accaataca atgctccac ttgcaattgc catatctgt aagttgatt taggtttatc
584281 tcaaatctt gtagctttaa cagctctac ttgaagccca atgcgaattc tgataaaca
584341 aatattcaga aatccactt tcaatata atatacaca ttactatt aacaactaa
584401 gttgtaag ctaccctc tacatctta gcaattata taaggggtt tctttgtca
584461 ttgccaatt ctaatctgg aacaactt tgaactgat aaatttctt ttgctaaac
584521 agattagag catcttgata ttcaacttg gcaactttg tggttttac aaaaatggt
584581 gatatgagc ctctacaa cttaagctt tcaataactt caagttcac ttttaaggtt
584641 tttcacctt taactgtaa tcttccctt ttgccaac gttctatag atcagctata
584701 gattacaa cagagata tcaattagt gaattgga cactctaga attttctt
584761 agattgtta ctggtttga taaggtttg aggtttcag taatttctc aactccagc
584821 atgattctt ttctatttc aactggata gctctttac ccaaatctc aaaaacttt
584881 ttgcaattg atctgtaa gacattagc tgaattgac catcacagc ttctgttg
584941 gattattag ctacactg aacagctg gccaactat ttggaattt atcttaagt
585001 tctacacct tggctcagt gacacatcc ttgtaattt ttggtgatcc ccaagattg
585061 tcaatgata catttctgc ctaattttg aaaaataa aaattataa aaactaatt
585121 taatttatt aataaaaa tataattat gaaactaa ttaagtata aaatttacc
585181 cttattgt taagatgata agaacttaa taactata ccaaaataa tctgacaa
585241 taaaattgt gtccctcaat tgcataagt atgtaaat atcaagata aagttttt
                    
```

```

complement(join(583221..583376,583460..583638,
583701..583851,583909..584069,584121..584329,
584386..585080,585496..585669))
/locus_tag="GWI33_000854"
/note="XP_030765422.1:heat shock protein 60A"
/codon_start=1
/product="hypothetical protein"
/protein_id="KAF7283343.1"
/translation="MFRVQATHRSVALRKGYLQIQRWYAKDVRFPFEVRALMLQGV
DILADAVVTMPKGRNVIIEQSWSPKTKDQVTVAKVGLKDFQIIGAKLVQDVA
NHTHEAGDGTITATLVARSJAKSEFENLGGANPEIKGIMLAVKETTETLTKLSK
PVTTPREEICQVATISAMGDSVGNLADAMKRVKGEVITVNDKTLKDELVEITGK
FDRGYSPIVFNITKGAKEVQDALILFSEKTSVSSQVIPAELANAQRPLIIAE
DVGDEALTLVWIRLIGLOVAVKAPFGDNKSTLQDMAISGGVFGDDADIKVL
EDVLSDLQGGEIAITKDOLLKGGKREDDORADQIRADINDITSEYEKLE
RLARLASGVAVLVKGGSEVEVIEKDRVTDALNATRAVEEIVPGGSTALLRCSS
LDQLKAANKDQEGIEIVKRALRIPCMTIAKNAGVDAVVAKVEQSGDYGVDALIN
EVVNFERGIIDPTKVRTAIVDASGVALLTTAEAVITETPKEEPAISGGMGVGG
MGGHGGH"
                    
```

Figura 10. Región codificante de la proteína KAF7283343.1 correspondiente a la proteína Hsp60 de picudo proporcionada por la herramienta GenBank del NCBI. Subrayado en marrón la región codificante o exones y en blanco la región no codificante o intrones.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

- Se realizó un procedimiento similar para tratar de encontrar en las bases de datos los transcritos adecuados de la proteína seleccionada tras hacer un BlastP. Esta vez se utilizó la herramienta *tBlastn* del NCBI pero basando la búsqueda en bases de datos de transcriptoma utilizando la opción *Transcriptome Shotgun Assembly* (TSA) en *Rhynchophorus ferrugineus*. Esta herramienta busca en bases de datos de transcritos mediante la traducción simultánea de la secuencia proteica que se le aporta. Entre los diferentes transcritos que nos aparecen de los experimentos de transcriptoma llevados a cabo en picudo, en este caso 2 (Código de acceso en GenBank: GDKA00000000; Código de acceso a GenBank: desde JR467464 hasta JR494080) se toman aquellos con una mayor identidad de secuencia, un menor valor e y una mayor cobertura (**Figura 11**). Cuando fueron varios se descargó la secuencia en formato FASTA de todos ellos y se cargaron en *Benchling* para más tarde probar y verificar el mejor alineamiento.

Job Title gbj|KAF7283343.1
RID AZ5RDXCD013 Search expires on 05-28 20:56 pm Download All
Program TBLASTN Citation
Database tsa (2 databases) See details
Query ID KAF7283343.1
Description hypothetical protein GWI33_000854 [Rhynchophorus ferru ...
Molecule type amino acid
Query Length 574
Other reports

Filter Results
Percent Identity [] to []
E value [] to []
Query Coverage [] to []
 Filter Reset

Descriptions | Graphic Summary | Alignments

Sequences producing significant alignments Download Manage columns Show 100

select all 9 sequences selected GenBank Graphics

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	TSA: Rhynchophorus ferrugineus RPW1_contig_4914 transcribed RNA sequence	1046	1046	97%	0.0	94.80%	2173	GDKA01004900.1
<input checked="" type="checkbox"/>	TSA: Rhynchophorus ferrugineus contig17179.Rhfeeloa mRNA sequence	927	1051	97%	0.0	94.04%	2211	JR484642.1
<input checked="" type="checkbox"/>	TSA: Rhynchophorus ferrugineus RPW1_contig_33836 transcribed RNA sequence	144	144	15%	5e-39	76.40%	268	GDKA01033427.1
<input checked="" type="checkbox"/>	TSA: Rhynchophorus ferrugineus contig09034.Rhfeeloa mRNA sequence	253	516	91%	1e-130	53.95%	1870	JR476497.1
<input checked="" type="checkbox"/>	TSA: Rhynchophorus ferrugineus contig26565.Rhfeeloa mRNA sequence	63.9	63.9	26%	2e-09	32.24%	448	JR494028.1
<input checked="" type="checkbox"/>	TSA: Rhynchophorus ferrugineus contig05233.Rhfeeloa mRNA sequence	53.1	53.1	32%	1e-04	26.06%	1805	JR472696.1
<input checked="" type="checkbox"/>	TSA: Rhynchophorus ferrugineus RPW1_contig_1680 transcribed RNA sequence	53.1	53.1	32%	1e-04	26.06%	1897	GDKA01001674.1
<input checked="" type="checkbox"/>	TSA: Rhynchophorus ferrugineus RPW1_contig_2663 transcribed RNA sequence	47.8	47.8	29%	0.007	27.84%	2047	GDKA01002654.1
<input checked="" type="checkbox"/>	TSA: Rhynchophorus ferrugineus contig15502.Rhfeeloa mRNA sequence	47.4	47.4	29%	0.006	27.27%	1127	JR482965.1

Figura 11. Ejemplo para el diseño de los cebadores de la proteína *Hsp60* de los transcritos resultantes obtenidos tras la búsqueda con la herramienta *tBlastn* del NCBI. Subrayados en rojo los transcritos seleccionados para continuar con el diseño en este caso.

- El siguiente paso fue realizar el alineamiento de la secuencia del cóntigo con los transcritos obtenidos y verificar de esta manera que coincidían las regiones codificantes tal y como se esperaba. Finalmente haciendo uso de las herramientas que *Benchling* ofrece como por

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

ejemplo la predicción de pautas de lectura abiertas, se confirmó la que codificaba la proteína previamente predicha por *BlastP* y se dispuso al diseño de los cebadores (**Figura 12**) tratando de tener en cuenta varias características que los hacían deseables como:

- Que el tamaño del producto amplificado estuviera entre 75 y 150 pb en todos.
- Que acabasen en citosina (C) o guanina (G).
- Que no formaran horquillas internas ni dímeros de oligos.
- Que no hibridasen de forma inespecífica en otros ARNm del genoma del picudo.
- Que uno de ellos (al menos) estuviera diseñado en dos exones contiguos para evitar la posterior hibridación con contaminación de ADN genómico durante la PCR.
- Que su temperatura de fusión (T_f) fuera la misma (o lo más parecida posible) entre parejas de oligos y que estuviera entre 60 y 64 °C.



Figura 12. Ejemplo de alineamiento con la aplicación Benchling para el diseño de cebadores de la proteína Hsp60 de *Rhynchophorus ferrugineus*. De más superior a más inferior se puede ver: la región genómica del cóntigo (Template Contig_Hsp60.1), la secuencia de la región del transcrito (JR484642.1_mRNA_Hsp60.1) y la secuencia de aminoácidos de la proteína KAF7283343.1. En la parte inferior la aplicación nos muestra en rojo las regiones que no alinean y que corresponden a los intrones y en gris las que alinean perfectamente y corresponden a los exones. Se puede observar también el diseño “partido” del cebador Forward (Primer_1Fa-b) tratando de alinear con exones contiguos y así evitar la posterior hibridación en el ADN genómico durante la PCR. Rodeada en rojo vemos la herramienta para la creación simulada de cebadores que Benchling utiliza.

7. Finalmente se comprobó que los cebadores diseñados no formaran horquillas intermoleculares o intramoleculares inespecíficas usando la aplicación online *OligoCalc*, se realizó el pedido y se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma Aldrich). En la **Tabla 3** del **apartado 4.2** de Resultados se pueden ver las características de cada pareja de cebadores.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

3.5. Amplificación génica mediante PCR

Con el fin de verificar que los cebadores diseñados amplificaban los fragmentos génicos deseados de los genes de las Hsp y las acuaporinas se llevaron a cabo diferentes PCR con el Kit de la polimerasa GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (*Promega*). En cada tubo de reacción libre de nucleasas se mezcló:

- 1 μ L de agua destilada estéril,
- 2 μ L de tampón 5X Green GoTaq Flexi,
- 1,6 μ L de cofactor $MgCl_2$, 25 mM,
- 0,8 μ L de mezcla de nucleótidos, a 10 mM cada uno,
- 4 μ L de los cebadores Forward y Reverse de cada gen (5 μ M),
- 0,05 μ L de la enzima transcriptasa inversa GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (5u/ μ l),
- 0,5 μ L de ADNc molde de la réplica 1, 2 o 3 de cada grupo experimental.

El volumen final de cada reacción fue de 10 μ L. Se mezcló suavemente y se dispuso en el termociclador con el siguiente programa:

2 minutos a 95°C,

40 ciclos de 1 minuto a 95°C,

30 segundos a 62°C y

1 minuto a 74°C,

5 minutos a 74°C,

Mantener a 12°C hasta la recogida de las muestras.

Al terminar la amplificación se verificaron los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa tal y como se explica en el **punto 3.2.2 apartado a)** y el resto se mantuvo a -20°C en el congelador.

3.6. Cuantificación relativa mediante qPCR

La PCR cuantitativa, qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) o PCR en tiempo real es una variante de la PCR utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta o relativa el producto de la amplificación de ADN. La diferencia principal con la PCR es el uso de un fluoróforo que permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos tras excitarlo a la longitud de onda apropiada. Dicha medición se realiza tras cada ciclo de amplificación, y es por esto que se le denomina PCR en tiempo real.

Como se ha comentado, esta técnica puede cuantificar de forma relativa la expresión del gen a estudio frente a otro, denominado «normalizador», que se selecciona por su expresión casi constante. De este modo, efectuando en cada experimento la medición de los genes de interés y

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

restándoles la expresión del gen normalizador seleccionado es posible comparar los primeros aún sin conocer en términos absolutos su nivel de expresión. El gen normalizador que se utilizó para la cuantificación en este caso fue aquel que codifica para la β -actina por tratarse de una proteína de expresión ubicua y constante.

Tras terminar el experimento, el equipo proporciona los valores de umbral de ciclo (C_t) de cada muestra y las curvas de amplificación. Este valor corresponde a la intersección entre una curva de amplificación y una línea de umbral. Se trata de una medición relativa de la concentración del objetivo en la reacción de PCR. Cuanto mayores son los valores de C_t menores son los niveles de expresión del gen ya que esto quiere decir que había una menor cantidad de ADNc de partida y durante la amplificación han sido necesarios más ciclos para obtener señal fluorescente.

Otra medida útil del buen progreso del ensayo fueron las curvas de fusión o *Melt Curve*. Durante el último ciclo de amplificación el sistema realiza una curva de fusión que traza el cambio de fluorescencia observado cuando el ADN de doble hebra se disocia en ADN monocatenario a medida que aumenta la temperatura de la reacción lentamente de 60°C a 95°C en saltos de 3°C. Si al finalizar el proceso se observa un único pico de fluorescencia frente a la temperatura significa que la amplificación es correcta y de un único producto tal y como se espera.

3.6.1. Validación de los cebadores específicos

Con el fin de verificar la eficiencia y posible uso de los cebadores para la cuantificación de la expresión de los genes se llevó a cabo su validación haciendo uso de una recta de calibrado con diluciones seriadas de ADNc. Para ello, en primer lugar, se mezclaron en un tubo tipo Eppendorf 3 μ L de ADNc de las 18 réplicas de ADNc (9 de tegumento y 9 de cuerpo graso). Con esta mezcla maestra de 54 μ L de ADNc se realizaron 3 diluciones seriadas en nuevos tubos: 1/10, 1/25 y 1/50. De esta forma, se obtuvieron 4 mezclas, de más concentrada a menos concentrada. A mayor cantidad de muestra, mayor señal se produciría en el equipo al realizar la amplificación garantizando que dentro del rango dinámico de las muestras la amplificación se realizaría según lo esperado. De esta forma, se dispuso en una placa de 96 pocillos, 3 réplicas técnicas de cada una de las concentraciones (a excepción de la dilución 1/50, en la que solo se llevaron a cabo dos réplicas técnicas) utilizando todos los cebadores dispuestos de acuerdo a la **Figura 13**.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

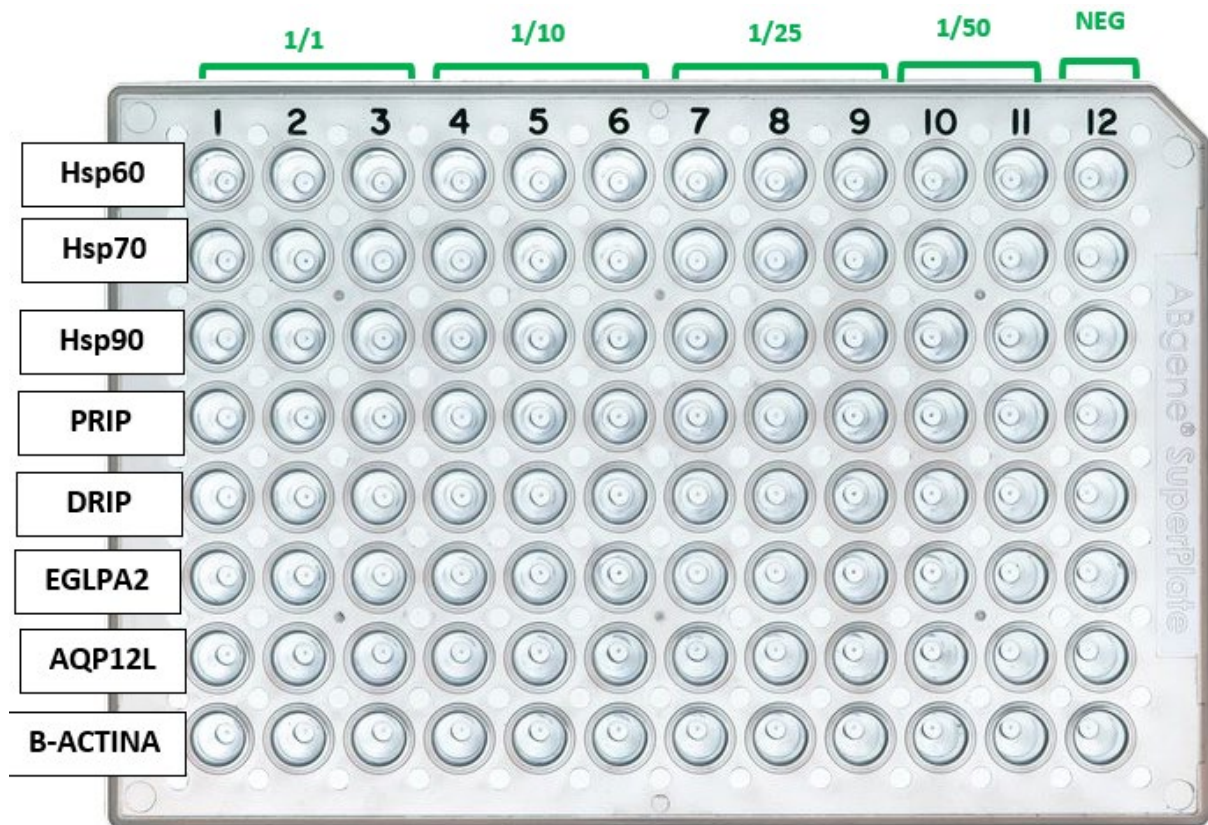


Figura 13. Disposición de las muestras en una placa de 96 pocillos para llevar a cabo la validación de los cebadores. De izquierda a derecha se pueden observar las réplicas técnicas de cada una de las diluciones seriadas de ADNc. De arriba abajo se puede observar la disposición seguida para los cebadores de cada uno de los genes. En la última columna se realiza el control negativo, en el que no se deposita molde de ADNc, este es sustituido por agua destilada estéril.

En cada pocillo se añadieron 5 μL de mezcla maestra de PCR *Applied Biosystems SYBR Green* (ThermoFisher), 1,2 μL de agua destilada estéril, 0,8 μL de ADNc molde (de la mezcla maestra 1/1 o las diluciones 1/10, 1/25 o 1/50) y 3 μL de cada pareja de cebadores (5 μM).

En este caso la mezcla maestra de PCR *Applied Biosystems SYBR Green* ya incluye el colorante *SYBR Green I*, la ADN polimerasa *AmpliTaQ Gold*, desoxinucleótidos (dNTP), la referencia pasiva con colorante ROX y un tampón optimizado para llevar a cabo la reacción.

El volumen final de cada reacción fue de 10 μL . Se mezcló suavemente y se dispuso en el termociclador con el siguiente programa:

- 10 minutos a 95°C,
- 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y
- 1 minuto a 60°C,
- 15 segundos a 95°C,
- 1 minuto a 60°C,
- 15 segundos a 95°C.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

En el último ciclo el sistema realiza entre los dos últimos pasos un análisis de curva de fusión o *Melt Curve* en la que cambia de temperatura lentamente (intervalos de 0,3°C) para evaluar la longitud del amplicón realizado y confirmar que se ha producido un producto único y específico.

Una vez se obtuvieron los valores de C_t estos se representaron en gráficas frente a las concentraciones de las 4 diluciones realizadas y se obtuvieron los valores de R^2 que indicaron si el ajuste de las variables fue óptimo. R^2 es un término estadístico que indica lo bueno que es un valor para predecir otro. Cuando R^2 es 1, el valor de Y (C_t) se puede utilizar para predecir con exactitud el valor de X (en este caso, la concentración de cada dilución). Si R^2 es 0, el valor de X no se puede predecir a partir del valor de Y. Un valor de $R^2 > 0,99$ proporciona buena confianza para correlacionar dos valores. Podemos ver el resultado para cada gen en la **Figura 18**.

3.6.2. Cuantificación génica de las muestras

Con el objetivo de llevar a cabo la cuantificación de los genes que codifican las proteínas Hsp60, Hsp70, Hsp90, PRIP, DRIP, EGLPA2 y AQP12L usando como control positivo o referencia el gen de la β -actina se realizaron 5 placas de PCR cuantitativa. En cada pocillo se añadieron 5 μ L de mezcla maestra de PCR *Applied Biosystems SYBR Green* (ThermoFisher), 1,2 μ L de agua destilada estéril, 0,8 μ L de ADNc molde (de cada una de las réplicas preparadas como se explica en el **apartado 3.3** de Materiales y Métodos) y 3 μ L de cada pareja de cebadores (5 μ M) haciendo un total de 10 μ L de volumen de reacción. Se realizaron 3 réplicas técnicas para cada ADNc y un control negativo por gen en el que el ADNc fue sustituido por agua destilada estéril. Se utilizó el mismo programa que se describe en el **apartado 3.6.1**.

Una vez se obtuvieron los valores de C_t , se normalizaron frente a los valores de C_t del gen normalizador de la β -actina y se calcularon las diferencias relativas de expresión entre los diferentes grupos y los diferentes tejidos (en el caso de las Hsp). De la misma manera se llevó a cabo su análisis estadístico mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) utilizando el software *Statgraphics*. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

Podemos ver representado en las **Figuras 20-24** mediante gráficos de cajas y bigotes los valores de expresión relativa de cada gen amplificado en cada condición experimental.

4. RESULTADOS

4.1. Extracciones de ARN total

4.1.1. Concentración de ARN

Tras llevar a cabo las extracciones de ARN de la forma descrita en el **apartado 3.2** y medir las concentraciones de cada una de las muestras en el NanoDrop según se explica en el **apartado 3.2.1**, se obtuvieron los datos mostrados en la **Tabla 1** y **Tabla 2** de cuerpo graso y tegumento respectivamente.

EXTRACCIONES DE ARN DE CUERPO GRASO						
INDIVIDUO	GRUPO CONTROL		GRUPO FRÍO		GRUPO TA	
	Cantidad tejido (mg)	Concentración extracto (ng/ μ L)	Cantidad tejido (mg)	Concentración extracto (ng/ μ L)	Cantidad tejido (mg)	Concentración extracto (ng/ μ L)
1	89	524	85	249	80	433
2	83	592	83	563	81	412
3	83	532	85	239	80	233
4	83	485	83	338	80	219
5	80	313	77	509	84	485
6	80	268	82	678	85	416
7			80	219		
8			80	443		
9			85	687		

Tabla 1. Resumen de los datos de las extracciones de ARN de cuerpo graso de *Rhynchophorus ferrugineus*. Un total de 6 individuos para los grupos control y TA y un total de 9 para el grupo frío. Indicado en diferentes colores cada grupo experimental. En cada grupo se detalla la cantidad de tejido del que se parte para la extracción (izquierda) y finalmente la concentración mostrada por espectrofotometría en NanoDrop (derecha).

Antón Ruiz, Noelia

 RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

EXTRACCIONES DE ARN DE TEGUMENTO						
INDIVIDUO	GRUPO CONTROL		GRUPO FRÍO		GRUPO TA	
	Cantidad tejido (mg)	Concentración extracto (ng/μL)	Cantidad tejido (mg)	Concentración extracto (ng/μL)	Cantidad tejido (mg)	Concentración extracto (ng/μL)
1	84	971	83	377	80	680
2	83	489	83	398	83	788
3	81	1249	83	732	82	864
4	83	573	86	658	84	880
5	82	639	82	315	83	388
6	84	542	83	342	86	841
7			84	363		
8			84	526		
9			84	462		

Tabla 2. Resumen de los datos de las extracciones de ARN de tegumento de *Rhynchophorus ferrugineus*. Un total de 6 individuos para los grupos control y TA y un total de 9 para el grupo frío. Indicado en diferentes colores cada grupo experimental. En cada grupo se detalla la cantidad de tejido del que se parte para la extracción (izquierda) y finalmente la concentración mostrada por espectrofotometría en NanoDrop (derecha).

4.1.2. Integridad y calidad del ARN

Siguiendo con las electroforesis en gel de agarosa, que se realizaron para comprobar la integridad del ARN extraído, así como la ausencia de ADN genómico tal y como se explica en el **apartado 3.2.2**, podemos observar los resultados para cuerpo graso y tegumento respectivamente en las **Figuras 14 y 15** tomadas por fotografía digital desde el transiluminador de luz UV.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

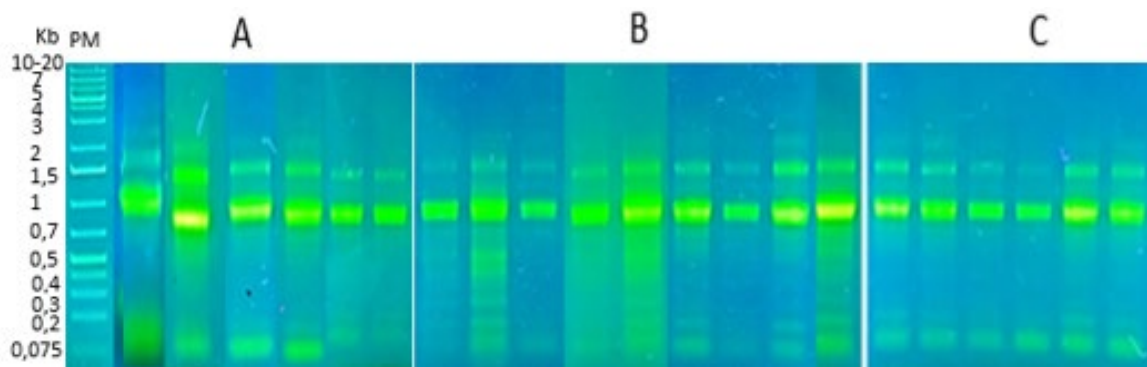


Figura 14. Geles de agarosa al 1% realizado tras las extracciones de cuerpo graso de *Rhynchophorus ferrugineus*. **Panel A.** Muestras del grupo experimental control, de izquierda a derecha, individuos del 1 al 6. **Panel B.** Muestras del grupo experimental frío, de izquierda a derecha, individuos del 1 al 9. **Panel C.** Muestras del grupo experimental TA, de izquierda a derecha, individuos del 1 al 6. A la izquierda de la imagen se puede ver el marcador de peso molecular (PM) en el orden de kilobases (Kb). Para facilitar la visualización, se han combinado imágenes de distintos geles en la misma figura.

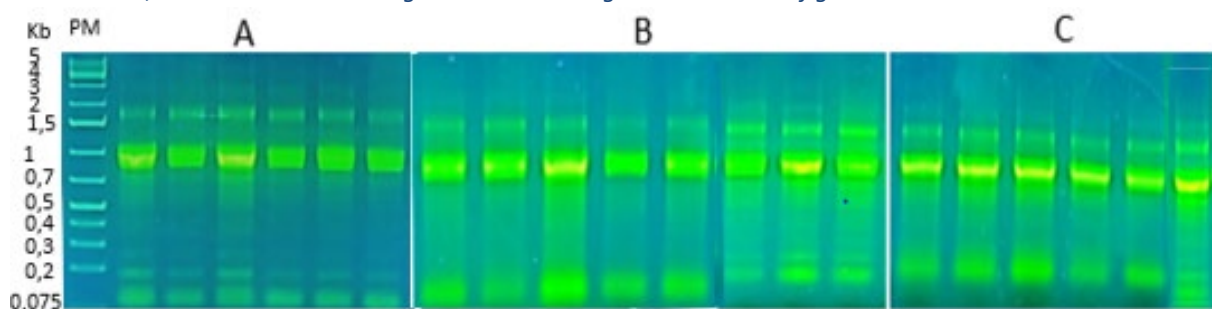


Figura 15. Geles de agarosa al 1% realizado tras las extracciones del tegumento de *Rhynchophorus ferrugineus*. **Panel A.** Muestras del grupo experimental control, de izquierda a derecha, individuos del 1 al 6. **Panel B.** Muestras del grupo experimental frío, de izquierda a derecha, individuos del 1 al 9. **Panel C.** Muestras del grupo experimental TA, de izquierda a derecha, individuos del 1 al 6. A la izquierda de la imagen se puede ver el marcador de peso molecular (PM) en el orden de kilobases (Kb). Para facilitar la visualización, se han combinado imágenes de distintos geles en la misma figura.

Como vemos en las **Figuras 14 y 15**, las extracciones de ARN llevadas a cabo fueron adecuadas pues, en todas las muestras aparece un patrón de 2 bandas más intensas, una de ~1,5 kilobases (Kb) de tamaño, correspondiente a la subunidad mayor del ARN ribosomal (28S) y, otra de ~1 Kb, correspondiente a la subunidad menor del ARN ribosomal (18S). Además, en ninguna se observan bandas de peso molecular más elevado que indicaría la presencia de ADN genómico en la muestra y por lo tanto contaminación.

Para confirmar la homogeneidad de los resultados que aparecieron en las electroforesis en gel de agarosa se llevaron a cabo electroforesis capilares usando el Bioanalizador Agilent 2100 tal y como se explica en el **apartado 3.2.2 b)** de Materiales y Métodos. En la **Figura 16** podemos ver un ejemplo del patrón de bandas que este sistema proporciona.

Antón Ruiz, Noelia
RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

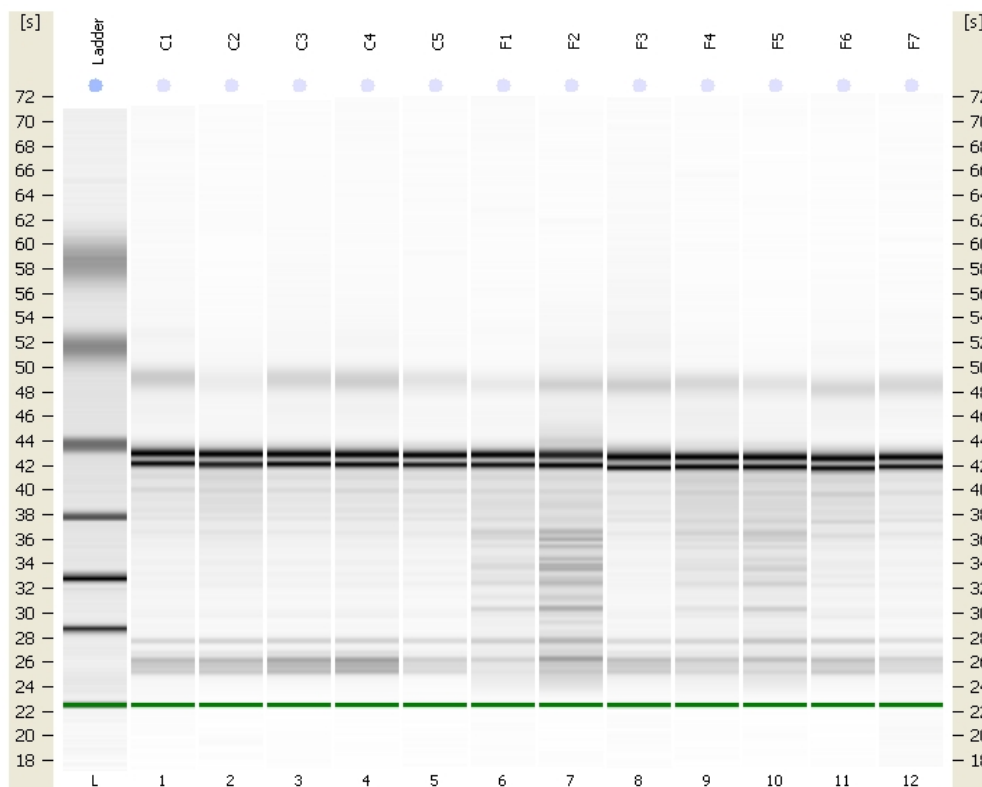


Figura 16. Patrón de bandas mostrado por el Bioanalizador Agilent 2100 tras llevar a cabo la electroforesis en chip para los individuos 1 a 5 del grupo control (C1 a C5) y para los individuos 1 a 7 del grupo frío (F1 a F7) de tejido de cuerpo graso (de izquierda a derecha en la imagen). En la primera calle se puede observar el Ladder o patrón de pesos moleculares que el sistema toma como referencia y a los extremos una referencia de tiempo en segundos a los que se detecta señal fluorescente. Vemos que entre 42 y 44 segundos aparecen en todas las muestras dos bandas correspondientes a los ARNr 18S y 28S.

Como vemos, al igual que ocurría en las electroforesis en gel, aparece detección fluorescente que se refleja en dos bandas más intensas entre los 42 y los 44 segundos correspondientes a las subunidad mayor y menor del ARN ribosomal según la guía del fabricante. Además, en los individuos 1, 2, 4 y 5 del grupo frío se puede observar la aparición de bandas intensas de menor peso molecular a lo largo del recorrido de la calle indicando que existe algo de degradación parcial. Algunas de ellas no eran tan fáciles de ver en los geles de agarosa y es por ello que esta técnica es útil para determinar la degradación parcial de las muestras. Aun así, se concluyó que las muestras extraídas presentaron una calidad e integridad suficiente para su uso posterior.

4.2. Validación de cebadores específicos

Una vez se llevó a cabo el diseño de los cebadores usando la aplicación *Benchling* para la amplificación de los genes deseados tal y como se detalla en el **apartado 3.4** de Materiales y

Antón Ruiz, Noelia

 RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

Métodos se obtuvieron las secuencias y los parámetros que se muestran en la **Tabla 3** para cada una de las parejas.

Nombre cebador	Tf (°C)	Secuencia (5'- 3')	Longitud producto (pb)
Hsp60-F	61,6	AGG AGC ATC TTA ACA AAG CAG TAC	123
Hsp60-R	60,2	GAA GTA GTG AAG TTG AGG TTA ATG AG	
Hsp70-F	71,2	CAT TTA GGA TGC CGT TGG CGT C	108
Hsp70-R	62,2	ACA ACA ATC TGC TAG GTA CCT TTG	
Hsp90-F	67,5	ACC TCA ACC TTG TCA GCC ACC	160
Hsp90-R	62,2	AAG ATG AAT TAA CGC AGA ATT TAG G	
PRIP-F	63,1	AGC TCC ACT AAC ATG ACC CAG	171
PRIP-R	66,4	TTG CTA GCC GAG TTC TTG GG	
DRIP-F	66,2	CAG GCA ACA TGA ATT TCA AGA ATG	148
DRIP-R	69,5	CAC GTC AGC GGA TGC CAC	
EGLPA2-F	65,3	CCA AGG CCA GTA TCA TGG TG	175
EGLPA2-R	61,2	GGT TTC GGT TTG TTG AAT ATT GTT AC	
AQP12L-F	64,1	CCC CAG TTA TCT GCA ACA ATG	130
AQP12L-R	61,6	CCA GAA GGT TAG TCG AAA AAT ATG	
β-ACTINA-F	67,7	AAAGGTTCCGTTGCCCTGAA	129
β-ACTINA-R	65,1	TGGCGTACAAGTCCTTCCTG	

Tabla 3. Resumen de los parámetros de las parejas de cebadores diseñados para la amplificación génica. En la primera columna se describe el nombre del gen acompañado de una F (Forward) o una R (Reverse) dependiendo del cebador de la pareja del que se trate. En la segunda columna la temperatura de fusión (Tf) de los cebadores a la hebra de ADN. En la tercera columna encontramos la secuencia en sentido 5'→3' de cada cebador y en la última columna el número de pares de bases(pb) del producto que amplifica cada pareja.

Para verificar que los cebadores diseñados en *Benchling* (así como el control positivo de la β-actina tomado de la bibliografía) funcionaban correctamente se hizo una prueba de amplificación en PCR con todos ellos utilizando ADNc de una muestra aislada del individuo 1 del grupo control de tejido del cuerpo grasoso (previo a realizar la mezcla maestra de las réplicas indicada anteriormente). De la misma forma, las reacciones sirvieron para, previo a realizar la PCR cuantitativa, optimizar las cantidades de molde y cebadores de las mezclas de reacción para obtener el mayor rendimiento posible. Tras la reacción, todas las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron tras llevar a cabo una electroforesis. Podemos ver los resultados en la **Figura 17**.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)



Figura 17. Gel de agarosa al 2% realizado tras llevar a cabo una prueba de PCR con todos los cebadores diseñados utilizando el ADNc del individuo 1 del grupo control de tejido cuerpo graso de *Rhynchophorus ferrugineus*. En la primera calle se puede visualizar el marcador de peso molecular (PM) en el orden de pares de bases (pb). De izquierda a derecha en la imagen encontramos de forma consecutiva la prueba y su respectivo control negativo (sustituyendo el molde por la misma cantidad de agua) de los cebadores para la amplificación de los genes *Hsp60*, *Hsp70*, *Hsp90*, *EGLPA2*, *PRIP*, *DRIP*, *AQP12L* y β -actina.

Como vemos en la **Figura 17**, en todos los casos vemos un producto amplificado con mayor o menor definición e intensidad y, en todos los controles negativos solo se observa una banda de peso molecular menor de 100 pb correspondiente posiblemente a dímeros de oligonucleótidos, a excepción del control negativo de *EGLPA2* en la que no se observa ninguna banda. Por lo que, en líneas generales, podemos decir que el diseño de los cebadores fue el correcto ya que en todos los genes se observa, al menos, una banda de entre 100 y 200 pb correspondiente al producto amplificado ajustándose a los tamaños de amplicón esperados que se especifican en la **Tabla 3**.

En el caso de *AQP12L* la banda que se visualiza es muy leve en intensidad y en definición, lo que quiere decir que no se ha amplificado una gran cantidad de producto que puede deberse a un diseño de cebadores deficiente o a una menor expresión, entre otros. En el caso de *Hsp90*, y con mayor definición e intensidad todavía en el caso de *PRIP*, observamos la aparición de una segunda banda de un peso molecular mayor, de unos 220-240 pb. Esta segunda banda de mayor peso a la expresión podría explicarse por la expresión de una isoforma distinta de la misma proteína mediante el procesamiento alternativo de algún intrón que hace que el transcrito sea más largo. En el caso de *DRIP* parece observarse una banda de mayor peso molecular, de unas 300 pb pero parece tratarse de una banda inespecífica. Todos estos casos excepcionales se verifican más adelante utilizando el equipo de PCR cuantitativa en tiempo real.

Finalmente, para llevar a cabo una validación definitiva de estos cebadores, se realizó el proceso descrito en el **apartado 3.6.1** de Materiales y Métodos utilizando el equipo de PCR cuantitativa en tiempo real y se trataron los datos de forma que se pudieran hacer diferentes regresiones lineales y obtener los valores de R^2 que se muestran en la **Figura 18**.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

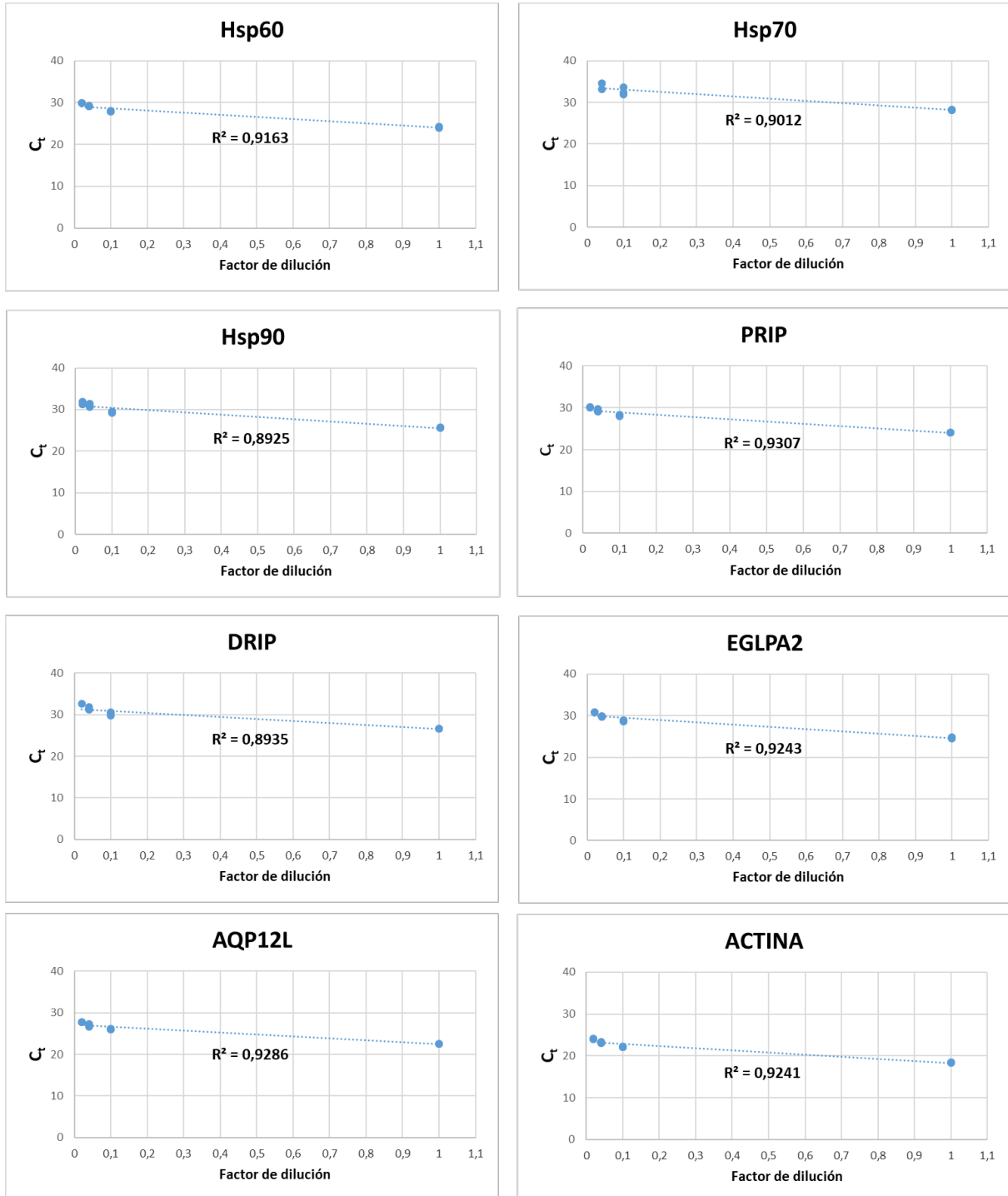


Figura 18. Regresión lineal resultante de la representación de la variación de los valores de Ct frente al factor de dilución aplicado en la validación de cada una de las parejas de cebadores en el equipo de qPCR en tiempo real. Vemos representado en cada una de las gráficas el nombre del gen amplificado y el valor de R².

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

Como se observa en la **Figura 18**, en todas las amplificaciones el valor de R^2 es elevado ($>0,89$), lo que indica que el ajuste de las variables fue adecuado, es decir, que, a mayor concentración de ADNc en la dilución se corresponden menores valores de C_t , lo que indica un inicio de amplificación previo, en un menor número de ciclos de PCR. El mayor valor de R^2 fue el de la amplificación de *PRIP* (0,9307) y el menor fue el de la amplificación de *Hsp90* (0,8925) aunque en todos los casos los valores son lo suficientemente altos como para afirmar un buen funcionamiento de todos los cebadores diseñados.

4.3. Síntesis de ADNc

Con el fin de retrotranscribir a ADNc el ARN de cada mezcla maestra de las 18 réplicas biológicas (9 de cuerpo graso y 9 de tegumento) se llevó a cabo una transcripción inversa tal y como se describe en el **apartado 3.3** de Materiales y Métodos. Para verificar que el proceso había transcurrido según lo previsto se llevó a cabo una PCR utilizando el cebador para el gen de la β -actina (previamente verificado su buen funcionamiento). Tras la reacción, todas las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron tras realizarse una electroforesis. Podemos ver los resultados para tejido graso y para tegumento en la **Figura 19A y 19B** respectivamente.

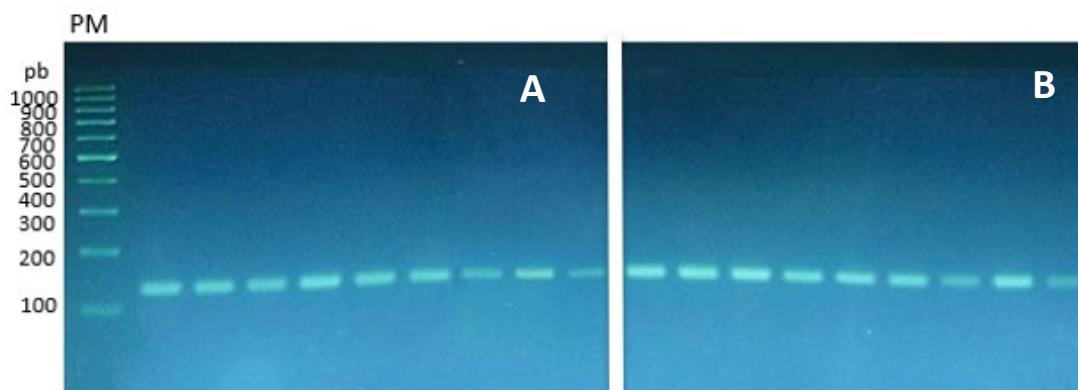


Figura 19. Gel de agarosa al 2% realizado tras llevar a cabo una prueba de PCR con el cebador para la β -actina utilizando como molde todos los ADNc obtenidos tras la retrotranscripción. **Panel A.** Muestras para tejido cuerpo graso. De izquierda a derecha encontramos las muestras con las réplicas biológicas 1, 2 y 3 del grupo control; 1, 2 y 3 del grupo frío y; 1, 2 y 3 del grupo TA. **Panel B.** Muestras para tejido del tegumento. De izquierda a derecha encontramos las muestras con las réplicas biológicas 1, 2 y 3 del grupo control; 1,2 y 3 del grupo frío y; 1,2 y 3 del grupo TA. En la primera calle se puede visualizar el marcador de peso molecular (PM) en el orden de pares de bases (pb).

Como se observa en la **Figura 19** tanto en cuerpo graso (**19A**) como en tegumento (**19B**), aparece una banda de unas 130 pb correspondiente en tamaño al amplicón del gen control β -actina (**Tabla 3**) por lo que podemos decir que el ADNc era de calidad y por lo tanto útil. Si bien es cierto que, en las réplicas 1 y 2 de TA tanto en cuerpo graso como en tegumento las bandas son algo menos intensas, algo que no debería ocurrir en un gen del que se espera una expresión ubicua y constante.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

4.4. Análisis de la qPCR

Con el objetivo final de cuantificar los niveles de expresión génica que aparecían en cada grupo experimental para los genes de interés, se llevaron a cabo diferentes qPCR en un total de 5 placas de 96 pocillos. Tras obtener los valores de C_t que el sistema proporcionó, los datos se trataron de la forma en que se indica en el **apartado 3.6.2** de Materiales y Métodos y se obtuvieron los resultados que aparecen en la **Figura 20-24**.

En el caso del grupo experimental TA, se descartaron sus resultados y posterior representación debido a que los valores de C_t del control interno o de referencia (β -actina) que aparecieron en las réplicas tanto de cuerpo grasso (**Anexo A**) como de pared (**Anexo B**) fueron muy elevados indicando una muy baja expresión con respecto a lo que ocurría en el resto de grupos experimentales. Este hecho provocó que no se pudieran normalizar correctamente los datos para este grupo en los diferentes genes que se pretendían analizar. Esto se corresponde con lo mostrado en la **Figura 19** donde la intensidad de las bandas amplificadas en las réplicas 1 y 2 del grupo TA en cuerpo grasso y tegumento no se corresponden con la intensidad del resto de bandas indicando que en esas condiciones no se produce la expresión de la β -actina de forma constante o indicando que es necesario un mayor número de individuos en las réplicas de ese grupo experimental para suplir el posible error derivado de las variaciones en expresión génica entre distintos individuos.

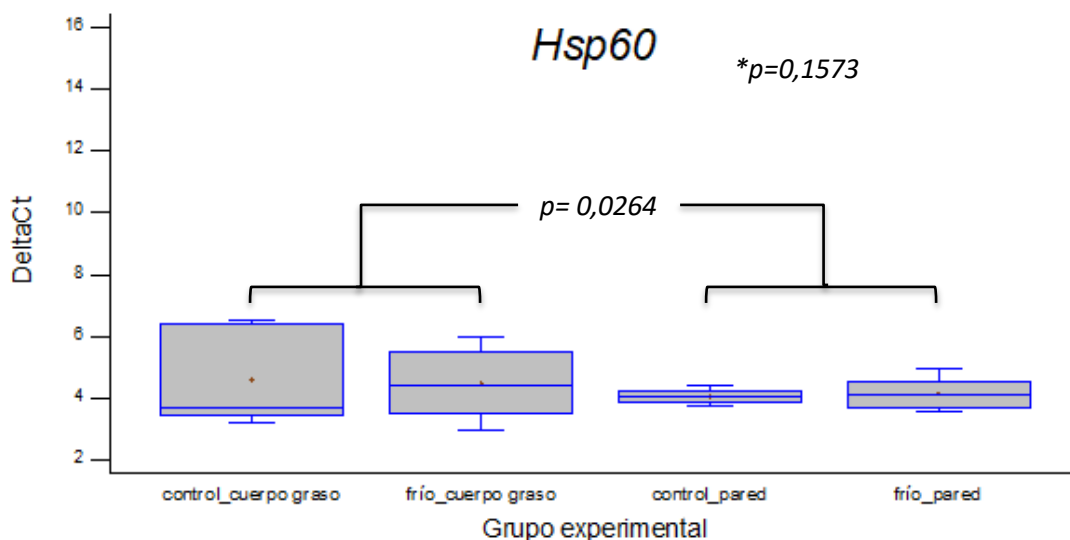


Figura 20. Representación en cajas y bigotes de los niveles de expresión del gen Hsp60 en los individuos de grupo control de cuerpo grasso (control_cuerpo grasso) en los individuos del grupo frío de cuerpo grasso (frío_cuerpo grasso), en los individuos del grupo control de tegumento (control_pared) y en los individuos del grupo frío de tegumento (frío_pared). En el eje de las ordenadas se representa los valores de ΔCt tras los cálculos realizados en la qPCR. *Valor de p entre los diferentes tratamientos.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

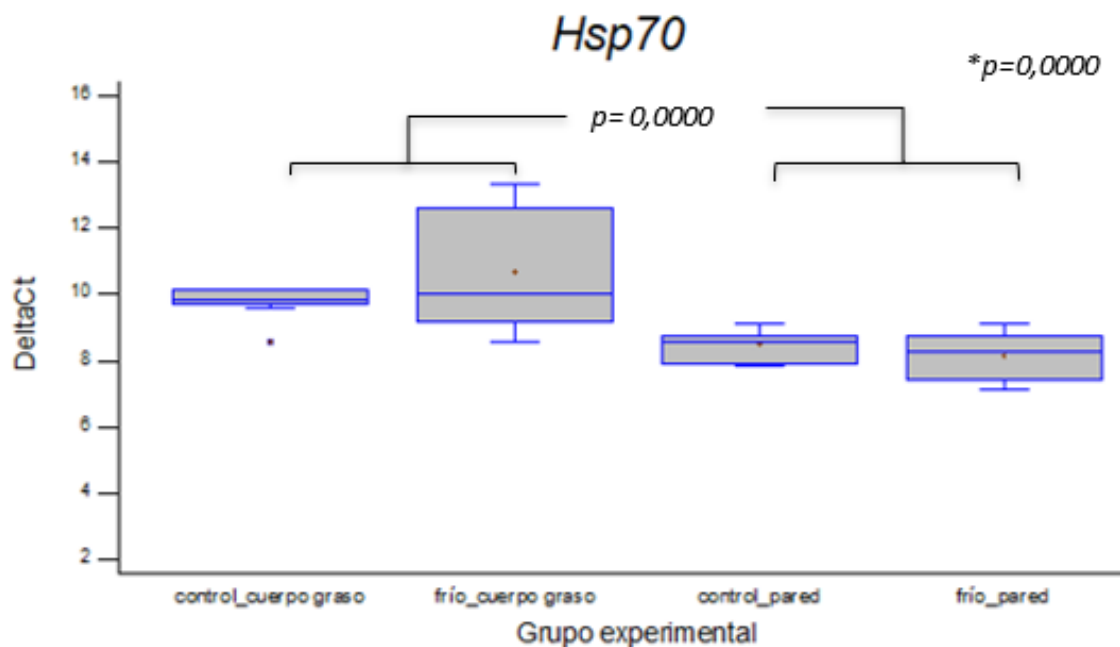


Figura 21. Representación en cajas y bigotes de los niveles de expresión del gen Hsp70 en los individuos del grupo control de cuerpo graso (control_cuerpo graso) en los individuos del grupo frío de cuerpo graso (frío_cuerpo graso), en los individuos del grupo control de tegumento (control_pared) y en los individuos del grupo frío de tegumento (frío_pared). En el eje de las ordenadas se representa los valores de ΔCt tras los cálculos realizados en la qPCR. *Valor de p entre los diferentes tratamientos.

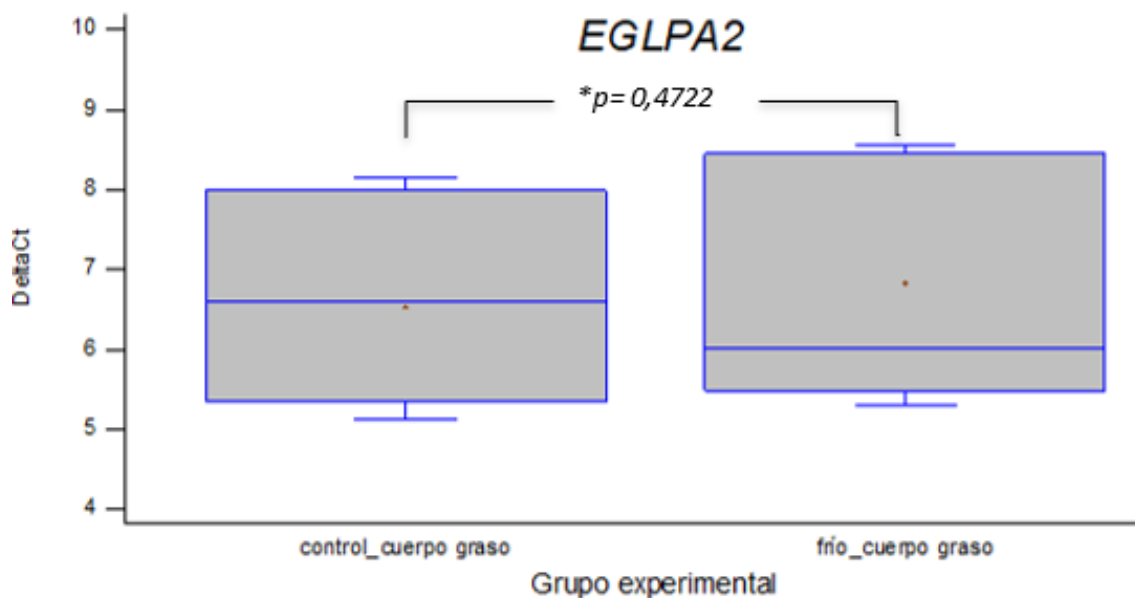


Figura 22. Representación en cajas y bigotes de los niveles de expresión del gen EGLPA2 en los individuos del grupo control de cuerpo graso (control_cuerpo graso) en los individuos del grupo frío de cuerpo graso. En el eje de las ordenadas se representa los valores de ΔCt tras los cálculos realizados en la qPCR. *Valor de p entre los diferentes tratamientos.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

control). Tras esto, en el caso de *Hsp60* se observaron diferencias significativas entre tejidos ($p = 0,0264$), siendo algo mayor la expresión en tegumento, aunque sin diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0,1573$). De igual forma, para el gen *Hsp70* se observó una mayor expresión en tegumento que en cuerpo graso ($p = 0,000$) y se encontraron diferencias significativas en su expresión entre tratamientos ($p = 0,000$) en cuerpo graso, aumentando ligeramente la expresión del gen en condiciones de frío ($9,7 C_t$ vs $10,7 C_t$ en control).

Como vemos, en el caso de las Hsp que hemos estudiado, *Hsp60* y *Hsp70*, podemos decir que su expresión es mayor en el tegumento que en el cuerpo graso, y que la expresión de *Hsp70* incrementa ligeramente por el tratamiento de frío.

Pasando a analizar los datos de las acuaporinas en cuerpo graso, en el caso de EGLPA2 (**Figura 22**) no parecen haber diferencias significativas entre los tratamientos de control y frío ($p = 0,4722$) posiblemente debido a la variación de valores C_t entre las réplicas de cada tratamiento y a un insuficiente número de individuos por réplica.

En lo que se refiere a la expresión de *AQP12L* (**Figura 23**), podemos decir que sí se observan diferencias significativas ($p = 0,000$) entre ambos tratamientos, disminuyendo su expresión en condiciones de frío lo que parece ser coherente en la regulación de contenido en agua en el citoplasma de las células evitando la congelación cuando disminuye la temperatura drásticamente.

Por último, el gen de la acuaporina DRIP (**Figura 24**) parece disminuir su expresión de forma significativa ($p = 0,0004$) cuando los insectos son sometidos a una bajada de temperatura.

Como vemos, en el caso de las acuaporinas parece haber una clara tendencia a la disminución de expresión en condiciones de frío, aunque es necesario seguir investigando y realizar de nuevo los experimentos con un mayor número de individuos por grupo intentando evitar la variación entre individuos independientes que pueden reaccionar de manera muy estocástica.

No se pudo cuantificar adecuadamente la expresión de *PRIP* y *Hsp90*, ya que se obtuvo más de un pico en la curva de fusión o *Melt curve* por réplica, lo que podía indicar que se estaban amplificando fragmentos, podemos ver un ejemplo en los **Anexos C** y **D**. Para comprobarlo, posteriormente se cargaron las muestras en un gel de agarosa al 2,5% y se observaron, efectivamente, en el caso de las réplicas para frío y para control, varias bandas de ADN. De 170 pb y 220 pb para el gen *PRIP* (**Figura 25**) y, de 160 pb y 210 pb para el gen *Hsp90* (**Figura 26**).

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)



Figura 25. Gel de agarosa al 2,5% para los productos de amplificación del gen PRIP en cuerpo graso. De izquierda a derecha se observan las réplicas 1, 2 y 3 del grupo control, las réplicas 1, 2 y 3 del grupo frío y las réplicas 1, 2 y 3 del grupo de TA. En la primera calle se puede visualizar el marcador de peso molecular (PM) en el orden de pares de bases (pb).

En lo que se refiere a PRIP (**Figura 25**) en cuerpo graso, vemos que en las réplicas para frío y en la réplica 2 de grupo control aparecen dos bandas pareciendo predominante la banda de 220 pb en el grupo control y la de 170 pb en grupo frío. En el caso de las réplicas para TA, parece solo presentarse la banda de 220 pb (exceptuando la réplica 1 en la que no aparece ninguna banda). Una explicación válida podría ser la aparición de fenómenos de procesamiento alternativo del ARN en estos genes, de forma que, en algunas condiciones se expresa una isoforma no esperada de mayor peso molecular que incluye el no procesamiento de un intrón de unas 56 pb (incluido en el producto de amplificación durante el diseño de los cebadores para este gen). Además, parece haber más intensidad de señal o, lo que es lo mismo, mayor nivel de expresión de la banda de 220 pb en los insectos del grupo control y TA y; mayor intensidad de señal o, mayor expresión de la banda de 170 pb en condiciones de frío.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

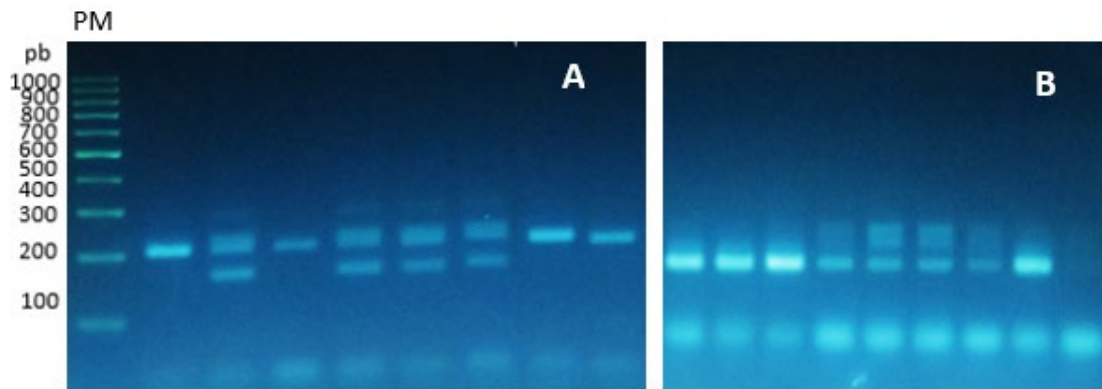


Figura 26. Gel de agarosa al 2,5% para los productos de amplificación del gen *Hsp90* en cuerpo graso y en el tegumento. **Panel A.** Muestras de tejido de cuerpo graso. De izquierda a derecha se observan las réplicas 1, 2 y 3 del grupo control, las réplicas 1, 2 y 3 del grupo frío y las réplicas 1 y 2 del grupo de TA (la réplica 3 del grupo TA no pudo ser cargada). **Panel B.** Muestras de tejido de tegumento. De izquierda a derecha se observan las réplicas 1, 2 y 3 del grupo control, las réplicas 1, 2 y 3 del grupo frío y las réplicas 1, 2 y 3 del grupo de TA. En la primera calle se puede visualizar el marcador de peso molecular (PM) en el orden de pares de bases (pb).

En lo que se refiere a la expresión de *Hsp90* en cuerpo graso (**Figura 26A**), vemos que el patrón observado en *PRIP* se repite, en las réplicas para frío y en la réplica 2 de grupo control aparecen dos bandas pareciendo predominante la banda de 210 pb en el grupo control y la banda de 160 pb en grupo frío. En el caso de las réplicas para TA, parece solo presentarse la banda de 210 pb. En el tegumento (**Figura 26B**), las bandas de mayor peso molecular aparecen algo más difusas pudiendo tratarse no de una, si no dos bandas muy juntas de unas a 210 pb. En este caso, en el grupo control parece ser predominante la banda de 160 pb y en el grupo frío la banda de 210 pb. En el caso de las réplicas del grupo TA, la banda de 210 pb está algo más difusa y no se puede concretar su verdadera presencia o si se trata de una banda inespecífica. En el caso de la réplica 3 del grupo TA no se observa ninguna banda. Esto podría explicarse si se estuvieran dando, al igual que en el caso de *PRIP*, fenómenos de inespecificidad de los cebadores o, entre otros, fenómenos de procesamiento alternativo del ARN de forma que, en algunas condiciones se expresa una isoforma no esperada de mayor peso molecular que incluye el no procesamiento de un intrón de unas 47 pb (incluido en el producto de amplificación durante el diseño de los cebadores para este gen). De esta forma, en el caso de *Hsp90*, podrían no solo aparecer diferentes niveles de expresión entre condiciones experimentales si no, además, entre diferentes tejidos corporales siendo justamente opuesta al tipo de expresión de las dos bandas entre cuerpo graso y tegumento.

5. DISCUSIÓN

En primer lugar, podemos afirmar respaldado por los resultados de las **Figuras 14 y 15**, que el procedimiento optimizado llevado a cabo para la extracción de ARN en *Rhynchophorus ferrugineus* fue adecuado pues en los geles de agarosa se observa la detección de dos bandas bien diferenciadas correspondientes a la subunidad mayor del ARN ribosomal 28S y a la subunidad menor del ARN ribosomal 18S en todos los individuos. Estos resultados se respaldan, además, por los experimentos en el Bioanalizador Agilent 2100, donde las condiciones de medida son más homogéneas y tienen mayor precisión (**Figura 16**). La presencia de una gran cantidad de grasa en las muestras de tejido de cuerpo graso puede estar ocasionando una menor calidad de las extracciones de ARN, observándose al comparar las **Tablas 1 y 2** que, en general, las concentraciones de ARN medidas por NanoDrop en las muestras de tegumento son superiores a las medidas en cuerpo graso.

Pasando a analizar el diseño descrito de cebadores específicos para los genes que codifican las proteínas de choque térmico Hsp60, Hsp70, Hsp90 y las acuaporinas PRIP, DRIP, EGLPA2 y AQP12L; podemos indicar a juzgar por la prueba de PCR llevada a cabo con cada pareja de cebadores y posterior visualización en gel de agarosa (**Figura 17**) que, a priori, en todos los casos se observa un producto amplificado con mayor o menor definición e intensidad justificado por una banda de entre 100 y 200 pb que podría corresponder a los tamaños de amplicón esperados que se especifican en la **Tabla 3**. De la misma forma, la validación con cada una de las parejas de cebadores utilizadas apoyada por la obtención de valores de R^2 cercanos a 1, parecen indicar que funcionan de la forma esperada. Sin embargo, en el caso de AQP12L el gel de la **Figura 17** muestra una banda que se visualiza muy leve en intensidad y en definición, lo que indicaría que no se ha amplificado una gran cantidad de producto y puede deberse a un diseño de cebadores inadecuado o a una menor expresión de este gen, entre otros. Más tarde, en la realización de la qPCR con esa pareja de cebadores, no parece observarse ninguna anomalía en la curva de fusión y sus valores de expresión pudieron ser cuantificados adecuadamente por lo que se achaca esa menor intensidad de banda en el gel de la **Figura 17** a un posible error instrumental o de manejo. En el caso de Hsp90 y en el caso de PRIP observamos la aparición de una segunda banda de un peso molecular mayor, de unas 210-220 pb. Esta segunda banda de mayor peso molecular no era esperada según los tamaños de amplicón de la **Tabla 3** en ninguno de los dos casos. Este hallazgo puede explicarse de diferentes maneras. Podría darse la posibilidad de que en el genoma del picudo se encuentren duplicados los genes apareciendo parálogos similares en secuencia, aunque no idénticos, o bien, se puede estar dando la expresión de dos isoformas distintas de la misma proteína mediante el procesamiento

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

alternativo de algún intrón que hace que el transcrito sea más largo existiendo fenómenos de procesamiento alternativo, entre otras posibilidades. Para verificar la verdadera presencia de dos fragmentos distintos, se llevaron a cabo las qPCR y, al analizar los datos mostrados por la curva de fusión de cada una de ellas (**Anexo C** y **D**) se confirmó su presencia en algunos grupos experimentales, sobre todo en control y frío. Más tarde, al cargar los productos de amplificación en un gel de agarosa se confirmó en el caso de PRIP (**Figura 25**) que en las réplicas para frío y la réplica 2 del grupo control aparecían dos bandas pareciendo predominante la de mayor peso molecular (de unas 220 pb) en el grupo control y la de menor peso molecular (de unas 170 pb) en grupo frío. En el caso de las réplicas para TA, solo se amplificó la banda de 220 pb (exceptuando la réplica 1 en la que no aparece ninguna banda posiblemente por la no expresión de este gen en esas condiciones). Con estos tamaños, la posibilidad de existencia de fenómenos de procesamiento alternativo podría ser válida, pues, en el diseño de la pareja de cebadores para PRIP la región de amplificación incluía en el ADN genómico la presencia de un intrón de unas 56 pb, que, en principio no se esperaba que fuese codificante. Además, parece haber más intensidad de señal o, lo que es lo mismo, mayor nivel de expresión de la banda de 220 pb en los insectos del grupo control y TA y; mayor intensidad de señal o, mayor expresión de la banda de 170 pb en condiciones de frío. Este fenómeno de expresión de diferentes variantes o isoformas de la acuaporina PRIP frente a un estrés ya se ha investigado, aunque no en mucha profundidad, en otros insectos como *Chilo supresalis* [42] y en otro tipo de acuaporinas de insectos [59].

En el caso de Hsp90, de forma menos clara en el gel de la **Figura 26** aunque evidente en la curva de fusión tras la qPCR (**Anexo C**), también podemos afirmar la presencia de varios fragmentos durante la amplificación. De esta manera, en lo que se refiere a Hsp90 en cuerpo graso (**Figura 26A**), vemos que el patrón de PRIP se repite, en las réplicas para frío y en la réplica 2 de grupo control aparecen dos bandas pareciendo predominante la de mayor peso molecular o no esperada (de unas 210 pb) en el grupo control y la de menor peso molecular (de unas 160 pb) en el grupo frío. En el caso de las réplicas para TA, parece solo presentarse la banda de 210 pb. En cambio, en tegumento (**Figura 26B**), las bandas de mayor peso molecular aparecen algo más difusas pudiendo tratarse no de una, si no de dos bandas muy juntas de unas 210 pb. En este caso, en el grupo control parece ser predominante la banda de 160 pb y en el grupo frío la de 210 pb. En las réplicas del grupo TA, la banda de 210 pb está algo más difusa y no se puede concretar su verdadera presencia o si se trata de una banda inespecífica, de hecho, en la réplica 3 del grupo TA no se observa ninguna banda indicando la no expresión o, más probablemente, tratarse de algún error de manejo. Al igual que ocurre en *PRIP*, con estos tamaños de banda aproximados, la posibilidad de existencia de fenómenos

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

de procesamiento alternativo podría ser válida, pues, en el diseño de la pareja de cebadores para *Hsp90*, la región de amplificación incluía en el ADN genómico la presencia de un intrón de unas 47 pb, que, en principio, no se esperaba que fuese codificante. De esta forma, en el caso de *Hsp90*, podrían no solo aparecer diferentes niveles de expresión entre condiciones experimentales si no, además, entre diferentes tejidos corporales siendo además de forma contraria el tipo de expresión de las bandas entre cuerpo graso y tegumento debido, posiblemente a la diferente exposición al frío entre un tejido y otro. Fenómenos de procesamiento alternativo en *Hsp90* han sido estudiados en diferentes insectos [60,61] e incluso se ha visto en *Drosophila melanogaster* su aparición frente al estrés térmico por frío como ocurre en el caso de este trabajo [62].

Lo que parece obvio con estos dos genes, sea por el motivo que sea, es que no se pueden cuantificar sus niveles de expresión al solaparse las intensidades de dos tipos de fragmentos distintos. Sin embargo, para el resto sí pudo llevarse a cabo (**Figura 20-24**) siendo necesario el descarte tanto en cuerpo graso como pared la cuantificación del grupo TA debido a una baja expresión del gen normalizador β -actina en varias de las réplicas. Si bien ya se intuía, como se observa en la **Figura 19** tanto en cuerpo graso (**21A**) como en tegumento (**21B**), la aparición en las réplicas 1 y 2 de TA de una banda para el gen de la β -actina algo menos intensa, más tarde al realizar las qPCR (**Anexo A y B**) se verificaron los elevados valores de C_t que el sistema detectaba para el gen normalizador en estas muestras en contraste con los obtenidos en el grupo control y frío, algo que no debería ocurrir en un gen del que se espera una expresión ubicua y constante. Esto puede estar ocurriendo porque en este grupo experimental quizás este control positivo no sea el más adecuado o, por el contrario, sea necesario un mayor número de individuos por réplica para suplir la posible variación individual entre insectos, ya que, a pesar de que todos ellos son sometidos de la misma forma al tratamiento, al ser tomados de la naturaleza es muy difícil asegurar la homogeneidad en sus condiciones de vida de partida.

En lo que respecta a la cuantificación de expresión de los genes, por un lado, en el caso de las proteínas de choque térmico, para *Hsp60* (**Figura 20**) únicamente se observaron diferencias entre tejidos ($p = 0,0264$), siendo algo mayor la expresión en tegumento, aunque sin diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0,1573$). De igual forma, para el gen de la *Hsp70* (**Figura 21**) se observó una mayor expresión en tegumento ($p = 0,000$) y se encontraron diferencias significativas en su expresión entre tratamientos ($p = 0,000$) en cuerpo graso, disminuyendo ligeramente la expresión del gen en condiciones de frío (10,7 C_t vs 9,7 C_t en control). Como vemos, en el caso de las *Hsp* cuantificadas podemos decir que su expresión parece ser mayor en tejidos del tegumento como se ha visto previamente en algunos estudios [32,33] pero que su expresión frente al estrés por frío no

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

aumenta de forma sustancial a diferencia de lo que se esperaba. Si bien es cierto que en la mayoría de datos revisados en la bibliografía su expresión aumenta en respuesta al frío o al calor, también se ha visto en algunos casos que su respuesta es contraria [35].

Respecto a los genes relacionados con las acuaporinas, éstos han sido estudiados únicamente en cuerpo graso, debido a que en coleópteros de la misma familia que el picudo rojo es en este tejido donde se obtuvo la máxima expresión [49]. Considerando los resultados obtenidos para *AQP12L* (**Figura 23**), podemos decir que sí se observan diferencias significativas ($p = 0,000$) entre ambos tratamientos, disminuyendo su expresión en condiciones de frío (media de 13,8 C_t en frío vs media de 9,09 C_t en control). Asimismo, en la acuaporina *DRIP* (**Figura 24**) también parece disminuir la expresión de forma significativa ($p = 0,0004$) cuando los insectos son sometidos a una bajada de temperatura (media de 13,8 C_t en control vs media de 9,1 C_t en frío). Solo en el caso de *EGLPA2* (**Figura 22**) no parecen haber diferencias significativas entre los tratamientos de control y frío ($p = 0,4722$) posiblemente debido a la variación de valores C_t entre las réplicas técnicas de cada tratamiento y a un insuficiente número de individuos por réplica. Las acuaporinas son importantes para mejorar la osmorregulación y alcanzar el equilibrio hídrico a nivel celular. La disminución encontrada en los genes de las acuaporinas *AQP12L* y *DRIP* va en consonancia con resultados previos obtenidos por otros autores. De esta forma, larvas de *Dendroctonus armandi*, coleóptero de la misma familia que el picudo rojo, tras ser sometidas a un estrés por frío disminuyeron también el nivel de expresión de acuaporinas hasta llegar a un umbral crítico [49]. Asimismo, la cucaracha tropical *Gromphadorhina coquereliana* también presentó bajos niveles de acuaporinas, tanto en cuerpo graso como en músculos, tras exposición a frío [50]. La disminución que encontramos de las acuaporinas *AQP12L* y *DRIP* podría relacionarse con una disminución en el tránsito de agua intra/extracelular, probablemente con la finalidad de proteger a las células de la formación de cristales o cualquier otro efecto negativo que pudiera producirse con una disminución drástica en la temperatura ambiental. De igual forma, la disminución de cierto tipo de acuaporinas podría estar relacionada con el aumento de otro tipo de estas proteínas. En este sentido, hubiéramos esperado *a priori* un aumento de la expresión del gen de la acuaporina *EGLPA2*, relacionada con el transporte de glicerol, sustancia que actúa como agente crioprotector en muchos insectos. Sin embargo, este aumento no ha sido observado, pero se debe tener en cuenta que el número de individuos utilizado no ha sido muy elevado ($n=9$) teniendo en consideración la gran variabilidad observada en este grupo en trabajos previos. No obstante, queda por estudiar la isoforma *EGLPA1*, que también parece estar presente en los insectos de esta familia y que también interviene en el transporte de glicerol entre el

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

cuerpo graso y la hemolinfa. Dicho esto, en otras especies de insectos se ha obtenido, no obstante, un aumento en las acuaporinas en respuesta al frío [37,39].

Este estudio deberá completarse con todo lo anteriormente expuesto, así como otros experimentos que se detallarán a continuación, para poder confirmar estos resultados iniciales obtenidos en *Rhynchophorus ferrugineus*.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se extraen del presente trabajo son:

- El procedimiento de extracción de ARN optimizado para *Rhynchophorus ferrugineus* es válido y puede utilizarse en experimentos futuros tanto en tejido cuerpo graso como tegumento.
- Los cebadores diseñados para los genes *Hsp60*, *Hsp70*, *DRIP*, *AQP12L* y *EGLPA2* parecen funcionar adecuadamente a falta de confirmación mediante secuenciación del fragmento amplificado.
- Los genes *Hsp90* y *PRIP* pueden estar codificando diferentes isoformas de la proteína mediante procesamiento alternativo a falta de confirmación mediante secuenciación.
- Según los experimentos de qPCR, los genes que codifican las proteínas de choque térmico *Hsp60* y *Hsp70* parecen expresarse en mayor cantidad en el tejido del tegumento que en cuerpo graso.
- Los genes que codifican la proteína *Hsp70* y las acuaporinas *AQP12L* y *DRIP* disminuyen su expresión tras la exposición a estrés por frío en tejido de cuerpo graso.
- Según los resultados, los genes que codifican la acuaporina *EGLPA2* y la *Hsp60* no parecen variar su expresión tras la exposición a un tratamiento de frío con respecto al control sin tratamiento en *Rhynchophorus ferrugineus*.

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se plantea como experimentos futuros en el laboratorio aquellos que permiten identificar de manera inequívoca las diferencias en los niveles de expresión de los genes estudiados, así como la investigación de un mayor número de acuaporinas y proteínas de choque térmico. Para ello se realizarán experimentos de secuenciación de los fragmentos amplificados obtenidos para los diferentes genes, así como el diseño de nuevos cebadores en más genes de ambas familias de proteínas. Además, en este trabajo se han obtenido resultados de cuantificación que podrían confirmarse con una mayor cohorte de individuos en cada condición experimental. Se optimizarán las condiciones experimentales en el grupo de TA para poder así verificar que las diferencias encontradas entre los grupos de control y frío en algunos casos se deben exclusivamente a la disminución en la temperatura y no al ayuno que experimentan los individuos cuando son sometidos a bajas temperaturas. En este sentido, sería interesante utilizar otros genes normalizadores como los de la tubulina o el factor de elongación 1 (EF-1) para confirmar una expresión constante y ubicua también en el grupo de ayuno a diferencia de lo encontrado en el

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

presente trabajo. Igualmente, se plantea en un futuro observar si las diferencias de expresión de los genes se recuperan tras la reversión de las condiciones de estrés al estado normal de temperatura. También se considera realizar la caracterización completa de las acuaporinas, tanto en cuerpo graso como en pared, así como el estudio de la respuesta génica de las proteínas consideradas en este trabajo frente a una situación de estrés por calor.

Toda esta información se debe comparar con aquella procedente de estudios anteriores en otros insectos y cuyo último fin es entender, a nivel genético, cuáles son los mecanismos de respuesta al estrés térmico en el picudo rojo de las palmeras con el objetivo de tener un conocimiento mayor del comportamiento de esta plaga y, por lo tanto, mejores herramientas para su control.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Conserjería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias (2010). Dossier informativo. El Picudo Rojo, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier. Recuperado de <http://www.picudorojocanarias.es/downloads/dossier/Dossier.pdf>
2. Línea Verde Ceuta. El picudo rojo. Dossier informativo. Recuperado de <http://www.lineaverdeceutatrace.com/lv/consejos-ambientales/picudo-rojo/picudo-rojo-introduccion.asp>
3. Martín, M.M., Cabello, T., 2005. Biología y ecología del curculionido rojo de la palmera, *Rhynchophorus ferrugineus*. Universidad de Almería, Spain, ISBN 84-689-5292-3, pp. 1–202.
4. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de la Junta de Andalucía. (2010). Recomendaciones para combatir el picudo rojo de las palmeras (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier) Recuperado de: https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/agricultura/Recomendacion_picudo_rojo.pdf
5. Lencioni, V., 2004. Survival strategies of freshwater insects in cold environments. *J. Limnol.* 63 (Suppl. 1), 45–55.
6. León-Quinto, T., Fimia, A., Madrigal, R., & Serna, A. (2020). Morphological response of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, to a transient low temperature analyzed by computer tomography and holographic microscopy. *Journal of thermal biology*, 94, 102748. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102748>
7. Johnston, J. A., Ward, C. L., & Kopito, R. R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *The Journal of cell biology*, 143(7), 1883–1898. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.7.1883>
8. Feder, M. E., & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology*, 61, 243–282. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243>
9. Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5561), 1852–1858. <https://doi.org/10.1126/science.1068408>
10. Basha, E., O'Neill, H., & Vierling, E. (2012). Small heat shock proteins and α -crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends in biochemical sciences*, 37(3), 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.005>
11. Clare, D. K., & Saibil, H. R. (2013). ATP-driven molecular chaperone machines. *Biopolymers*, 99(11), 846–859. <https://doi.org/10.1002/bip.22361>
12. Röhl, A., Rohrberg, J., & Buchner, J. (2013). The chaperone Hsp90: changing partners for demanding clients. *Trends in biochemical sciences*, 38(5), 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.02.003>

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

13. Yang, W. J., Xu, K. K., Cao, Y., Meng, Y. L., Liu, Y., & Li, C. (2019). Identification and Expression Analysis of Four Small Heat Shock Protein Genes in Cigarette Beetle, *Lasioderma serricorne* (Fabricius). *Insects*, 10(5), 139. <https://doi.org/10.3390/insects10050139>
14. Xu, Q., Zou, Q., Zheng, H., Zhang, F., Tang, B., & Wang, S. (2011). Three heat shock proteins from *Spodoptera exigua*: Gene cloning, characterization and comparative stress response wqduring heat and cold shocks. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 159(2), 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.02.005>
15. Colinet, H., Lee, S. F., & Hoffmann, A. (2010). Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *The FEBS journal*, 277(1), 174–185. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07470>.
16. Sørensen, J. G., & Loeschcke, V. (2007). Studying stress responses in the post-genomic era: its ecological and evolutionary role. *Journal of biosciences*, 32(3), 447–456. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0044-x>
17. Liu, Q. N., Zhu, B. J., Dai, L. S., Fu, W. W., Lin, K. Z., & Liu, C. L. (2013). Overexpression of small heat shock protein 21 protects the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi* against thermal stress. *Journal of insect physiology*, 59(8), 848–854. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.06.001>
18. Shim J. K., H. B. Bang, and Lee K. Y.. 2012. High temperature interrupts initial egg diapause in *Paratlanticus ussuriensis* and induces expression of a heat shock protein 70 gene. *J. Asia-Pac. Entomol.* 15: 5–11
19. Zhang, Q., & Denlinger, D. L. (2010). Molecular characterization of heat shock protein 90, 70 and 70 cognate cDNAs and their expression patterns during thermal stress and pupal diapause in the corn earworm. *Journal of insect physiology*, 56(2), 138–150. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.09.013>
20. Aruda, A. M., Baumgartner, M. F., Reitzel, A. M., & Tarrant, A. M. (2011). Heat shock protein expression during stress and diapause in the marine copepod *Calanus finmarchicus*. *Journal of insect physiology*, 57(5), 665–675. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.007>
21. Sang, W., Ma, W. H., Qiu, L., Zhu, Z. H., & Lei, C. L. (2012). The involvement of heat shock protein and cytochrome P450 genes in response to UV-A exposure in the beetle *Tribolium castaneum*. *Journal of insect physiology*, 58(6), 830–836. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.03.007>
22. Zhang, Y., Liu, Y., Zhang, J., Guo, Y., & Ma, E. (2015). Molecular Cloning and mRNA Expression of Heat Shock Protein Genes and Their Response to Cadmium Stress in the Grasshopper *Oxya chinensis*. *PLoS one*, 10(7), e0131244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131244>
23. Warchałowska-Sliwa, E., Niklińska, M., Görlich, A., Michailova, P., & Pyza, E. (2005). Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic changes in *Tetrix tenuicornis* (L.) (Tetrigidae, Orthoptera) from polluted areas. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 133(2), 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.05.013>
24. Wang, H., Li, K., Zhu, J. Y., Fang, Q., Ye, G. Y., Wang, H., Li, K., & Zhu, J. Y. (2012). Cloning and expression pattern of heat shock protein genes from the endoparasitoid wasp, *Pteromalus puparum* in

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

- response to environmental stresses. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 79(4-5), 247–263. <https://doi.org/10.1002/arch.21013>
25. Rinehart, J. P., Denlinger, D. L., & Rivers, D. B. (2002). Upregulation of transcripts encoding select heat shock proteins in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis* in response to venom from the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. *Journal of invertebrate pathology*, 79(1), 62–63. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(02\)00002-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(02)00002-2)
26. Planelló, R., Herrero, O., Martínez-Guitarte, J. L., & Morcillo, G. (2011). Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 105(1-2), 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.05.011>
27. Hao, X., Zhang, S., Timakov, B., & Zhang, P. (2007). The Hsp27 gene is not required for *Drosophila* development but its activity is associated with starvation resistance. *Cell stress & chaperones*, 12(4), 364–372. <https://doi.org/10.1379/csc-308.1>
28. Lu, H., Sun, C., Zhou, T., Zhou, B., Guo, E., Shan, W., Xia, M., Li, K., Weng, D., Meng, L., Xu, X., Hu, J., Ma, D., & Chen, G. (2016). HSP27 Knockdown Increases Cytoplasmic p21 and Cisplatin Sensitivity in Ovarian Carcinoma Cells. *Oncology research*, 23(3), 119–128. <https://doi.org/10.3727/096504015X14496932933656>
29. Li, H. B., & Du, Y. Z. (2013). Molecular cloning and characterization of an Hsp90/70 organizing protein gene from *Frankliniella occidentalis* (Insecta: Thysanoptera, Thripidae). *Gene*, 520(2), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.02.026>
30. Hendrick, J. P., & Hartl, F. U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual review of biochemistry*, 62, 349–384. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.62.070193.002025>
31. Yin, A., Pan, L., Zhang, X., Wang, L., Yin, Y., Jia, S., Liu, W., Xin, C., Liu, K., Yu, X., Sun, G., Al-hudaib, K., Hu, S., Al-Mssallem, I. S., & Yu, J. (2015). Transcriptomic study of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* embryogenesis. *Insect science*, 22(1), 65–82. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12092>
32. Cai, Z., Chen, J., Cheng, J., & Lin, T. (2017). Overexpression of Three Heat Shock Proteins Protects *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) From Thermal Stress. *Journal of Insect Science*, 17(6), 113. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iex082>
33. Tungjitwitayakul, J., Tatun, N., Vajarasathira, B., & Sakurai, S. (2015). Expression of Heat Shock Protein Genes in Different Developmental Stages and After Temperature Stress in the Maize Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of economic entomology*, 108(3), 1313–1323. <https://doi.org/10.1093/jee/tov051>
34. Xin Yuan, Wen-Wu Zhou, Ying Zhou, Su Liu, Fang Lu, Mao-Fa Yang, Jiaan Cheng, Geoff M Gurr, Zeng-Rong Zhu(2014).Composition and Expression of Heat Shock Proteins in an Invasive Pest, The Rice Water Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist*, 97(2), 611-619.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

35. Dumas, P., Morin, M. D., Boquel, S., Moffat, C. E., & Morin, P. J. (2019). Expression status of heat shock proteins in response to cold, heat, or insecticide exposure in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Cell stress & chaperones*, 24(3), 539–547. <https://doi.org/10.1007/s12192-019-00983-3>
36. Robert, J. A., Bonnett, T., Pitt, C., Spooner, L. J., Fraser, J., Yuen, M. M., Keeling, C. I., Bohlmann, J., & Huber, D. P. (2016). Gene expression analysis of overwintering mountain pine beetle larvae suggests multiple systems involved in overwintering stress, cold hardiness, and preparation for spring development. *PeerJ*, 4, e2109. <https://doi.org/10.7717/peerj.2109>
37. Xu, Y., Li, Y., Wang, Q., Zheng, C., Zhao, D., Shi, F., Liu, X., Tao, J., & Zong, S. (2021). Identification of key genes associated with overwintering in *Anoplophora glabripennis* larva using gene co-expression network analysis. *Pest management science*, 77(2), 805–816. <https://doi.org/10.1002/ps.6082>
38. Tsujimoto, H., Sakamoto, J. M., & Rasgon, J. L. (2017). Functional characterization of Aquaporin-like genes in the human bed bug *Cimex lectularius*. *Scientific reports*, 7(1), 3214. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03157-2>
39. Philip, B. N., Yi, S. X., Elnitsky, M. A., & Lee, R. E., Jr (2008). Aquaporins play a role in desiccation and freeze tolerance in larvae of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*. *The Journal of experimental biology*, 211(Pt 7), 1114–1119. <https://doi.org/10.1242/jeb.016758>
40. Xia, W., Zhao, P., Yi, Z., & Cui, Y. (2017). Phylogenetic and specific sequence analysis of four paralogs in insect Aquaporins. *Molecular medicine reports*, 16(4), 4903–4908. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7148>
41. Kambara, K., et al. (2009). cDNA cloning of aquaporin gene expressed in the digestive tract of the formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus shiraki* (Isoptera; Rhinotermitidae). *Appl. Entomol. Zool.* 44, 315–321. doi: 10.1303/aez.2009.315
42. Goto, S. G., Philip, B. N., Teets, N. M., Kawarasaki, Y., Lee Jr., R. E., and Denlinger, D. L. (2011). Functional characterization of an aquaporin in the antarctic midge *Belgica antarctica*. *J. Insect Physiol.* 57, 1106–1114. doi: 10.1016/j.jinsphys.2011.03.023
43. Stavang, A. J., et al. (2015). Phylogenomic and functional analyses of salmonlice aquaporins uncover the molecular diversity of the superfamily in Arthropoda. *BMC Genomics* 16:618. doi: 10.1186/s12864-015-1814-8
44. Ekert, V. E., et al. (2016). Molecular and functional characterization of *Bemisia tabaci* aquaporins reveals the water channel diversity of hemipteran insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 77, 39–51. doi: 10.1016/j.ibmb.2016.07.010
45. Finn, R. N., Chauvigné, F., Stavang, J. A., Belles, X., & Cerdà, J. (2015). Insect glycerol transporters evolved by functional co-option and gene replacement. *Nature communications*, 6, 7814. <https://doi.org/10.1038/ncomms8814>
46. Drake, L. L., Boudko, D. Y., Marinotti, O., Carpenter, V. K., Dawe, A. L., & Hansen, I. A. (2010). The Aquaporin gene family of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PloS one*, 5(12), e15578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015578>

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

47. Benoit, J. B., et al. (2014). Emerging roles of aquaporins in relation to the physiology of blood-feeding arthropods. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 184(7), 811–825. <https://doi.org/10.1007/s00360-014-0836-x>
48. Abascal, F., Irisarri, I., & Zardoya, R. (2014). Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(5), 1468–1481. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.12.001>
49. Fu, D., Dai, L., Gao, H., Sun, Y., Liu, B., & Chen, H. (2019). Identification, Expression Patterns and RNA Interference of Aquaporins in *Dendroctonus armandi* (Coleoptera: Scolytinae) Larvae During Overwintering. *Frontiers in physiology*, 10, 967. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00967>
50. Chowański, S., Lubawy, J., Paluch-Lubawa, E., Spochacz, M., Rosiński, G., & Słocińska, M. (2017). The physiological role of fat body and muscle tissues in response to cold stress in the tropical cockroach *Gromphadorhina coquereliana*. *PloS one*, 12(3), e0173100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173100>
51. Chowanski, S., Lubawy, J., Spochacz, M., Ewelina, P., Grzegorz, S., Rosinski, G., & Slocinska, M. (2015). Cold induced changes in lipid, protein and carbohydrate levels in the tropical insect *Gromphadorhina coquereliana*. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 183, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.01.007>
52. Yao, X. X., Meng, Q. W., & Li, G. Q. (2018). RNA interference-mediated functional characterization of aquaporin genes in *Tribolium castaneum*. *Insect molecular biology*, 27(2), 234–246. <https://doi.org/10.1111/imb.12367>
53. R.J. Stouffer, R.T. Wetherald Changes of variability in response to increasing greenhouse gases. Part I: Temperature *J. Clim.*, 20 (2007), pp. 5455-5467
54. Hansen, J., Sato, M., & Ruedy, R. (2012). Perception of climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(37), E2415–E2423. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205276109>
55. Bathiany, S., Dakos, V., Scheffer, M., & Lenton, T. M. (2018). Climate models predict increasing temperature variability in poor countries. *Science advances*, 4(5), eaar5809. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar5809>
56. Dembilio, Ó, & Jacas, J. (2011). Basic bio-ecological parameters of the invasive Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), in *Phoenix canariensis* under Mediterranean climate. *Bulletin of Entomological Research*, 101(2), 153-163. doi:10.1017/S0007485310000283
57. Danielle M DeLeo, Jorge L Pérez-Moreno, Hernán Vázquez-Miranda, Heather D Bracken-Grissom, RNA profile diversity across arthropoda: guidelines, methodological artifacts, and expected outcomes, *Biology Methods and Protocols*, Volume 3, Issue 1, 2018, bpy012, <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpy012>
58. Antony, B., et al. (2017). Identification and expression profiling of novel plant cell wall degrading enzymes from a destructive pest of palm trees, *Rhynchophorus ferrugineus*. *Insect molecular biology*, 26(4), 469–484. <https://doi.org/10.1111/imb.12314>

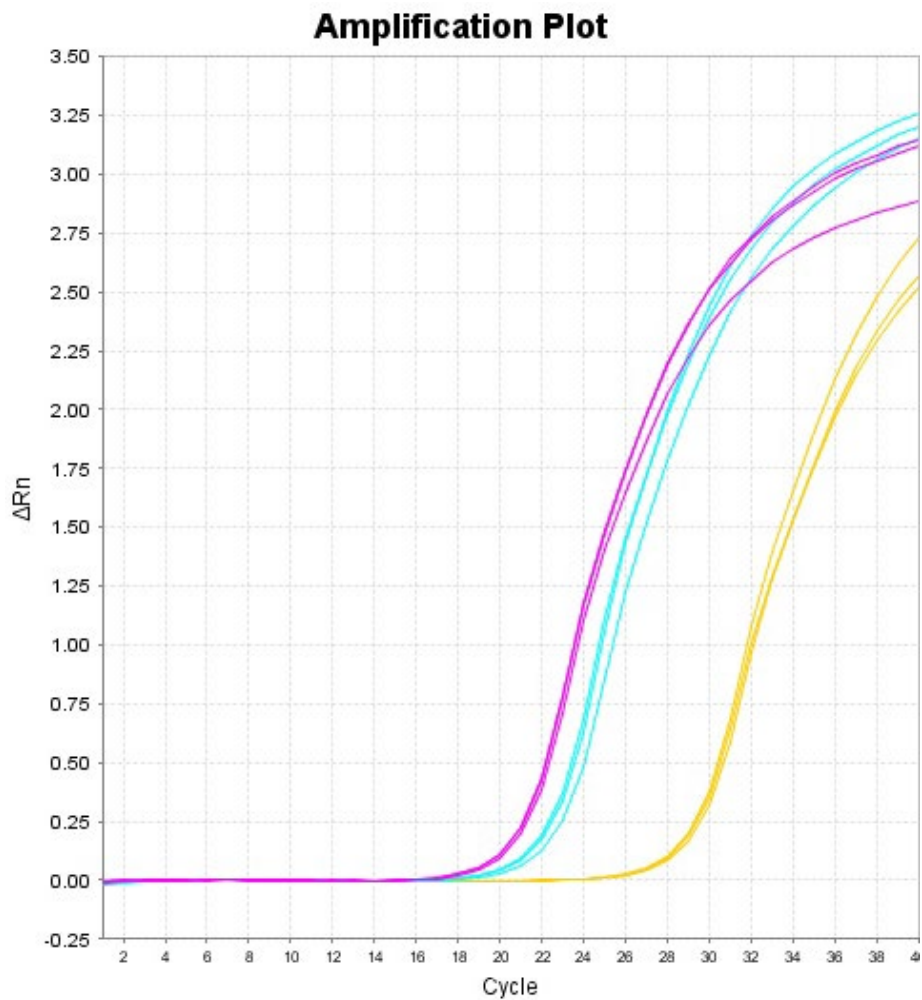
Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

59. Tsujimoto, H., Liu, K., Linser, P. J., Agre, P., & Rasgon, J. L. (2013). Organ-specific splice variants of aquaporin water channel AgAQP1 in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *PloS one*, 8(9), e75888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075888>
60. Aamodt R. M. (2008). The caste- and age-specific expression signature of honeybee heat shock genes shows an alternative procesamiento-dependent regulation of Hsp90. *Mechanisms of ageing and development*, 129(11), 632–637. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.07.002>
61. Xu, P. J., et al. (2010). *Apis mellifera* has two isoforms of cytoplasmic HSP90. *Insect molecular biology*, 19(4), 593–597. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01015.x>
62. Fujikake, N., Nagai, Y., Popiel, H. A., Kano, H., Yamaguchi, M., & Toda, T. (2005). Alternative procesamiento regulates the transcriptional activity of *Drosophila* heat shock transcription factor in response to heat/cold stress. *FEBS letters*, 579(17), 3842–3848. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.05.074>

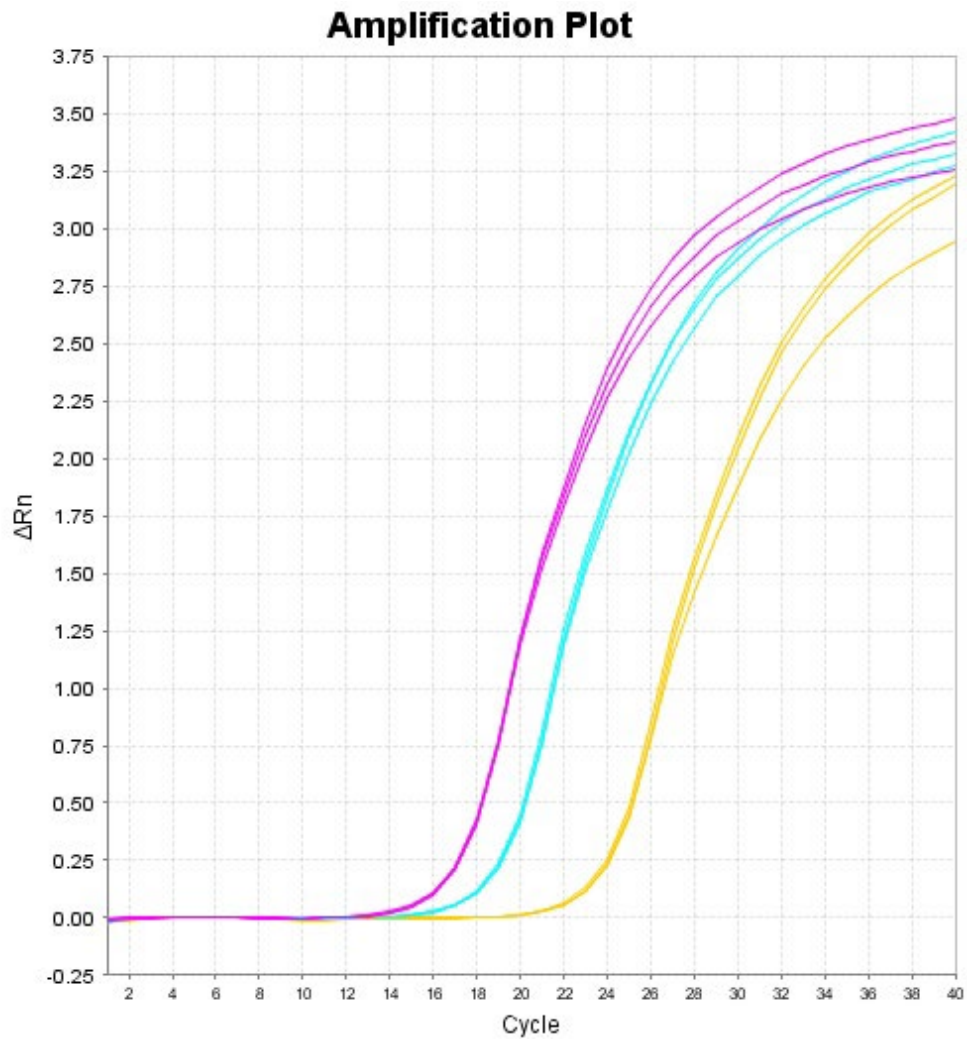
Antón Ruiz, Noelia
RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

8. ANEXOS



Anexo A. Curvas de fluorescencia en la amplificación por qPCR para el gen de la β -actina en tejido cuerpo graso. Representado en el eje de ordenadas el incremento de la intensidad de fluorescencia y en el eje de abscisas el número de ciclos de amplificación. Se puede observar un desplazamiento significativo de las 3 réplicas del grupo TA (amarillo) hacia mayores valores de Ct frente a las réplicas del grupo control (morado) y las réplicas del grupo frío (azul) indicando una baja expresión de la β -actina en el grupo TA y por lo tanto la imposibilidad de utilizarlo como gen normalizador.

Antón Ruiz, Noelia
RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

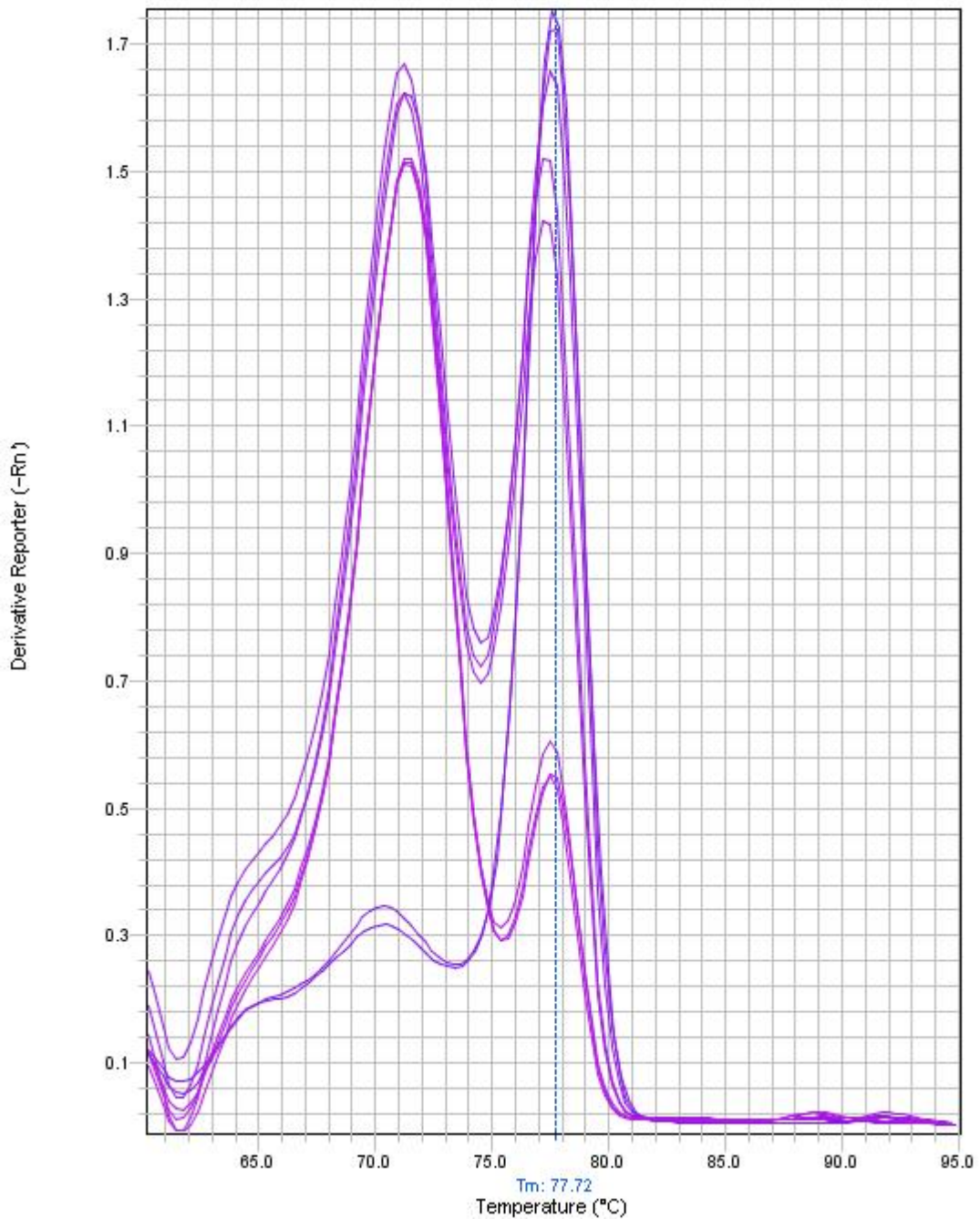


Anexo B. Curvas de fluorescencia en la amplificación por qPCR para el gen de la β -actina en tejido del tegumento. Representado en el eje de ordenadas el incremento de la intensidad de fluorescencia y en el eje de abscisas el número de ciclos de amplificación. Se puede observar un desplazamiento significativo de las 3 réplicas del grupo TA (amarillo) hacia mayores valores de Ct frente a las réplicas del grupo control (morado) y las réplicas del grupo frío (azul) indicando una baja expresión de la β -actina en el grupo TA y por lo tanto la imposibilidad de utilizarlo como gen normalizador.

Antón Ruiz, Noelia

RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

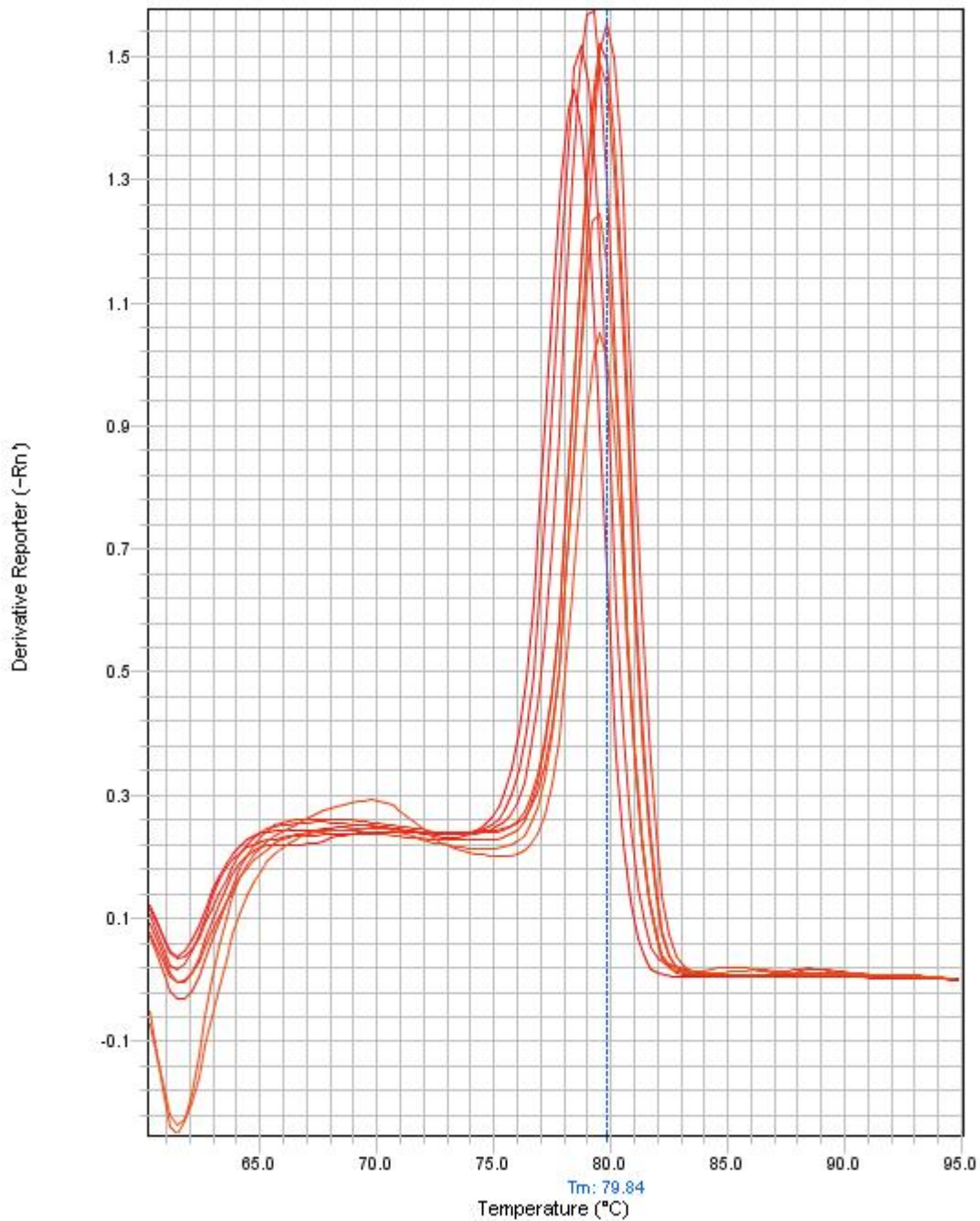
Melt Curve



Anexo C. Curva de fusión obtenida por qPCR para el gen de Hsp90 en tejido de la tegumento. Representado en el eje de ordenadas la derivada de la intensidad de fluorescencia y en el eje de abscisas la temperatura. Marcado con rayas discontinuas en azul la temperatura de fusión que el equipo detecta en uno de los picos. Como vemos, se observan claramente dos picos distintos de fluorescencia, a mayor temperatura de fusión (77,72°C) y otro a menor temperatura (72°C) indicando la posible presencia de dos productos de amplificación distintos y por lo tanto una cuantificación no válida.

Antón Ruiz, Noelia
RESPUESTA GÉNICA INDUCIDA POR FRÍO EN EL PICUDO ROJO DE LAS PALMERAS (*Rhynchophorus ferrugineus*)

Melt Curve



Anexo D. Curva de fusión obtenida por qPCR para el gen de PRIP en tejido del cuerpo graso. Representado en el eje de ordenadas la derivada de la intensidad de fluorescencia y en el eje de abscisas la temperatura. Marcado con rayas discontinuas en azul la temperatura de fusión que el equipo detecta en uno de los picos (79,84°C). En esta ocasión aparecen muchos picos distintos aunque con temperaturas de fusión cercanas. Esto también puede indicar la posible presencia de varios productos de amplificación diferentes y por lo tanto una cuantificación no válida.