

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Programa de doctorado de Fisiología
Bienio 2005-2007

**IDENTIFICACIÓN DE FEROMONAS Y PROTEÍNAS
IMPLICADAS EN LA PERCEPCIÓN FEROMONAL DE
LEPIDÓPTEROS PLAGA**

Memoria presentada por Patricia Acín Viu
para optar al título de Doctor
con mención europea

Tesis realizada en el Departamento de Química Biológica y Modelización Molecular del
Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC) bajo la dirección de la Dra.
Carmen Quero López y la Dra. Glòria Rosell Pellisé

Directoras

Dra. Carmen Quero López
Dept. de Química Biológica y Modelización Molecular
ICAQ
CSIC

Dra. Glòria Rosell Pellisé
Dept. de Farmacología y Química Terapéutica
Facultad de Farmacia
Universidad de Barcelona

Tutora

Dra. Isabel Navarro Álvarez
Dept. de Fisiología
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona

Doctoranda

Patricia Acín Viu

A mi familia
A Eduardo

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Química Biológica y Modelización Molecular del Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC) del CSIC en Barcelona, durante los años 2005-2008.

En primer lugar quisiera agradecer a mis dos directoras de tesis, la Dra. Carmen Quero y la Dra. Glòria Rosell por guiarme a lo largo de estos años e introducirme en el apasionante tema de la olfacción en insectos. A su vez quisiera añadir el gran apoyo moral que me han otorgado en toda la tesis.

Al profesor Ángel Guerrero, profesor de investigación del CSIC, por la confianza depositada al permitirme realizar la tesis en su grupo y por su apoyo y consejos a lo largo de la misma.

A la Dra. Isabel Navarro por aceptar ser mi tutora durante todo este tiempo.

Al CSIC, por la concesión de una beca I3P, que ha permitido la completa dedicación y realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. Victor Sarto por sus conocimientos y aportación de adultos de *Paysandisia archon*.

Al Dr Tomás Cabello, de la Universidad de Almería por sus múltiples consejos y ayuda en la cría de *Spodoptera exigua*, sin la cual no podría haberse llevado a cabo.

A Pedro Fuchs, de Kenogard por su colaboración en la realización de las pruebas de campo.

A la Dra. Montse Carrascal y al Dr. Joaquín Abián por su colaboración y ayuda en la parte de proteómica.

A Sami Irar por permitirnos realizar una gran parte del trabajo experimental de proteómica en su departamento así como por sus innumerables consejos.

A Vanessa Casas por ayudarnos con las múltiples digestiones de proteínas y los análisis de MALDI-TOF.

A Roser y Dori por su disposición y ayuda en la utilización de la espectrometría de masas.

A mi compañero de laboratorio Gerard Carot por los grandes consejos, paciencia y en general por los buenos momentos que hemos pasado.

A Paula Guerra por su gran amistad y apoyo moral en todas las etapas de esta tesis.

A todos mis compañeros de la unidad de química ecológica: Anna, Ben, Pep, Rafa, Lourdes y Pilar por su amistad, compañerismo, consejos y sobretodo por hacer que cada día fuera más agradable.

A Sandra Moure por sus aportes energéticos a horas intempestivas.

A Mariana y Sara por hacer del 304 un lugar más ameno.

A todos mis amigos por su enorme paciencia y comprensión a lo largo de toda la tesis que a pesar de no haberlos visto todo lo que hubiera deseado han sabido esperar y seguir teniéndome en cuenta.

Y en especial a Eduardo y a mi familia por estar allí en todo momento.

A todos vosotros muchísimas gracias

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Control de plagas de insectos	3
1.2. Feromonas	5
1.3. Sistema olfativo en lepidópteros.....	6
1.3.1. Fisiología de la percepción	7
1.4. Evolución de la comunicación química en el orden Lepidoptera	11
1.4.1. División Ditrysia.....	12
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES	19
3.1. Insectos	21
3.2. Estudio de la morfología de la antena: Microscopía electrónica de barrido.....	21
3.3. Estudio de la respuesta antenal: Electrofisiología	21
3.3.1. Electroantenograma	22
3.3.1.1. Descripción del equipo de EAG utilizado	22
3.3.2. Cromatografía de gases acoplada a detección antenográfica (GC-EAD).....	25
3.3.2.1. Descripción del equipo utilizado	26
3.3.3. Registro en sensila única	28
3.3.3.1. Descripción del equipo utilizado	28
3.4. Túnel de viento.....	30
3.5. Análisis de las proteínas antenales mediante técnicas proteómicas.....	32
3.5.1. Electroforesis bidimensional	33
3.5.1.1. Preparación de la muestra	33
3.5.1.1.1. Procedimiento utilizado	34
3.5.1.2. Cuantificación de proteínas	34
3.5.1.3. Primera dimensión	35
3.5.1.3.1. Procedimiento utilizado	36
3.5.1.4. Segunda dimensión.....	37
3.5.1.5. Tinción.....	38
3.5.1.6. Análisis de imagen	39
3.5.2. Digestión de las manchas proteicas.....	40
3.5.3. Espectrometría de masas	40
3.5.3.1. Mapeo peptídico.....	41
3.5.3.1.1. Procedimiento utilizado	42
3.5.3.2. Secuenciación de péptidos	43
4. ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN FEROMONAL DE LA VARIEDAD DE <i>Spodoptera exigua</i> ENCONTRADA EN ESPAÑA	45
4.1. Introducción.....	47
4.2. Material y métodos	50
4.2.1. Material biológico	50
4.2.2. Compuestos químicos.....	52
4.2.3. Análisis de la composición feromonal	53
4.2.3.1. Observación del comportamiento de llamada	53
4.2.3.2. Extractos glandulares	54
4.2.3.3. Recogida de volátiles	55
4.2.4. Estudios electrofisiológicos	55

4.2.4.1. EAG	55
4.2.4.1.1. Efecto de las mezclas binarias en la respuesta antenal	56
4.2.4.1.2. Efecto de las mezclas ternarias en la respuesta antenal	57
4.2.4.2. GC-EAD	58
4.2.4.3. SSR.....	59
4.2.5. Túnel de viento	59
4.2.5.1. Efecto de la mezcla feromonal de glándulas y volátiles	60
4.2.5.2. Efecto de las combinaciones binarias y ternarias	60
4.2.5.3. Efecto de otros compuestos	62
4.2.6. Pruebas de campo.....	62
4.2.6.1. Campaña 2006	63
4.2.6.2. Campaña 2008	64
4.2.7. Immunohistoquímica.....	65
4.2.7.1. Procedimiento seguido (protocolo "Whole-mount").....	66
4.2.7.2. Microscopía confocal	67
4.3. Resultados	68
4.3.1. Comportamiento de llamada.....	68
4.3.2. Análisis de la composición feromona.....	69
4.3.2.1. Extractos glandulares	69
4.3.2.2. Recogida de volátiles.....	73
4.3.3. Estudio de la respuesta antenal de machos mediante técnicas electrofisiológicas.....	75
4.3.3.1. EAG	75
4.3.3.1.1. Actividad de las mezclas encontrada en glándulas y en volátiles	76
4.3.3.1.2. Actividad de los compuestos feromonales por separado.....	77
4.3.3.1.3. Actividad de las mezclas binarias	79
4.3.3.1.4. Actividad de las mezclas ternarias.....	79
4.3.3.2. GC-EAD	80
4.3.3.3. SSR.....	81
4.3.4. Estudios de comportamiento en túnel de viento	85
4.3.4.1. Mezclas halladas en glándulas y volátiles	85
4.3.4.2. Combinaciones binarias.....	86
4.3.4.3. Combinaciones ternarias	87
4.3.4.4. Efecto de los compuestos no encontrados en volátiles	88
4.3.4.5. Estudio de la proporción más atractiva	89
4.3.5. Pruebas de campo.....	90
4.3.5.1. Campaña 2006	90
4.3.5.2. Campaña 2008	92
4.3.6. Estudio de los lóbulos antenales-Immunohistoquímica	94
4.4. Discusión	97
5. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS ANTENALES DE TRES ESPECIES DE NOCTUIDOS	103
5.1. Introducción	105
5.1.1. OBPs	105
5.1.2. ODEs	107
5.1.3. Utilización de la proteómica en el control de plagas.....	107
5.2. Material y métodos.....	109
5.2.1. Insectos	109
5.2.2. Análisis general de las proteínas antenales	109
5.2.2.1. Optimización de la técnica	109
5.2.2.1.1. Tratamiento de la muestra	109
5.2.2.1.2. 1ª Dimensión.....	110
5.2.2.2. Preparación de extractos	111
5.2.2.2.1. Extractos antenales	111

5.2.2.2. Extractos glandulares y de planta	112
5.2.3. Análisis de las ODEs.....	113
5.2.3.1. Sonicación.....	113
5.2.3.2. Electroforesis 2D en condiciones nativas.....	113
5.2.3.3. Electroforesis 2D en condiciones desnaturalizantes	114
5.2.4. Respuesta antenal en EAG.....	115
5.3. Resultados.....	116
5.3.1. Optimización de la técnica	116
5.3.2. <i>Sesamia nonagrioides</i>	120
5.3.2.1. Morfología de las antenas	120
5.3.2.2. Análisis de las proteínas antenales	122
5.3.2.3. Identificación de las proteínas antenales diferenciales	123
5.3.2.4. Estudio de las ODEs	125
5.3.2.5. Expresión de las OBPs a lo largo del fotoperiodo	131
5.3.2.6. Estudio de las 3 manchas correspondientes a la PBP1	133
5.3.2.7. Respuesta antenal en EAG	134
5.3.3. Estudio de la expresión de las proteínas antenales en machos y hembras de otras dos especies de noctuidos: <i>Spodoptera exigua</i> y <i>Spodoptera littoralis</i>	135
5.3.3.1. <i>Spodoptera exigua</i>	135
5.3.3.1.1. Análisis diferencial de las proteínas antenales.....	135
5.3.3.1.2. Identificación de las manchas recortadas	139
5.3.3.2. <i>Spodoptera littoralis</i>	141
5.3.3.2.1. Análisis diferencial de las proteínas antenales.....	141
5.3.3.3. Respuesta antenal en EAG de ambas especies del género <i>Spodoptera</i>	146
5.4. Discusión	147
6. ESTUDIO DE LA COMUNICACIÓN QUÍMICA INTRAESPECÍFICA UTILIZADA POR LA ESPECIE <i>Paysandisia archon</i> (Lepidoptera: Castniidae)	155
6.1. Introducción.....	157
6.1.1. Ciclo biológico	158
6.1.2. Comportamiento.....	160
6.1.3. Plantas hospedadoras	160
6.2. Material y métodos	162
6.2.1. Insectos.....	162
6.2.2. Preparación de extractos	163
6.2.2.1. <i>Paysandisia archon</i> : Extractos de adultos y de plantas	163
6.2.2.2. <i>Pieris brassicae</i> : Extractos de adultos.....	164
6.2.3. SEM	164
6.2.4. Recogida de volátiles	165
6.2.4.1. Recogida mediante carbón activo	166
6.2.4.2. Recogida mediante Porapak	166
6.2.5. Electrofisiología	167
6.2.5.1. EAG.....	167
6.2.5.2. GC-EAD	169
6.2.6. Análisis de los extractos corporales y los volátiles emitidos mediante GC-MS.....	170
6.2.7. Túnel de viento.....	171
6.2.8. Estudio de las proteínas antenales expresadas en ambos sexos.....	171
6.3. Resultados.....	173
6.3.1. Estudio morfológico de la antena mediante SEM	173
6.3.2. Análisis de la respuesta antenal mediante bioensayos.....	177
6.3.2.1. Electroantenografía	177
6.3.2.2. GC-EAD	184
6.3.2.3. Túnel de viento.....	191

6.3.3. GC-MS.....	191
6.3.3.1. Análisis de las sustancias químicas emitida por la hembra	192
6.3.3.2. Análisis de las sustancias químicas emitidas por el macho.....	194
6.3.4. Análisis de las proteínas expresadas en las antenas de machos y hembras.....	200
6.4. Discusión	204
7. CONCLUSIONES.....	213
7.1. Estudio de la composición feromonal de la variedad de <i>Spodoptera exigua</i> encontrada en España.....	215
7.2. Análisis de las proteínas antenales de tres especies de noctuidos.....	215
7.3. Estudio de la comunicación química intraespecífica utilizada por la especie <i>Paysandisia archon</i> (Lepidoptera: Castniidae).....	216
8. BIBLIOGRAFÍA.....	219
9. ANEXOS.....	239
9.1. Árbol filogenético del orden Lepidoptera	241
9.2. Ensayos de túnel de viento realizados con <i>S. exigua</i>	243
9.3. PMFs de las tres PBP1 de <i>S. nonagrioides</i>	247
9.4. Geles con 200 µg de proteína	249
9.5. Situación de la familia Castniidae en la filogenia de lepidópteros.....	251
10. SUMMARY.....	255
10.1. Introduction	255
10.1.1. Pheromones	255
10.1.2. Olfactory system in Lepidoptera	256
10.1.3. The physiology of perception.....	256
10.1.4. Ditrysia.....	257
10.2. Objectives.....	258
10.3. Techniques used in the study of olfactory processes	258
10.3.1. Scanning electron microscope.....	258
10.3.2. Electrophysiology.....	259
10.3.2.1. Electroantennogram.....	259
10.3.2.2. Gas chromatography coupled to electroantennographic detection	260
10.3.3. Wind tunnel.....	260
10.3.4. Gas chromatography coupled to mass spectrometry	261
10.3.5. Analysis of the antennal proteins by proteomic techniques	261
10.4. Results and discussion	262
10.4.1. Pheromone composition in the Spanish strain of <i>Spodoptera exigua</i>	262
10.4.1.1. Analysis of the pheromone composition in gland extracts	263
10.4.1.2. Analysis of the pheromone composition in volatiles.....	263
10.4.1.3. Study of the male antennal response by electrophysiological techniques	264
10.4.1.4. Behavioural studies in wind tunnel.....	265
10.4.2. Analysis of the antennal proteins in three Noctuid species.....	267
10.4.2.1. Morphology of the antennae	267
10.4.2.2. Analysis and identification of the proteins found in the antenna	268
10.4.2.2.1. <i>Sesamia nonagrioides</i>	268
10.4.2.2.2. <i>Spodoptera exigua</i>	270
10.4.2.2.3. <i>Spodoptera littoralis</i>	271

Indice

10.4.3. Study of the chemical communication in <i>Paysandisia archon</i>	273
10.4.3.1. Morphological study of the antenna by SEM.....	274
10.4.3.2. Analysis of the antennal response by EAG.....	274
10.4.3.3. Analysis of the antennal response and identification of the active compounds by GC-EAD and GC-MS.....	275
10.5. Conclusions.....	278
10.5.1. Pheromone composition in the Spanish strain of <i>Spodoptera exigua</i>	278
10.5.2. Analysis of the antennal proteins in three Noctuid species.....	278
10.5.3. Study of the chemical communication in <i>Paysandisia archon</i>	279
10.6. References.....	280

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
AL	Lóbulo antenal (<i>Antennal Lobe</i>)
α,β-naftil acetato	Acetato de α,β -naftilo
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamiento básico local (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CHAPS	Sulfonato de 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]1- propano
CRABP	Proteína de unión al ácido retinoico celular (<i>Cellular Retinoic Acid Binding Protein</i>)
2DE	Electroforesis bidimensional (<i>Two-Dimensional Electrophoresis</i>)
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DTT	Ditiotreitol
EAG	Electroantenografía o electroantenograma (<i>Electroantennogram</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminoteracético
ESI	Ionización por electrospray (<i>Electrospray Ionization</i>)
FABP	Proteína de unión a ácidos grasos (<i>Fatty-Acid Binding Protein</i>)
FID	Detector de ionización de llama (<i>Flame Ionization Detector</i>)
GC	Cromatografía de gases (<i>Gas Chromatography</i>)
GC-EAD	Cromatografía de gases acoplada a detección electroantenográfica (<i>Gas Chromatography Coupled to Electroantennographic Detection</i>)
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (<i>Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry</i>)
GOBP	Proteína de unión a moléculas de olor generales (<i>General Odorant Binding Protein</i>)
h	Hora/s
HED	Disulfuro de hidroxietilo (<i>Hydroxyethyl disulfide</i>)
HR	Humedad relativa
IAA	Iodoacetamida
i.d.	Diámetro interior (<i>Internal Diameter</i>)
IEF	Isoelectroenfoque (<i>Isoelectric Focusing</i>)
IPG	Gradiente de pH inmovilizado (<i>Immobilized pH Gradient</i>)
IPM	Control integrado de plagas (<i>Integrated Pest Management</i>)
IT	Trampa iónica (<i>Ionic Trap</i>)
KDa	Kilodaltons
KPa	Kilopascales
LC	Cromatografía líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
L:D	Luz:Oscuridad (<i>Light:Darkness</i>)
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz (<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
MGC	Complejo macroglomerular (<i>Macroglomerular Complex</i>)
min	Minuto/s
mM	Milimolar
Mr	Masa molecular relativa
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem (<i>Tandem Mass Spectrometry</i>)
mV	Milivoltio
ND	Neuronas descendentes
ng	Nanogramo
OBP	Proteína de unión a moléculas odoríferas (<i>Odorant Binding Protein</i>)

ODE	Enzima degradador de olor (<i>O</i> <u>d</u> <i>o</i> r <u>a</u> n <u>t</u> <i>D</i> <u>e</u> <i>g</i> r <u>a</u> d <u>i</u> n <u>g</u> <i>E</i> <u>n</u> <i>z</i> i <u>m</u> e)
OR	Receptor odorífero (<i>O</i> <u>d</u> <i>o</i> r <u>a</u> n <u>t</u> <i>R</i> <u>e</u> <i>c</i> e <u>p</u> t <u>o</u> r)
Pág.	Página
PBAN	Neuropéptido activador de la biosíntesis feromonal (<i>P</i> <u>h</u> <i>e</i> r <u>o</u> m <u>o</u> n <u>e</u> <i>B</i> <u>i</u> <i>o</i> s <u>y</u> n <u>t</u> h <u>e</u> s <u>i</u> s <i>A</i> <u>c</u> t <u>i</u> v <u>a</u> t <u>i</u> n <u>g</u> <i>N</i> <u>e</u> r <u>o</u> p <u>e</u> p <u>t</u> i <u>d</u> e)
PBP	Proteína de unión a feromona (<i>P</i> <u>h</u> <i>e</i> r <u>o</u> m <u>o</u> n <u>e</u> <i>B</i> <u>i</u> n <u>d</u> i <u>n</u> g <i>P</i> <u>r</u> o <u>t</u> e <u>i</u> n)
PCP	Proteína cuticular de la prepupa
PFA	Paraformaldehido
pl	Punto isoeléctrico
PMF	Mapeo de huella peptídico (<i>P</i> <u>e</u> p <u>t</u> i <u>d</u> e <i>M</i> <u>a</u> s <u>s</u> <i>F</i> <u>i</u> n <u>g</u> e <u>r</u> p <u>r</u> i <u>n</u> t <u>i</u> n <u>g</u>)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (<i>S</i> <u>o</u> d <u>i</u> u <u>m</u> - <i>D</i> <u>o</u> d <u>e</u> c <u>y</u> l- <i>S</i> <u>u</u> l <u>p</u> h <u>a</u> t <u>e</u> <i>P</i> <u>o</u> l <u>y</u> a <u>c</u> r <u>i</u> l <u>a</u> m <u>i</u> d <u>e</u> <i>G</i> <u>e</u> l <i>E</i> <u>l</u> e <u>c</u> t <u>r</u> o <u>p</u> h <u>o</u> r <u>e</u> s <u>i</u> s)
seg	Segundo/s
SEM	Microscopía electrónica de barrido (<i>S</i> <u>c</u> a <u>n</u> n <u>i</u> n <u>g</u> <i>E</i> <u>l</u> e <u>c</u> t <u>r</u> o <u>n</u> <i>M</i> <u>i</u> c <u>r</u> o <u>s</u> c <u>o</u> p <u>e</u>)
SPME	Microextracción en fase sólida (<i>S</i> <u>o</u> l <u>i</u> d <i>P</i> <u>h</u> a <u>s</u> e <i>M</i> <u>i</u> c <u>r</u> o <u>e</u> x <u>t</u> r <u>a</u> c <u>t</u> i <u>o</u> n)
SSR	Registro de sensila única (<i>S</i> <u>i</u> n <u>g</u> l <u>e</u> <i>S</i> <u>e</u> n <u>s</u> i <u>l</u> l <u>u</u> m <i>R</i> <u>e</u> c <u>o</u> r <u>d</u> i <u>n</u> g)
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético
TFK	Trifluorocetona
TOF	Analizador de tiempo de vuelo (<i>T</i> <u>i</u> m <u>e</u> <i>O</i> <u>f</u> <i>F</i> <u>l</u> i <u>g</u> h <u>t</u>)
TR	Tampón de rehidratación
V	Voltio
v/v	Volumen/volumen
W	Vátio
w/v	Peso/volumen (<i>W</i> <u>e</u> i <u>g</u> h <u>t</u> / <i>V</i> <u>o</u> l <u>u</u> m <u>e</u>)

Compuestos utilizados:

12:Ac	Acetato de dodecilo
(E,E)-farnesal	(<i>E</i> , <i>E</i>)-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrienal
(E,Z)-farnesal	(<i>E</i> , <i>Z</i>)-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrienal
(Z,E)-farnesal	(<i>Z</i> , <i>E</i>)-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrienal
Z9-14:Ac	Acetato de (<i>Z</i>)-9-tetradecenilo
Z9-14:OH	(<i>Z</i>)-9-tetradecenol
(Z,E)-9,11-14:Ac	Acetato de (<i>Z</i> , <i>E</i>)-9,11-tetradecadienilo
(Z,E)-9,12-14:Ac	Acetato de (<i>Z</i> , <i>E</i>)-9,12-tetradecadienilo
(Z,E)-9,12-14:OH	(<i>Z</i> , <i>E</i>)-9,12-tetradecadienol
Z11-14:Ac	Acetato de (<i>Z</i>)-11-tetradecenilo
Z11-16:Ac	Acetato de (<i>Z</i>)-11-hexadecenilo
Z11-16:OH	(<i>Z</i>)-11-hexadecenol
(E,Z)-2,13-18:OH	(<i>E</i> , <i>Z</i>)-2,13-octadecadienol