

## **NUEVA METODOLOGÍA PARA EL MONITOREO DE VIP3A EN PLANTAS DE MAÍZ RESISTENTES A *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

**ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL:** Centro de Ingeniería Genética de Biotecnología. BioCubaFarma

**AUTORES PRINCIPALES:** Daily Hernández Hernández, Rodolfo Valdés Véliz, Camilo Ayra Pardo, Lianet Rodríguez Cabrera

**OTROS AUTORES:** Ivis Morán Bertot, Pilar Téllez Rodríguez, Milagro Ponce Castillo, Claudia Rodríguez de la Noval

**COLABORADORES:** Hasel Aragón Núñez, Marcos González Rodríguez, Miguel Castillo Ferrer, Eduardo Sánchez Zayas, Andrés Tamayo, Victoria María Lugo Hernández, Leonardo Gómez Bayolo, Yassel Ramos Gómez

**OTRA ENTIDAD PARTICIPANTE:** Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

### **AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:**

Daily Hernández Hernández

Lab. Biotecnología Ambiental

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 entre 158 y 190 Cubanacán, Playa

Apartado Postal 6162 C. Habana 10600 Cuba

Fax: 273 1779

Teléfono: 271 6022 Ext. 3156

E. mail: daily.hernandez@cigb.edu.cu

### **RESUMEN:**

Las plantas transgénicas resistentes a insectos plagas, que producen las toxinas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), ocupan una superficie acumulada a nivel mundial de 600 millones de hectáreas. El principal riesgo del uso de plantas-Bt radica en la aparición de insectos resistentes. Para ello, se recomienda utilizar plantas transgénicas que expresen "alta dosis" de la toxina, que equivale a una concentración 25 veces (25x) superior al valor de concentración que causa la muerte en el 99,99% de la población de insectos expuestos (LC99). Actualmente, este requisito se evalúa de manera indirecta mediante bioensayos, con la desventaja que el resultado obtenido pudiera ser el efecto conjunto de la toxina con otros metabolitos secundarios de las plantas. Además, los

bioensayos se incuban por un período entre 7- 10 días. Con el propósito de demostrar si los nuevos híbridos de maíz Bt-Vip3A producen la toxina insecticida Vip3A contra *Spodoptera frugiperda* en "alta dosis", se desarrolló un sistema inmuno-enzimático cuantitativo específico para la proteína Vip3A. Para ello, se expresó, purificó y caracterizó bioquímica y funcionalmente la toxina Vip3A. El producto obtenido se utilizó como antígeno para la generación de anticuerpos monoclonales anti-Vip3A que se utilizaron en el desarrollo del sistema inmuno-cuantitativo. El sistema inmuno-enzimático obtenido permitió cuantificar la expresión en los híbridos de maíz Bt-Vip3A y compararlos con el valor de 25xLC<sub>99</sub>.

La **novedad de este trabajo** es que: 1) se obtuvo el **primer sistema inmuno-enzimático cuantitativo para Vip3A** que permitió la selección de los mejores híbridos de maíz Bt-Vip3A evaluando los niveles de expresión de la toxina insecticida, 2) se **demostró por vez primera** con el uso del sistema inmuno-enzimático el cumplimiento del criterio "alta dosis" en los nuevos híbridos de maíz Bt-Vip3A, y además, permite cuantificar de manera específica y a corto plazo la concentración de toxina en las plantas-Bt. Estos resultados tienen como **importancia práctica**: 1) evaluar el cumplimiento del criterio de "alta dosis" en el proceso de introducción de nuevas líneas e híbridos de maíz Bt- Vip3A, 2) asistir a los mejoradores en los trabajos de introgresión genética del maíz Bt-Vip3A en el desarrollo de nuevos genotipos de maíz, y 3) asistir a los reguladores en la detección y cuantificación de la proteína Vip3A en el ambiente, las importaciones de cereales y en la cadena alimentaria. El trabajo cuenta con dos publicaciones **Journal of Agronomy** y en **Journal of BioProcessing (ambas en SCOPUS)**, ha sido presentado en congresos nacionales e internacionales, fue logro científico-técnico del CIGB en 2013, y Destacado en el FORUM de base de Ciencia y Técnica 2016,. Cuenta además con avales de personalidades reconocidas en la temática.

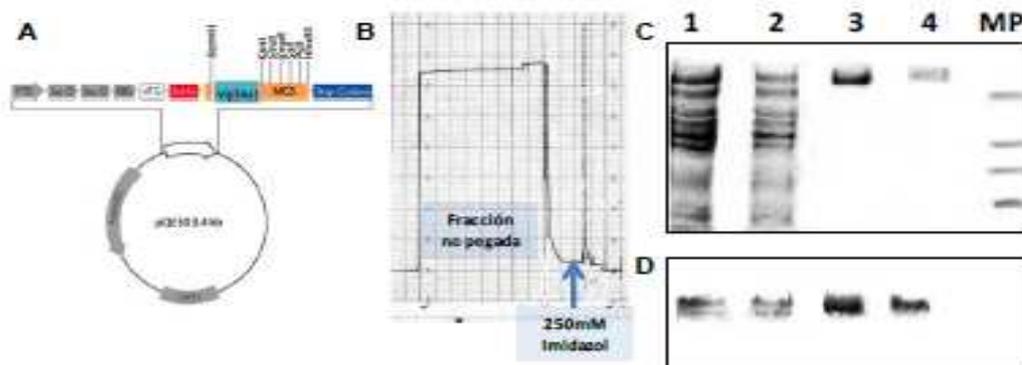
## COMUNICACIÓN CORTA DEL RESULTADO

### Introducción

El uso de plantas transgénicas autoplaguicidas que cumplan con el criterio de "alta dosis", constituyen en la actualidad un requisito indispensable para el manejo de la insecto-resistencia. La estrategia propuesta por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de EE.UU. (en inglés, USEPA), para la selección de plantas "alta dosis" consiste en el uso de un método indirecto mediante bioensayo con hojas de plantas de maíz-Bt liofilizadas y diluida 25 veces en la dieta artificial de los insectos susceptibles. Sin embargo, tiene como principal desventaja que el resultado obtenido pudiera ser el efecto conjunto de la toxina con otros metabolitos secundarios de las plantas, además posee un período de tiempo que comprende entre 7-10 días. Por tal motivo con el objetivo de estudiar la expresión de la proteína Vip3A en los híbridos cubanos, el presente trabajo estuvo dirigido a la obtención de una nueva metodología

que permita la detección, cuantificación y selección inmuno-enzimática de plantas de maíz Bt- Vip3A de "alta dosis", resistente a la palomilla del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Para ello, fue necesaria la producción recombinante y purificación de Vip3A, para su posterior utilización en la obtención de anticuerpos monoclonales anti-Vip3A. Con los anticuerpos obtenidos se desarrolló un ELISA que permitió la cuantificación de la proteína y su empleo en la evaluación directa del cumplimiento del criterio de alta dosis.

## Desarrollo

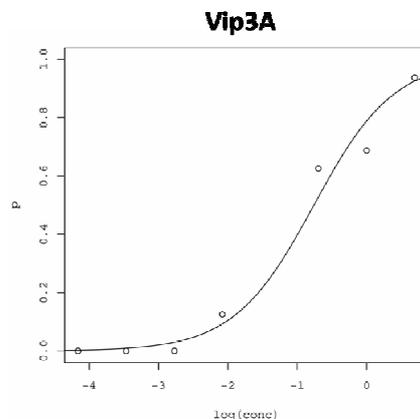


**Figura 1.** Obtención y purificación de Vip3A recombinante. (A) Construcción final pQE-Vip, (B) Cromatograma de la purificación por IMAC de Vip3Aa1 recombinante con alto grado de pureza (>95%), (C) electrophoresis SDS-PAGE 10% y (D) Western-blot, Carril 1: Sobrenadante de ruptura; Carril 2: Fracción no pegada a la matriz; Carril 3: Fracción eluida con 250 mM de imidazol; Carril 4: proteína Vip3A usada como control positivo; Carril MP: Marcador de peso molecular

La figura 1 muestra los principales resultados en el proceso de obtención y purificación de la proteína recombinante Vip3A producida en la cepa JM109 de *E. coli*. El gen correspondiente se clonó en el vector de expresión pQE-30 bajo la regulación del promotor fuerte pTaq, inducible por IPTG, en una fusión traduccional a una secuencia líder de histidina. La producción de la proteína Vip3A en la forma quimérica de Vip3A-6xHis permitió su posterior purificación por cromatografía de quelatos metálicos. El procedimiento de purificación establecido consistió en un paso de ruptura y centrifugación y dos cromatografías (afinidad y exclusión molecular) para lograr una pureza de  $97.2 \pm 2.8\%$  y un recobrado final de  $50.4 \pm 4.0\%$ . Estos valores son aceptables para la generación de anticuerpos monoclonales con fines inmunoquímicos de detección y cuantificación.

La identidad de la protoxina Vip3A-6xHis recombinante se confirmó por espectrometría de masas y Western blot. La secuencia obtenida se comparó con las reportadas en las bases de datos mostrando un 99.9% de identidad con un total de 789 aminoácidos de la protoxina Vip3A (Hernández y col., 2013). Por otro lado, se realizó la caracterización funcional de la protoxina recombinante Vip3A-6xHis mediante bioensayos con larvas neonatas de *S. frugiperda*. La toxicidad, expresada en términos de concentración letal que causa muerte en el 50% (LC50) y en el 99% (LC99) de la población, fue determinada por el método estadístico *probit*. Como se muestra en la figura 2, la protoxina Vip3A-6xHis

mostró alta toxicidad, con un valor de LC<sub>50</sub> de 0.468ppm mientras que el valor de LC<sub>99</sub> obtenido fue de 6.680 ppm.



Toxina	LC <sub>50</sub> (FL95%)	LC <sub>99</sub> (FL95%)	Ecuación	Pendiente	N
Vip3A	0.468 (0.325 – 0.673)	6.680 (2.427 – 18.383)	y=1.729x+1.311	5.635 ± 0.321	128

**Figura 2.** Toxicidad de la proteína recombinante Vip3A contra larvas neonatas de *S. frugiperda*. LC<sub>50</sub>: valor que corresponde con la concentración de la toxina Vip3A que elimina el 50% de las larvas; LC<sub>99</sub>: valor de concentración de Vip3A que causa muerte en el 99,99% de la población de larvas expuestas; FL nivel de confianza; N: número de larvas.

Este resultado está en concordancia con lo esperado y muestra que **la proteína recombinante Vip3A-6xHis purificada mantiene una alta actividad insecticida y especificidad por el hospedero**. Además, con los valores de LC<sub>99</sub> obtenidos, permitirán la selección posterior de híbridos de maíz que cumplan con el criterio de “alta dosis”.

La protoxina recombinante Vip3A-6xHis se utilizó como inmunógeno para generar anticuerpos monoclonales específicos en ratones Balb/c. El esquema seguido consistió en 4 inmunizaciones y un “booster” vía intraperitoneal 72 horas antes de la fusión con las células del mieloma (1:1 v/v) con 50 µg de Vip3A-6xHis y 100 µL de adyuvante de Freund’s completo (la primera inmunización) e incompleto (las restantes). Las células productoras de los anticuerpos anti-Vip3A fueron sometidas a sucesivos clonajes por dilución limitante y selección por un ELISA cualitativo. Luego se inocularon las células vía intraperitoneal en ratones Balb/c y se cosechó la ascitis diez días post-inoculación. Los anticuerpos anti-Vip3A se purificaron por cromatografía de afinidad empleando una matriz Sepharose Fast-Flow proteína A. Los anticuerpos monoclonales específicos a Vip3A, mostraron selectividad y especificidad por la toxina Vip3A, características requeridas para establecer un ELISA cuantitativo tipo sándwich (Hernández y col., 2016).

El monitoreo de las variaciones del proteoma de las plantas, forma parte esencial del seguimiento del proceso de introgresión de cultivos transgénicos,

así como, para evaluar la consistencia de la expresión recombinante de las toxinas insecticidas en las plantas modificadas. Los ensayos basados en el uso de anticuerpos son los más usados para la detección de proteínas en plantas de maíz-Bt, aunque no se comercializan sistemas cuantitativos. Estos constituyen métodos rápidos y efectivos. Permiten procesar un amplio número de muestras, con precisión y selectividad, para discriminar fácilmente entre las plantas-Bt que expresan la toxina específica a evaluar y las plantas no Bt. Además, es importante en el control de la calidad de las semillas y de las plantas, así como la valoración del riesgo ambiental y otros estudios relacionados.

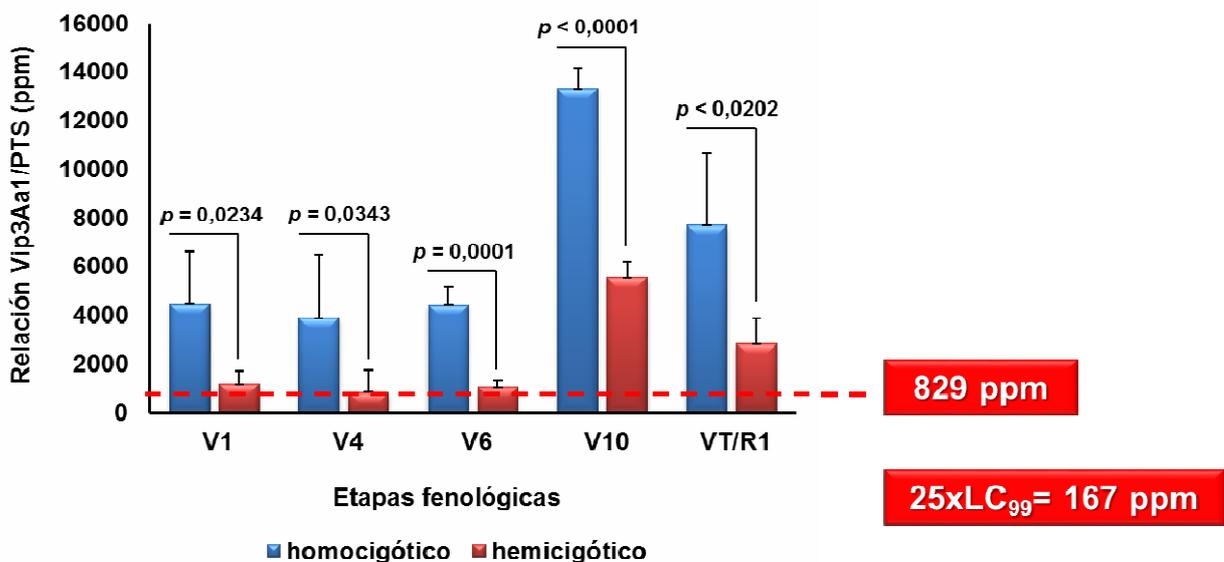
El criterio de "alta dosis" se refiere a la concentración de la proteína insecticida (Vip3A) expresada en las plantas de maíz lo cual debe ser igual o mayor que 25 veces la concentración requerida para eliminar el 99.99% de la población de los insectos susceptibles presentes en el campo (Bernardi y col., 2015). En la actualidad, constituye un requisito indispensable en el manejo del fenómeno de la aparición de insectos resistentes a las toxinas de *B. turingiensis* (Campagne y col., 2015). La estrategia descrita por la USEPA, para la selección de plantas "alta dosis" consiste en el uso de un método indirecto mediante bioensayo con hojas de plantas de maíz-Bt liofilizadas y diluida 25 veces en la dieta artificial de los insectos susceptibles. Después de 7-10 días de incubación bajo condiciones controladas se evalúa la mortalidad en la población de larvas neonatas expuestas, la cual debe superar o igualar al 99,99% de insectos eliminados por la toxina (Tabashnik y col., 2009). Esta metodología tiene como principal desventaja que el resultado obtenido pudiera ser el efecto conjunto de la toxina con otros metabolitos secundarios de las plantas y un período de tiempo largo. Además, requiere la obtención de una cría artificial del insecto de interés. (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de las metodologías propuestas para la selección del criterio "alta dosis" en plantas de maíz Bt-Vip3A

	Parámetros					
	Matriz biológica	Procesamiento de las muestras	Número de muestras	Tipo de ensayo	Preparación del ensayo	Tiempo de duración del experimento (h)
Metodología establecida por la USEPA	Hojas de maíz Bt-Vip3A	Liofilización de las hojas	Indefinidas	Bioensayo con larvas susceptibles	Dilución 25 veces del polvo de hojas	168-240
Metodología propuesta usando el sistema ELISA cuantitativo anti-Vip3A	Hojas de maíz Bt-Vip3A	Maceración de las hojas y extracción líquida de la toxina Vip3A	Indefinidas	ELISA cuantitativo	Adición de las muestras en la placa de ELISA recubierta y bloqueada	4

Las larvas de *S. frugiperda* se caracterizan por consumir tejido foliar. Sin embargo, las larvas recién eclosionadas se alimentan de la misma masa de huevos a la que pertenecieron, y luego consumen el tejido foliar por un lado, sin llegar a perforarlo, dejando intacta la capa epidérmica del haz de la hoja. A partir del segundo o tercer estadio, la alimentación se manifiesta más voraz, dejando una hilera de perforaciones en las hojas. Los últimos estadios pueden ocasionar una defoliación completa, dejando las nervaduras o tallo de la planta.

Con el uso de los anticuerpos monoclonales específicos y el ELISA cuantitativo tipo sándwich desarrollado y los resultados obtenidos del bioensayo, se realizó el monitoreo de la expresión de la toxina Vip3A en plantas de maíz Bt-Vip3A, y posterior selección de los híbridos "alta dosis". En la figura 3 se muestran los resultados del ELISA cuantitativo específico para Vip3A y se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la expresión de Vip3A en el tejido foliar entre la línea y el híbrido de maíz Bt-Vip3A, en las etapas fenológicas comprendidas desde V1 hasta VT/R1. Estas diferencias pueden deberse al número de copias del transgen entre ambos cultivares (2 en la línea y 1 en el híbrido) o a diferencias propias del genofondo que tengan influencias en el proteoma.



**Figura 3.** Análisis estadístico de la comparación entre las medias de los valores de concentración de proteína Vip3A en hojas entre plantas homocigóticas y hemicigóticas de maíz Bt-Vip3A. En el eje (y) relación entre la concentración de Vip3A con las proteínas totales solubles (PTS) del tejido foliar; eje (x) etapas fenológicas del cultivo de maíz Bt-Vip3A mostradas como (V y VT/R1).

Según lo establecido por la USEPA para el manejo de la insecto-resistencia en cultivos autoplaguicidas, la expresión de la toxina en la planta debe ser 25x veces superior o igual al valor de concentración que elimina al 99% de la población de insectos expuestos conocido como LC<sub>99</sub>. El valor 25xLC<sub>99</sub> obtenido según los resultados del bioensayo fue de 167 ppm. El menor valor de la expresión de Vip3A en los híbridos evaluados fue de 829 ppm y se

observó en la etapa V4 del cultivo (Figura 3). Mediante este resultado se demostró que en los híbridos de maíz expresan la toxina Vip3A cumpliendo el criterio de "alta dosis".

Con los resultados obtenidos **se demostró por vez primera** la utilidad de un sistema inmuno-enzimático, que permite cuantificar de manera específica y en corto plazo la concentración de toxina, en la evaluación directa del cumplimiento del criterio "alta dosis" en los nuevos híbridos de maíz Bt-Vip3A. Además, el sistema permitió la **selección** de los mejores híbridos de maíz Bt-Vip3A en cuanto a los niveles de expresión de la toxina insecticida. Por lo tanto, es recomendable su inclusión como parte de la evaluación directa y a corto plazo del criterio "alta dosis" para los nuevos híbridos de maíz Bt-Vip3A.