

Detección de Gen CYP4 en el Genoma de *Cryptolaemus montrouzieri* en Base a Secuencias Ortólogas y Uso de Codones

Author(s): Merced José Eduardo Jiménez-Diosdado, Maribel Mireles-Martínez, Jesús M. Villegas-Mendoza, Raymundo Rosas-Quijano, y Ninfa M. Rosas-García

Source: Southwestern Entomologist, 41(3):771-782.

Published By: Society of Southwestern Entomologists

<https://doi.org/10.3958/059.041.0319>

URL: <http://www.bioone.org/doi/full/10.3958/059.041.0319>

BioOne (www.bioone.org) is a nonprofit, online aggregation of core research in the biological, ecological, and environmental sciences. BioOne provides a sustainable online platform for over 170 journals and books published by nonprofit societies, associations, museums, institutions, and presses.

Your use of this PDF, the BioOne Web site, and all posted and associated content indicates your acceptance of BioOne's Terms of Use, available at www.bioone.org/page/terms_of_use.

Usage of BioOne content is strictly limited to personal, educational, and non-commercial use. Commercial inquiries or rights and permissions requests should be directed to the individual publisher as copyright holder.

Detección de Gen CYP4 en el Genoma de *Cryptolaemus montrouzieri*¹ en Base a Secuencias Ortólogas y Uso de Codones**CYP4 Gene Detection in *Cryptolaemus mountrouzieri*¹ Genome Based on Ortholog Sequences and Codon Usage**

Merced José Eduardo Jiménez-Diosdado, Maribel Mireles-Martínez, Jesús M. Villegas-Mendoza, Raymundo Rosas-Quijano, y Ninfa M. Rosas-García*

Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. Reynosa, Tam., CP. 88710, Mexico

Resumen. En este estudio se detectó el gen CYP4 de *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) mediante el diseño de oligonucleótidos obtenidos a partir de la selección de siete secuencias proteicas parciales de *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae) asociadas al gen CYP4 y analizados mediante una tabla de uso de codones elaborada en función de ocho genes de *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) que es un insecto emparentado a *C. montrouzieri*. Las secuencias aminoacídicas ortólogas fueron alineadas para determinar las zonas de homología y se elaboró una tabla de uso de codones para *H. axyridis*. Las secuencias nucleotídicas obtenidas se analizaron con el programa GCUA para determinar los codones más utilizados, reducir la degeneración y tener mejor amplificación. Los productos amplificados se clonaron y se secuenciaron. El número efectivo de codones para *H. axyridis* fue de 2996. Se observa un mayor uso relativo de codones predominantes con AT. Los oligonucleótidos diseñados 5'GAAGUUGAUACHUUUAUGUUUG3' y 3'AAARTTTTCWGGRTTTGGAWA 5', amplificaron un fragmento de 569 pb con alineamiento significativo a una secuencia parcial del citocromo P450 en *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae) y *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). El uso de secuencias ortólogas y su análisis mediante el uso de codones es útil para la identificación molecular de genes de interés.

Abstract. In this study we detected the CYP4 gene from *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) by designing oligonucleotides through the selection of seven partial protein sequences of *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae) associated with the CYP4 gene, and analyzed by codon usage according to eight genes from *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) which is closely related to *C. montrouzieri*. Orthologous amino acid sequences were aligned to identify areas of homology and a table of codon usage for *H. axyridis* was developed. The nucleotide sequences obtained were analyzed using the program GCUA to determine the most commonly used codons, reduce

¹(Coleoptera: Coccinellidae)

*Corresponding author: nrosas@ipn.mx

degeneracy and have better amplification. Amplified products were cloned and sequenced. The effective number of codons for *H. axyridis* was 2996 and a predominant use of codons with AT is observed. Oligonucleotides designed 5'GAAGUUGAUACHUUUAUGUUUG3' and 3'AAARTTTTCWGGRTTTGGAWA5' amplified a 569 bp fragment with significant alignment to a partial sequence of cytochrome P450 in *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae) and *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). Using orthologous sequences and their analysis with codon usage is useful for the molecular identification of genes of interest.

Introducción

Cryptolaemus montrouzieri Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) es uno de los insectos depredadores más importantes para combatir a las poblaciones de la cochinilla rosada del hibisco, *Maconellicoccus hirsutus* Green (Hemiptera: Pseudococcidae) (Clausen 1978). No obstante a su alta efectividad, se ha reportado que este insecto depredador tiene una alta sensibilidad a los insecticidas químicos (Cloyd y Dickinson 2006), lo que representa un serio problema cuando este insecto es liberado en campos que conservan residuos de sustancias químicas tóxicas.

La resistencia a insecticidas es una característica heredable que involucra cambios en uno o más genes en los insectos (Hemingway et al. 2004), existen varios mecanismos moleculares que permiten a un organismo sobrevivir a dosis letales de insecticidas. En la mayoría de los casos de resistencia a insecticidas, los mecanismos se relacionan directamente con tres superfamilias de genes detoxificantes tales como: glutatión S-transferasas, carboxilcolinesterasas, y el citocromo P450 monooxigenasas. Estas últimas constituyen la superfamilia más grande de genes que se encuentra en la naturaleza y posee una gran variedad de funciones. En insectos se han identificado más de 300 citocromos P450 distribuidos a través de 27 familias denominadas CYP. Los P450 constituyen los sistemas enzimáticos esenciales para la detoxificación o activación de resistencia a insecticidas (Gong et al. 2005). Además la familia del gen CYP4 está involucrada en la resistencia hacia insecticidas químicos como el carbaryl (Scharf et al. 2001).

El estudio de los genes de resistencia en *C. montrouzieri* a insecticidas químicos es escaso, por lo que es importante empezar a relacionar la sensibilidad que tiene a insecticidas químicos con los genes asociados a resistencia. Algunos experimentos de laboratorio con exposición a insecticidas químicos han demostrado que los adultos de *C. montrouzieri* son altamente sensibles a algunos de ellos como el carbaryl (Morse y Bellows 1986), dinotefurán, acetamiprid, y clotianidín (Cloyd y Dickinson 2006) ocasionando que su actividad depredadora disminuya.

El estudio de un gen del cual no existe información previa, puede iniciarse tomando información de otros genes con actividades similares y de organismos emparentados. El análisis de uso de codones es utilizado como una guía para dirigir la traducción inversa de secuencias de proteínas a sus probables secuencias de DNA (Fickett 1982). Los veinte aminoácidos, a excepción de la metionina y el triptófano, están codificados por dos y hasta por seis codones llamados codones sinónimos. Los codones sinónimos no son usados con la misma frecuencia en las secuencias que codifican proteínas y se usan de manera diferente de acuerdo a cada organismo (Nakamura y Sugiura 2007). En este estudio se utilizaron

secuencias proteicas parciales de *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae) asociadas al gen CYP4 para ser analizadas mediante una tabla de uso de codones elaborada en función de algunos genes de *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) que es un insecto emparentado a *C. montrouzieri*, con el objetivo de diseñar oligonucleótidos efectivos para amplificar parcialmente el gen CYP4 y demostrar su presencia en *C. montrouzieri*.

Materiales y Métodos

Búsqueda y Análisis de las Secuencias Ortólogas de Genes Implicados Directamente con la Resistencia a Insecticidas Químicos. Se realizó una búsqueda de las secuencias aminoacídicas ortólogas para la superfamilia de genes citocromo monooxigenasas (CYP450) en diversos insectos en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y del European Bioinformatics Institute (EBI). Las secuencias fueron analizadas mediante alineamiento múltiple utilizando el programa bioinformático ClustalW, y se determinó la zona de homología. Para las regiones conservadas se realizó una traducción inversa empleando la herramienta bioinformática DNA Converter de acceso libre, para obtener las secuencias nucleotídicas.

Obtención de Tabla de Uso de Codones y Diseño de Oligonucleótidos Degenerados. Debido a la escasa o nula información referente al genoma de *C. montrouzieri*, se elaboró una tabla de uso de codones tomando al pariente taxonómico más cercano con información genómica completa. Para calcular el RSCU (uso relativo de codones sinónimos) se utilizó la siguiente ecuación (Sharp et al. 1986):

$$RSCU = j \times \frac{Ni}{\sum_{i=j} Ni}$$

En donde j es el número de sinónimos y Ni es la cantidad de i ésimos codones sinónimos observados. Los valores menores a 1 indican la poca preferencia por el uso de ese codón sinónimo, mientras los valores mayores a 1 indican una alta preferencia por ese codón sinónimo que codifica para un aminoácido específico, siendo 1 el valor esperado (Fuglsang 2003). Los porcentajes de codón específico se calcularon empleando la siguiente formula (Fadiel et al. 2005):

$$\% \text{ de preferencia} = \frac{\text{(La suma de los codones observados para un codón sinónimo)} (100)}{\text{Sumatoria del total de codones sinónimos para un aminoácido}}$$

Para el diseño de los oligonucleótidos, las secuencias nucleotídicas previamente obtenidas se introdujeron en el programa de acceso gratuito GCUA: General Codon Usage Analysis (McInerney 1998), para determinar los codones más utilizados y así reducir el grado de degeneración y tener una amplificación más selectiva.

Insectos. Los adultos de *C. montrouzieri* de ambos sexos fueron proporcionados por el área de cría de insectos del Laboratorio de Biotecnología Ambiental del Centro de Biotecnología Genómica del IPN. Seis individuos seleccionados de manera aleatoria fueron utilizados como unidad de muestra.

Extracción del DNA Genómico. La extracción del DNA genómico de los individuos de *C. montrouzieri* se realizó siguiendo el protocolo de Hoffman y Winston (1987), adaptado y modificado para insectos. A los adultos se les retiraron los élitros y se les colocó en un tubo Eppendorf® de 1.5 ml, con 200 µl de solución de lisis (SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) y se maceraron con la ayuda de un pistilo plástico hasta obtener una solución viscosa. Se agregó un volumen de fenol-cloroformo y alcohol isoamílico (24:1 v/v) y se mezcló en un vortex durante 1min, posteriormente se agregaron 200 µl de TE 10/1 (Tris-HCl, 10mM/EDTA 1mM) y la muestra se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf®, con 1 ml de etanol al 100% y se mezcló por inversión. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 10,000 rpm por 2 min y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 400 µl de buffer TE (10/1) y se incubó con 1.5 µl de RNAsa (1mg/1ml) a 37°C por 5 min. Para precipitar el DNA se adicionaron 500 µl de acetato de amonio (4 M) y 1 ml de etanol al 100% y la muestra se centrifugó a 10,000 rpm por 2 min, y el sobrenadante se descartó. El precipitado se secó y posteriormente se resuspendió en 750 µl de buffer TE (10/1).

Reacción PCR Touchdown. El DNA genómico fue ajustado a una concentración de 450 ng/µl. Para la amplificación del DNA, se empleó una mezcla de reacción con volumen final de 25 µl, que contenía 2 µl de DNA (450 ng/µl), 2 µl de una mezcla de dNTPs (0.2 mM c/u), 2.5 µl oligonucleótido 5' (10 mM), 2.5 µl oligonucleótido 3' (10 mM), 1.5 µl MgCl₂ (25 mM), 0.2 µl de enzima Go Taq DNA polimerasa 5 U/µl y 5 µl de buffer 5X (Promega®) y 9.3 µl de agua MiliQ. Adicionalmente se preparó una segunda mezcla de reacción sin MgCl₂ y con 10.8 µl de agua MiliQ. Las muestras se incubaron en un termociclador siguiendo los programas de PCR del Cuadro 1. La purificación de los fragmentos amplificados se realizó a partir del gel empleando el estuche comercial PureLink™ Quick Gel Extraction (Invitrogen®), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ligación de los Productos Amplificados y Transformación en Células Competentes de *E. coli*. Para la reacción de ligación se utilizó el sistema pGEM®-T Easy Vector (Promega®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se emplearon 5 µl del producto de PCR y 0.5 µl de T4 DNA ligasa. Para la transformación se utilizaron células de *E. coli* JM109 las cuales se hicieron ultra competentes empleando el método reportado por Inoue et al. (1990). Se utilizaron 50 µl de células de *E. coli* y 5 µl de producto. Para la reacción de ligación, la mezcla se colocó en un baño de hielo y posteriormente se realizó la transformación mediante choque térmico de 42°C durante 45 s e inmediatamente después se colocó en hielo durante 2 min. Se agregaron 950 µl de medio SOC (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, NaCl 10 mM, KCl 2.4 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) a la mezcla de transformación y se incubó a 37°C durante 1.5 h con una agitación de 150 rpm. Posteriormente se sembraron 100 µl de la mezcla por duplicado en cajas Petri con medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Las clonas recombinantes se resembraron por estría en cajas Petri con medio LB con ampicilina y se les asignó un número para su identificación individual. Las colonias positivas se resembraron y mediante la técnica miniprep (Birmboim y Doly 1979) se aisló el DNA para llevar a cabo la secuenciación. Se realizó una digestión del DNA plasmídico obtenido con la enzima EcoRI, para la cual se empleó una mezcla de reacción con 20 µl de DNA, 1 µl de enzima EcoRI 5 U/µl y 3 µl de buffer 5X de y 6 µl de agua MiliQ para obtener un volumen final de 30 µl. La mezcla se incubó toda la noche a 37°C. El DNA se

visualizó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, a 100 V durante 1 h.

Cuadro 1. Programa PCR Touchdown para la Amplificación del Gen CYP4 en *Cryptolaemus montrouzieri*

Table 1. PCR Touchdown Program to Amplify CYP4 Gen in *Cryptolaemus montrouzieri*

Programa 1		Programa 2		Programa 3	
°C	No.ciclos	°C	No.ciclos	°C	No.ciclos
94	1	94	1	94	1
94 54 – 2 cada ciclo 72	5	94 54 - 1 cada ciclo 72	5	94 50 - 1 cada ciclo 72	5
94 44 72		94 50 72		94 44 72	
72	1	72	1	72	1
4	1	4	1	4	1

Determinación de la Secuencia Nucleotídica y Análisis de las Secuencias.

La secuenciación de las clonas recombinantes se realizó utilizando el estuche comercial BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, en un equipo ABI prism® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA). Las condiciones de la PCR fueron de 96°C/1 min, 96°C/30 s, 58°C/30 s y 72°C/1 min durante 30 ciclos y 4°C/∞. Para la reacción de secuenciación se utilizó buffer Big Dye v 3.1 5x, 4 µl agua miliQ, 7 µl Big Dye v 3.1, 4 µl oligonucleótido M13 (0.8 µM) (forward o reverse), 1 µl de DNA (450 ng/µl), en un volumen total de 20 µl. Para purificar el producto de la reacción de secuenciación se realizó el procedimiento estándar del estuche comercial, adicionando al producto de PCR de la reacción de secuenciación 2 µl de EDTA 125 mM, 2 µl de NaOAC 3 M pH 5.2 y 50 µl de etanol absoluto. La reacción se mezcló y se incubó a 20°C durante 15 min, posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a 6°C, se precipitó con etanol al 70% y después de eliminar el sobrenadante se resuspendió en 10 µl de formamida desionizada. La mezcla se desnaturalizó a 95°C para cargarla en la placa del secuenciador. Los electroferogramas obtenidos se editaron manualmente utilizando el programa informático Chromas® v. 2.1. Las secuencias obtenidas se pasaron a formato FASTA empleando la herramienta bioinformática Dynamo Blue Tractor® para hacer los ensamblajes necesarios y limpiar la secuencia de bases procedentes del vector, posteriormente se hizo un Blastn para determinar la homología con genes de resistencia y establecer las relaciones entre el gen CYP4 de *C. montrouzieri* y los genes reportados involucrados con la resistencia a insecticidas químicos.

Resultados

Para la búsqueda y el análisis de las secuencias ortólogas de los genes implicados directamente con la superfamilia de genes CYP4 se seleccionaron siete secuencias aminoacídicas de *A. gambiae* debido a que son secuencias completas, están directamente relacionadas con la resistencia a insecticidas químicos y se ha demostrado que intervienen en la detoxificación enzimática de compuestos xenobióticos. Para la construcción de la tabla de uso de codones se seleccionaron ocho secuencias de genes nucleares de *H. axyridis*. Todas las secuencias seleccionadas provienen de la base de datos del NCBI (Cuadro 2). El número efectivo de codones para *H. axyridis* fue de 2996 (Cuadro 3). Los valores de la columna N indican la cantidad de observaciones para ese codón específico.

En el Cuadro 3 los datos están ordenados de acuerdo al aminoácido que codifican, así como a la primera, segunda y tercera letra dentro del codón. También se observa que los aminoácidos Phe, Tyr, His, Gln, Asn, Lys, Asp, Glu, Cys, tienen una degeneración de dos codones. Los aminoácidos Val, Pro, Thr, Ala, y Gly tienen una degeneración de cuatro codones y los aminoácidos Leu, Ser, y Arg tienen una degeneración de seis codones. Se observa un mayor uso relativo de codones predominantes con AT. El Cuadro 4 presenta los resultados del análisis del uso de codones para *H. axyridis*.

Los oligonucleótidos se obtuvieron mediante el alineamiento de las secuencias obtenidas y su análisis con la tabla de uso de codones como se describen a continuación: EVDTFMFE 5'GAAGUUGAUACHUUUAUGUUUG 3', FYPNPEDKF 3'AAARTTTTCWGGRTTTGGAWA 5'. Los oligonucleótidos diseñados fueron sometidos a una PCR con las siguientes condiciones finales: 2 µl de dNTP's master mix, (0.2 mM de cada uno), 2.5 µl oligonucleótido 5' (10 mM), 2.5 µl

Cuadro 2. Secuencias Utilizadas para la Búsqueda y el Análisis de las Secuencias Ortólogas de la Superfamilia de Genes CYP4 en *Cryptolaemus montrouzieri*
Table 2. Sequences Used to Search and Analyze Ortholog Sequences of CYP4 genes Superfamily in *Cryptolaemus montrouzieri*

Secuencias aminoacídicas de <i>Anopheles gambiae</i>	Número de acceso NCBI
CYP4C25	AAL58564
CYP4C26	AAL58566
CYP4C28	AAL58565
CYP4C27	AAL58558
CYP4G17	AAL58561
CYP4H14	AAL58563
CYP4H18	AAL58556
Genes de <i>Harmonia axyridis</i>	
Hormona esterasa juvenil	AB201553
RNAm de la subunidad alfa ATPasa sodio/potasio	AY303371
RNAm sin apéndice distal	AB200969
RNAm sin arista	AB200970
<i>Engrailed</i> RNAm	DQ323900
<i>Engrailed</i> RNAm	DQ323901
<i>Invected</i> RNAm	DQ323902
RNAm de proteína 70 de choque térmico	EF668009

Cuadro 3. Uso de Codones para *Harmonia axyridis*Table 3. Codon Usage for *Harmonia axyridis*

AA	T		T		AA	C		C		AA	A		A		AA	G		G	
	Codón	N	RSCU	%		Codón	N	RSCU	%		Codón	N	RSCU	%		Codón	N		RSCU
T Phe	UUU	82	1.13	56.55	Ser	UCU	54	1.43	23.79	Tyr	UAU	61	1.17	56.65	Cys	UGU	37	0.84	42.05
T Phe	UUC	63	0.87	43.45	Ser	UCC	25	0.66	11.01	Tyr	UAC	43	0.83	41.35	Cys	UGC	51	1.16	57.95
T Leu	UUA	40	0.93	15.56	Ser	UCA	44	1.16	19.38	ter	UAA	42	0	34.71	Ter	UGA	64	0	52.89
T Leu	UUG	62	1.45	24.12	Ser	UCG	25	0.66	11.01	ter	UAG	15	0	12.40	Trp	UGG	55	1	100.0
C Leu	CUU	58	1.35	22.57	Pro	CCU	37	0.97	24.18	His	CAU	43	1.04	51.81	Arg	CGU	16	0.45	7.51
C Leu	CUC	41	0.96	15.95	Pro	CCC	37	0.97	24.18	His	CAC	40	0.96	48.19	Arg	CGC	22	0.62	10.33
C Leu	CUA	32	0.78	12.45	Pro	CCA	71	1.86	46.41	Gln	CAA	36	1.29	40.45	Arg	CGA	37	1.04	17.37
C Leu	CUG	24	0.56	9.34	Pro	CCG	8	0.21	5.23	Gln	CAG	53	0.71	59.55	Arg	CGG	21	0.59	9.86
A Ile	AUU	67	1.19	39.64	Thr	ACU	39	0.9	22.41	Asn	AAU	58	0.85	42.65	Ser	AGU	43	1.14	18.94
A Ile	AUC	51	0.91	30.18	Thr	ACC	44	1.01	25.29	Asn	AAC	78	1.15	57.35	Ser	AGC	36	0.95	15.86
A Ile	AUA	51	0.91	30.18	Thr	ACA	62	1.43	35.63	Lys	AAA	118	1.32	65.92	Arg	AGA	72	2.03	33.80
A Met	AUG	43	1	100.0	Thr	ACG	29	0.67	16.67	Lys	AAG	61	0.68	34.08	Arg	AGG	45	1.27	21.13
G Val	GUU	54	1.53	38.30	Ala	GCU	59	1.44	35.98	Asp	GAU	66	1.06	52.80	Gly	GGU	34	0.8	20.0
G Val	GUC	30	0.85	21.28	Ala	GCC	37	0.9	22.56	Asp	GAC	59	0.94	47.20	Gly	GGC	36	0.85	21.18
G Val	GUA	36	1.02	25.53	Ala	GCA	48	1.17	29.27	Glu	GAA	113	1.41	70.63	Gly	GGA	72	1.69	42.35
G Val	GUG	21	0.6	14.89	Ala	GCG	20	0.49	12.20	Glu	GAG	47	0.59	29.38	Gly	GGG	28	0.66	16.47

Mayor porcentaje de preferencia está indicado en negritas. ter = codón de terminación.

Cuadro 4. Resultados del Análisis del uso de Codones para *Harmonia axyridis*
 Table 4. Results of Codon Usage Analysis for *Harmonia axyridis*

Aminoácido	Codón	N	RSCU	%	Aminoácido	Codón	N	RSCU	%
Phe	UUU	82	1.13	56.55	His	CAU	43	1.04	51.80
Leu	UUG	62	1.45	24.12	His	CAC	40	0.96	48.19
Ile	AUU	67	1.19	39.64	Gln	CAG	53	0.71	59.55
Met	AUG	43	1.00	100	Asn	AAC	78	1.15	57.35
Val	GUU	54	1.53	38.29	Lys	AAA	118	1.32	65.92
Ser	UCU	54	1.43	23.78	Asp	GAU	66	1.06	52.80
Pro	CCA	71	1.86	46.40	Glu	GAA	113	1.41	70.62
Thr	ACA	62	1.43	35.63	Cys	UGU	37	0.84	42.04
Ala	GCU	59	1.44	35.97	Cys	UGC	51	1.16	57.95
Tyr	UAU	61	1.17	58.65	ter	UGA	64	0	52.89
ter	UAA	42	0	34.71	Trp	UGG	55	1.00	100
ter	UAG	15	0	12.39	Arg	AGA	72	2.03	33.80
					Gly	GGA	72	1.69	42.35

ter = codón de terminación.

AL58564.1	EVDTFMFEGHDTT	SAAISWILLLLLGTEPTIQDRIVEEIDQIMGGDRERFP	50
AL58566.1	EVDTFMFEGHDTT	AAAMAWILYLLGAAPDIQERVIQEIDAVMGTDRRDRP	50
AL58565.1	EVDTFMFEGHDTT	AIALAWMLYLLGTDQTVQERVFLEIDGIMGGDRERHP	50
AL58558.1	EVDTFMFEGHDTT	TAGLSWVLFLLALHPDVQERVCEEIESIFPPGDDRPA	50
AL58561.1	EVDTFMFEGHDTT	TAAGSSFVLCLLGIHQHVQEQVYAE LRQIFG-DSKRKA	49
AL58563.1	EVDTFMFEGHDTT	TSGISFTIYELARNPDVQERVYEEIVSILGKDHKTAE	50
AL58556.1	EVDTFMFEGHDTT	TSGISFTIHLAKHQDVQQRLYEEIDRMLGEEKTNVP	50
AL58564.1	-TMQELNEMKYLEACI	KEGLRLYPSVPLIARRLTEDVDID--GYVLPAQT	97
AL58566.1	-TMAELNEMRYLECCIK	EGRLYPSIPVIGRRLTEDVVRVD--NYTIPAGT	97
AL58565.1	-TMAELSEMRYLECCIK	ESLRLFPSIPILSRTLTTGV DIE--GHHIPSGT	97
AL58558.1	-TMQDLNELKLLERIC	KEALRLYPSVSFFGR T LSEDVQLG--GHQVPAQT	97
AL58561.1	-TFGDTLEMKYLERVI	FETLRMFPPVPMIARKINEDVQLASKNYTIPAGT	98
AL58563.1	LTYQNLQEFKYLDLV	VKEGLRMYPPVGIIGRALVEDLELN--GTTVPAGQ	98
AL58556.1	LTNALLQDFKYLDM	VIKESLRLVPPVPIIGRKLLEDMEIN--GAIIPAGT	98
AL58564.1	TAMIVVYQLHRNPEV	FNPDKFNPDHFLPENCRGRNPNYAXIPFSAGPRNC	147
AL58566.1	TAMIVVYELHRDTSV	FNPDKFNPDHFLPENCHGRHPYAYIPFTAGPRNC	147
AL58565.1	NAVIMLYQLHRDPQY	FNPPEKFPDRFLPENSTNRHPYSYIPFTAGPRNC	147
AL58558.1	IVGIHAYHVHRDERF	YFDPEKFPDRFLPENSTNRHPYAYIPFTAGPRNC	147
AL58561.1	TVVIGTYKIHRRDL	YFPPEFNFNPDHFLPERTONRHYSYIPFTAGPRNC	148
AL58563.1	NVLVPIYVIHRNPEI	YFNPPEFDFPSRFAEDAESKRGPFDYLPFSAGPRNC	148
AL58556.1	SISIKLFNIHRNRTV	FPEPEREPPRESEANEIKRGPYDYI-----	139
AL58564.1	IG-----	-----	149
AL58566.1	IGQSTGK-----	-----	154
AL58565.1	IGQ-----	-----	150
AL58558.1	IGQ-----	-----	150
AL58561.1	IGQ-----	-----	151
AL58563.1	IGQ-----	-----	151

Fig. 1. Alineamiento de las secuencias obtenidas de *Anopheles gambiae* y su análisis de uso de codones. Los recuadros grandes indican los aminoácidos de mayor homología y las letras en recuadros pequeños indican los aminoácidos más degenerados.

Fig. 1. Alignment of *Anopheles gambiae* sequences and codon usage analysis. Letters in large boxes indicate highest homology aminoacids, letter in small boxes indicate degenerate aminoacids.

oligonucleótido 3' (10 mM), 1.5 μ l MgCl₂ (25 mM), 0.2 μ l de enzima Go Taq DNA polimerasa 5 U/ μ l, 5 μ l de buffer 5X (Promega®), 9.3 μ l de agua MiliQ y 2 μ l de DNA (450 ng/ μ l) siguiendo el programa 1 de PCR en un volumen final de 25 μ l. Los productos de la PCR (Fig. 2) fueron sometidos a una secuenciación y la secuencia se editó manualmente (Cuadro 5).

El alineamiento de la secuencia CYP4 produjo tres alineamientos significativos, con una secuencia parcial del RNAm del citocromo P450 de *Ae. aegypti* con una identidad máxima del 96% (XM_001656715); y con una secuencia parcial del gen de la citocromo P450 monooxigenasa de *T. castaneum* GA-1 con una identidad máxima del 93% (AY337337). Así mismo con una secuencia parcial del RNAm de una enzima degradadora de feromonas de *T. castaneum* con una identidad máxima de 96% (XM_967531).

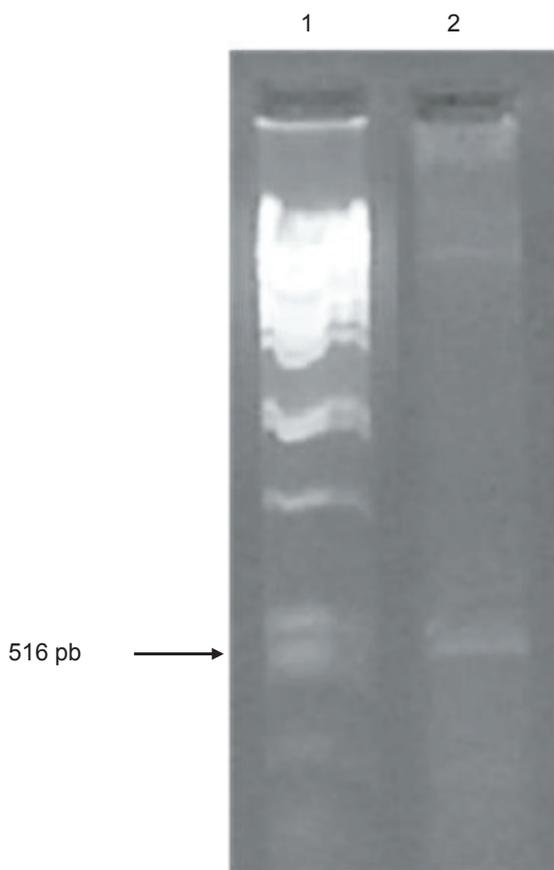


Fig. 2. Amplificación del gen CYP4 in gel de agarosa al 1.5%. Carril 1, marcador de peso molecular λ Pst. Carril 2, fragmento amplificado de CYP4in *Cryptolaemus montrouzieri*.

Fig. 2. CYP4 gene amplification in 1.5% agarose gel. Lane 1, λ Pst molecular size marker. Lane 2, amplified CYP4 fragment in *Cryptolaemus montrouzieri*.

Cuadro 5. Secuencia del Fragmento Amplificado del Gen CYP4 en *Cryptolaemus montrouzieri* Utilizando los Oligonucleótidos Diseñados

Table 5. Sequences of the Amplified Fragment of CYP4 Gene in *Cryptolaemus montrouzieri* Using Designed Primers

Secuencia del fragmento amplificado del gen CYP4	Tamaño (pb)
TTGAAGTTGATACTTTTATGTTTGAGGTTTTAGAAAAAGAGAATCT TAATTTTTAATCTTTGAGAGCCCTTTTTCAAACAACAAAAATCCT GAAAATATTTTCATTGTCTCATCGTATTCACAATGAAAGTAAGTGCA ATGTTCAAATTGTCTTGCATTTACTTCCATATAATGAAGGAATCTT GACTGAAAACCGCCTTTACATAGTTCAGCATATTTACAATTTATTT GACGATGCTAATTTACAATTTACTGGCGTAGATCGTCCAAATTCTT AGGAAGTCACAAAAATTTAGACGTAAGATGTCTTCACTAGAAAA CTACTAGAGATTTTCAGTCAGGAAAGAGCCGAGGCCACTCCATAG GACGTTTCCTTTTCATTTCAATGACCGGTATATTACTAATTGAGGG GTTGTCAAACCTGGTGCGGCGTAGTGAGGACAAAGCTCAGTCTAG TTGGACAGGCAATTGTTGTTCAAGAAGTAGAATTCGCGGTTCAAT TACTCGAAATGAACAGAGGTCCAATTAGATGGTCTCTAGAAATT CCTATCCAAACCCTGAAAACCTTTAG	569

Discusión

En la actualidad existen pocos estudios moleculares en el depredador *C. montrouzieri* en virtud de que el interés primordial en este insecto se ha centrado en el uso como agente de control biológico (Cloyd y Dickinson 2006). Este tipo de estudios ha sido de mayor interés en insectos que están relacionados con problemas de salud humana o en plagas agrícolas en las cuales el interés está enfocado a la resistencia y adaptación (Claudianos et al. 2006, Shi et al. 2012). *C. montrouzieri* ha mostrado una alta susceptibilidad a diversos insecticidas químicos, que se aplican en campos de cultivo dirigidos a controlar diversas plagas, particularmente a los insecticidas basados en neonicotinoides como el acetamiprid, dinotefuran y clotianidín (Cloyd y Dickinson 2006). Recientemente se han estudiado algunas enzimas detoxificantes importantes involucradas en la resistencia a insecticidas químicos como la glutatión S-transferasa, en los géneros *Tribolium*, *Drosophila*, *Anopheles*, *Apis*, *Bombyx*, y *Acyrtosiphon*, pero no en *C. montrouzieri* (Shi et al. 2012) siendo que la función depredadora de este último es fuertemente afectada ante la presencia de estos compuestos químicos (Morse y Bellows Jr. 1986). Por esta razón estos estudios, no obstante a ser escasos, deben de realizarse por ser de gran utilidad para mejorar la acción de este enemigo natural. En este estudio se utilizaron secuencias proteicas de insectos de diferentes órdenes cuyos genomas han sido más estudiados y de entre los cuales predomina el orden Diptera. La caracterización parcial del gen CYP4 en *C. montrouzieri* indica que este gen está cercanamente relacionado a los citocromos P450 monooxigenasas de *T. castaneum* y *Ae. aegypti*, así como a la secuencia de un gen de una enzima degradadora de feromonas en *T. castaneum*. Este estudio se realizó considerando que los genes de resistencia en insectos pueden ser genes conservados y que las secuencias obtenidas pueden ser de utilidad para detectar la presencia de CYP4 en *C. montrouzieri*. Los resultados indicaron que el uso de secuencias de un gen similar (CYP4) de un orden diferente (Diptera) y su análisis

para determinar el uso de codones resultó de utilidad para la detección del gen ortólogo en *C. montrouzieri*, ya que el diseño de los oligonucleótidos, no obstante a ser degenerados, facilitó la detección de CYP4 en *C. montrouzieri*. El gen CYP4 podría servir como un marcador molecular asociado a resistencia. La asociación entre la función de los genes y el patrón de uso de codones ha sido analizada en genomas de diversos microorganismos (Fuglsang 2003), plantas (Zhou et al. 2007), virus (Zhou et al. 2015, Morla et al. 2016) y parásitos (Dorha et al. 2015). En la mayoría de los cuales los patrones de uso de codones entre genes reflejan variaciones en la composición en el mismo gen; así como también son útiles para conocer los cambios estructurales que ocurren en un gen como resultado de la intensidad en la selección natural en la cual se ve involucrado un organismo (Fuglsang 2003, Wen-Juan et al. 2007). En los análisis de uso de codones, los valores de RSCU reflejan la frecuencia de uso de un codón en relación al número de veces esperado que el codón podría ser usado en ausencia del sesgo del uso de codón (McInerney 1998). El sesgo de codón presumiblemente refleja la selección natural para una traducción eficiente y exacta (Dohra et al. 2015) pero cabe mencionar que a nivel de proteína el patrón de uso de codones es neutral, por lo cual la selección natural a nivel de proteína no afecta las frecuencias en el uso de codones sinónimos, es decir que no se ve reducida su capacidad después de una mutación puntual, ya que de cierta manera los codones pueden mantener o codificar para el mismo aminoácido o para aminoácidos con propiedades similares, de esta manera el impacto en los errores en aquellas secuencias codificantes puede ser medido dando como resultado la robustez genética (Archetti 2006). El uso de codones es una herramienta útil que proporciona la base del conocimiento para la interpretación de secuencias genómicas (Fadiel et al. 2005).

Agradecimiento

Los autores expresamos nuestro agradecimiento a la CONAFOR 2004-CO4-17 por el financiamiento otorgado para el desarrollo de este proyecto así como también a la COFAA y al programa EDI del Instituto Politécnico Nacional. Eduardo Jiménez recibió una beca por parte del CONACYT.

Referencias Citadas

- Archetti, M. 2006. Genetic robustness and selection at the protein level for synonymous codons. *J. Evol. Biol.* 19: 353-365.
- Bimboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Claudianos, C., H. Ranson, R. M. Johnson, S. Biswas, M. A. Schuler, M. R. Berenbaum, R. Feyereisen, and J. G. Oakeshott. 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol.* 15: 615-636.
- Clausen, C. P. 1978. Introduced Parasites and Predators of Arthropod Pests and Weeds: a World Review. USDA-ARG, Agric. Handbk. 480, Washington, DC.
- Cloyd, R. A., and A. Dickinson. 2006. Effect of insecticides on mealybug destroyer (Coleoptera: Coccinellidae) and parasitoid *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae), natural enemies of citrus mealybug (Homoptera: Pseudococcidae). *J. Econ. Entomol.* 99: 1596-1604.

- Dohra, H., M. Fujishima, and H. Suzuki. 2015. Analysis of amino acid and codon usage in *Paramecium bursaria*. FEBS Lett. 589: 3113-3118.
- Fadiel, A., S. Lithwick, and F. Naftolin. 2005. The influence of environmental adaptation on bacterial genome structure. Lett. Appl. Microbiol. 40: 12-18.
- Fickett, J. W. 1982. Recognition of protein coding regions in DNA sequences. Nucleic Acids Res. 10: 5303-5318.
- Fuglsang, A. 2003. Strong associations between gene function and codon usage. APMIS 111: 843-847.
- Gong, M.-Q., G. Yan, H. Xian-Bang, S. Yan, M. Lei, L. Xiu-Lan, S. Li-Xin, S. Jing, Q. Jin, and Z. Chang-Liang. 2005. Cloning and overexpression of CYP6F1, a cytochrome P450 gene, from deltamethrin-resistant *Culex pipiens pallens*. Acta Bioch. Bioph. Sin. 37: 317-326.
- Hemingway, J., N. J. Hawkes, L. McCarroll, and H. Ranson. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochem. Mol. Biol. 34: 653-665.
- Hoffman, C. S., and F. Winston. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. Gene 57: 267-272.
- Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* white plasmids. Gene 96: 23-28.
- McInerney, J. O. 1998. GCUA: general codon usage analysis. Bioinformatics 14: 372-373.
- Morla, S., A. Makhija, and S. Kumar. 2016. Synonymous codon usage pattern in glycoprotein gene of rabies virus. Gene 584: 1-6.
- Morse, J. G., and T. S. Bellows, Jr. 1986. Toxicity of major citrus pesticides to *Aphytis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae) and *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae). J. Econ. Entomol. 79: 311-314.
- Nakamura, M., and M. Sugiura. 2007. Translation efficiencies of synonymous codons are not always correlated with codon usage in tobacco chloroplasts. Plant J. 49: 128-134.
- Scharf, M. E., S. Parimi, L. J. Meinke, L. D. Chandler, and B. D. Siegfried. 2001. Expression and induction of three family 4 cytochrome P450 (CYP4) genes identified from insecticide resistant and susceptible western corn rootworms, *Diabrotica virgifera virgifera*. Insect Mol. Biol. 10: 139-146.
- Sharp, P. M., T. M. F. Tuohy, and K. R. Mosurski. 1986. Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. Nucleic Acids Res. 14: 5125-5143.
- Shi, H., L. Pei, S. Gu, S. Zhu, Y. Wang, Y. Zhang, and B. Li. 2012. Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. Genomics 100: 327-335.
- Wen-Juan, Z., J. Zhou, L. Zuo-Feng, W. Li, G. Xun, and Z. Yang. 2007. Comparative analysis of codon usage patterns among mitochondrion, chloroplast and nuclear genes in *Triticum aestivum* L. J. Int. Plant Biol. 49: 246-254.
- Zhou, H., B. Yan, S. Chen, M. Wang, R. Jia, and A. Cheng. 2015. Evolutionary characterization of Tembusu virus infection through identification of codon usage patterns. Infection, Genetics and Evolution 35: 27-33.
- Zhou, M., C. Tong, and J. Shi. 2007. Analysis of codon usage between different poplar species. JGG 34: 555-561.