

GENÓMICA Y EMBRIOLOGÍA DE DALBULUS MAIDIS (DE LONG & WOLCOTT, 1923). (HEMIPTERA-AUCHENORRHYNCHA): NUEVOS CONOCIMIENTOS PARA NUEVAS HERRAMIENTAS DE CONTROL



Centro de Bioinvestigaciones (CEBIO)

Expositor: Dr. RIVERA POMAR, Rolando

Grupo de trabajo: Lic. M. I. Catalano, Mg. V. Palacio, Lic. L. Dalaisón, Lic. E. Gazza, Ing. Agr. H. González, Lic. A. Pascual, Lic. N. Esponda-Behrens

rrivera@unnoba.edu.ar

RESUMEN

Hemos generado información genómica aplicable a nuevos métodos de control de la plaga de maíz, *Dalbulus maidis* (De Long & Wolcott, 1923; *Hemiptera*, *Cicadellidae*) vector de *Spiroplasma kunkelii*, patógeno causante del achaparramiento del maíz. Realizamos el análisis preliminar del transcriptoma y estudiamos los procesos embriológicos del vector con el fin de generar métodos del silenciamiento de genes esenciales para el desarrollo, la fertilidad y la supervivencia.

INTRODUCCIÓN

El maíz es el segundo de los cereales cultivados en nuestro país. Representa aproximadamente el 25% de los cereales cultivados y un 57,5% de los cereales exportados. Su aporte a la economía Nacional se estima en 8.000 millones de dólares (Eyhérbide, *et al.*, 2009; Ghida-Daza, 2012, 2013) e incrementándose. En nuestro país se cultivan 4,26 millones de has de maíz, de las cuales casi el 30% pertenecen a la provincia de Buenos Aires. Entre los problemas fitosanitarios que afectan al cultivo de maíz, se encuentran el achaparramiento (*corn stunt*) y el Mal de Río Cuarto. El primero es producido por tres patógenos que actúan solos o en conjunto: *Spiroplasma kunkelii* (*Corn Stunt Spiroplasma*, CSS), el fitoplasma de achaparramiento (*Maize Bushy Stunt Phytoplasma*, MBSP) y el virus de rayado fino (*Maize Rayado Fino Virus*, MRFV) (Carpane *et al.*, 2011). Se conocen unas diez especies de auquenorrincos con capacidad vectorial para estos patógenos, pero el de mayor importancia es *Dalbulus maidis* (CSS, MBSP y MRFV). Las pérdidas calculadas por estas enfermedades son muy altas, en especial en el Noroeste de la provincia de Buenos Aires (Eyhérbide, 2007). *D. maidis* es una especie monófaga que se alimenta de especies del género *Zea* sp. (Remes-Lenicov & Virla, 1993). Además de su capacidad vectora, genera daños mecánicos, desequilibrio hídrico y aumenta el riesgo de infecciones producidas por hongos. Las oviposiciones se realizan dentro del parénquima foliar. (Virla *et al.*, 1990; Remes-Lenicov & Virla, 1993). El espiroplasma es propagativo persistente, ya que el insecto infectado mantiene su capacidad vectora toda la vida. Alcanza el floema vegetal desde las glándulas salivales de *D. maidis* mientras se alimenta (Ozbek *et al.*, 2003). La sintomatología del achaparramiento varía según las condiciones climáticas, el cultivar y la presencia de otros patógenos. Incluye, entre otros síntomas, la proliferación de mazorcas pobremente formadas.

Las formas de control consisten en la búsqueda de genotipos tolerantes o resistentes (Giménez-Pecci *et al.*, 1997; Hidalgo *et al.*, 1998) o se recurre al uso de insecticidas. Los insecticidas actúan sobre todos los insectos, afectando también los benéficos, siendo un caso preocupante el de las abejas, ya que Argentina es uno de los principales productores de miel (INTA informa, 2011). El desarrollo de estrategias de control enfocadas a las plagas es de crucial importancia para la sustentabilidad del agroecosistema a mediano y largo plazo. Una estrategia novedosa consiste en la utilización de la interferencia de ARN (ARNi) mediada por una planta que actúa como fuente de ARN de doble cadena (ARNdc) a través de los fluidos vegetales de los que se alimenta el insecto (Baum *et al.*, 2007). Este tipo de control permite actuar exclusivamente sobre la/las especies de interés sin afectar a otras (Whyard *et al.*, 2009). Esta tecnología requiere identificar genes involucrados directamente en la supervivencia y desarrollo de las especies plaga, con el fin de seleccionar entre ellos, los mejores candidatos para desarrollar una variedad de planta transgénica que exprese de manera constitutiva el ARNdc silenciador del gen blanco. Con el fin de desarrollar esta técnica para afectar poblaciones de *D. maidis* comenzamos el análisis del transcriptoma, identificamos genes que participan en la ovogénesis y el desarrollo embrionario, y analizamos la embriología del insecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento de la colonia de *Dalbulus maidis*. Los insectos fueron mantenidos en el Centro de Bioinvestigaciones (CEBIO-UNNOBA) en condiciones controladas (24°C, 70-80% de humedad relativa y 16 hs de luz artificial) sobre plantas de maíz sanas. Los huevos se recolectaron del parénquima foliar, se decorionaron química o manualmente, se fijaron en formaldehído 4 y se tiñeron con DAPI para determinar el estadio del desarrollo por microscopía de fluorescencia.

Secuenciación y tratamiento de datos. Se extrajo ARN de todos los estadios del ciclo de vida y se secuenció en la plataforma Illumina HiSeq 2500. Los datos crudos fueron procesados con el programa FastQCtoolkit (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) y se ensambló de *nov*o el transcriptoma usando la herramienta Trinity (Grabherr *et al.*, 2011). La representatividad de los genes codificantes se analizó por el perfil CEG (*Core Eukaryotic Genome*) y BUSCO (*Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs*) y los principales genes que actúan durante la embriogénesis se identificaron de acuerdo a Lavore *et al.* (2015).

RESULTADOS

Usando tinción fluorescente para ADN, se determinaron los tiempos del desarrollo embrionario a 25°C correlacionándolos con el momento embriológico: a las 12 horas post puesta (hpp) se identificaron las divisiones celulares iniciales; a 18 hpp los núcleos migran hacia la periferia para formar el blastodermo sincicia; a 24 hpp parte de las células del blastodermo migran hacia la región posterior del embrión y forman la banda germinal inicial; entre 48-72 hpp, se inicia la extensión de la banda germinal y formación de segmentos, proceso que se completa a las 96-120 hpp al tiempo que se forman los apéndices. A partir de las 120 hpp se inicia el proceso de katarépsis, se completa la morfogénesis y la eclosión.

Se estableció un sistema de alimentación artificial de adultos de *D. maidis* con solución coloreada de sacarosa en un tubo plástico cubierto con una tela de poro cerrado y una gota de alimento entre dos membranas de Parafilm™. Luego de varias horas, se observó la presencia de colorante en todo el insecto, indicando su distribución por todo el organismo a través de la hemolinfa. Este análisis

constituye la base operativa de la búsqueda de los genes que interfieren la fertilidad y la viabilidad de los huevos (revisado en Huvenne y Smagghe, 2010).

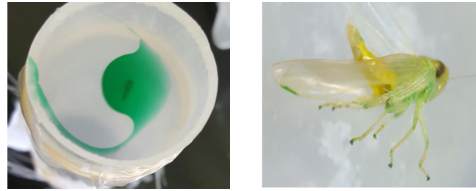


Figura 1. Resultado de la alimentación artificial en *D. maidis*
A. Sistema de provisión de alimento coloreado
B. Ejemplar mostrando la distribución de colorante en todo su cuerpo, evidencia de que la alimentación fue exitosa

Se obtuvo el transcriptoma de *D. maidis* a partir de RNA total de huevos, ninfa I, II, III, IV, V y adultos de ambos sexos. La secuenciación en sistema *pair end* de 150 nucleótidos proveyó 120 GB de datos crudos (531.787.990 reads). Cada set de datos fue evaluado para ver la calidad de los mismos, se realizó la limpieza por calidad y se eliminaron secuencias adaptadoras. Un resumen se muestra en la Tabla 1.

Muestra	Reads crudos single end	Reads crudos pair end	Reads limpios	Reads descartados	Porcentaje de sucios
Huevos	22284008	44568016	44524448	43568	0.000977562
Ninfa I	22396126	44792252	44744894	47358	0.0010572811
Ninfa II	27452721	54905442	54839252	66190	0.0012055271
Ninfa III	19758883	39517766	39477260	40506	0.0010250073
Ninfa IV	53312222	106624444	106517148	107296	0.0010062983
Ninfa V	29986327	59972654	59903972	68682	0.001145222
Adultos 1	29126328	58252656	58146958	105698	0.0018144752
Adultos 2	61577380	123154760	123005670	149090	0.0012105906
Total	265893995	531787990	531159602	628388	

Tabla 1. Análisis de las muestras secuenciadas, previo al ensamble. Se indica el número de lecturas (reads) de cada estadio y el número efectivo de lecturas limpias a ensamblar

A partir de estos datos se ensambló de *ново* el transcriptoma usando el software Trinity, obteniéndose valores dentro de lo esperado para una buena secuenciación. La estimación de la cobertura de la secuenciación se determinó en no menos del 90%, alcanzando el 100% en la mayoría de los estadios. Esto indica que se cuenta con una buena cobertura de secuenciación, lo que asegura el éxito en la búsqueda de distintas familias génicas (Figura 2).

Con el transcriptoma embrionario ensamblado y con buena cobertura se procedió a la identificación de genes involucrados en distintos procesos embrionarios y en la oogénesis. Se utilizó una base de datos correspondiente a *Drosophila melanogaster* (Lavore *et al.*, 2015) y se determinó la conservación de la mayoría de ellos en el transcriptoma embrionario de *D. maidis* (Figura 3).

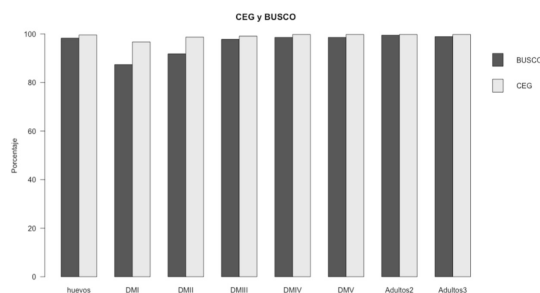


Figura 2. Cobertura de los transcriptomas correspondientes a los distintos estadios del ciclo de vida analizados. DMI - DMV, ninfas I a V. Adultos 2 y 3 corresponden a dos muestras independientes de ARN de adultos

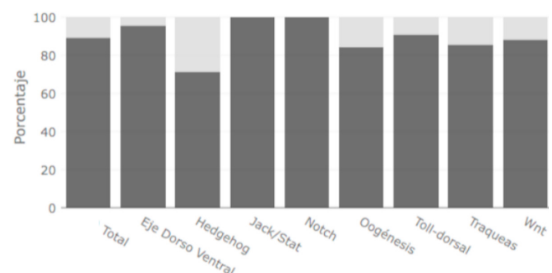


Figura 3. Conservación de diferentes componentes de vías de señalización de procesos embrionarios y oogénesis en el transcriptoma embrionario de *D. maidis*. Los genes identificados se indican en el texto

Un listado parcial de los genes encontrados por similitud y con posible efecto en la formación del huevo o un embrión viable por sus múltiples efectos durante el desarrollo es:

Oogénesis, Bazooka, Bicaudal D, Bicaudal C, Egalitarian, Egghead, Exuperantia, Cappuccino, Cornichon, Tudor, Pointed, Singed, Staufén, Mago Nashi, Pumilio, Vasa. **Toll-dorsal pathways**: Toll, Dorsal, Pelle, Spätzle, Pipe, Gastrulation defective, Nudel, Windbeutel, Tollo, Relish, Short Gastrulation, Twisted gastrulation, Tollid, Rhomboid, Punt, Medea, Easter. **Vías Notch, Wingless y Hedgehog**: Notch, Delta, Serrate, Suppressor of Hairless, Groucho, Kuzbanian, Neuralized, Deltex, Presenilin, Hedgehog, Smoothened, Fused, Suppressor of Fused, Cubitus interruptus, Wingless, Frizzled, Dishevelled, Armadillo, Shavenbaby, Decapentaplegic, Pangolin, Shaggy, Nemo, Notum, Axin. **Vías JAK/STAT**: Hopscotch, STAT protein at 92E, Suppressor of variegation 3-9, Suppressor of variegation 205, Ken and barbie, Sex lethal. **Desarrollo traqueal**: Trachealess, Branchless, Spalt Ventral veins lacking, Thickveins, HIF prolyl hydroxylase, Tango, Pointed, Stumps, Similar, Von hippel lindau, Sprouty, Tramtrack, Dumpy, Escargot, Ribbon, Grainy head.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se determinó el tiempo de la embriogénesis de *D. maidis* y se completó el transcriptoma de distintos estadios del ciclo de vida. Se identificaron genes de desarrollo y se desarrolló un sistema de alimentación in vitro. A partir de la información obtenida, se realizarán las pruebas de ARNi en laboratorio y un estudio comprensivo de distintos genes interfirientes, para lograr en el mediano plazo, el diseño de plantas transgénicas que puedan afectar la capacidad reproductiva del vector.

BIBLIOGRAFÍA

- BAUM, J.A., BOGAERT, T., CLINTON, W., HECK, G. R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; *et al.* 2007. Nat Biotechnol 25: 1322–1326.
- CARPANE P.; MELCHER U.; WAYADANDE A.; DE LA PAZ GIMENEZ PECCI M.; LAGUNA G.; DOLEZAL W.; FLETCHER J. 2013. Phytopathology. 103:129-134.
- EYHÉRABIDE, G. 2007. MAIZAR (<http://www.maizar.org.ar/vertext.php?id=235>).
- EYHÉRABIDE, G.; GIORDA, L.; LIVORE, A.; NISI, J.; TOMASO, J. 2009. INTA, Programa Nacional de Cereales, PMP 2009-2011. Documento Base.
- GHIDA DAZA, C. 2012. Informe de Actualización Técnica N° 24. EEA INTA Marcos Juárez.
- GHIDA DAZA, C. 2013. Informe de Actualización Técnica. EEA INTA Marcos Juárez.
- HIDALGO, H.; JEFFERS, D.; CASTAÑÓN, G.; RODRÍGUEZ, F. 1998. Agronomía Mesoamericana 9: 119–124.
- HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. 2010. J. Insect Physiol. 56(3), 227–235.
- INTA informa. INTA informa Año X- # 118. Septiembre 2011.
- INTA noticias. (<http://inta.gob.ar/noticias/cuando-muera-la-ultima-abeja>). 24 de julio de 2012.
- LAVORE, A.; PASCUAL, A.; SALINAS, F.; ESPONDA-BEHRENS, N.; MARTINEZ BARNETCHE, J.; RODRIGUEZ, M.; RIVERA POMAR, R. 2015. Insect Biochem. Mol. Biol. doi: 10.1016/j.ibmb.2015.06.012.
- OZBEK, E.; MILLER, S. A., MEULIA, T. & HOGENHOUT, S. A. 2003. J. Invertebrate Pathol. 82, 167–175.
- REMES-LENICOV, A. M. M., VIRLA, E. 1993. Neotropica 39 (101-102):103-109.
- SCHULZ, M. H.; ZERBINO, D. R.; VINGRON, M., BIRNEY, E. 2012. Bioinformatics. 28 (8): 1086–1092.
- VIRLA, E.; REMES-LENICOV, A. M. M., PARADELL, S. 1990. Rev. Fac. Agronomía. Tomos 66/67.
- VIRLA, E.; PARADELL, S.; DIEZ, E. P. 2003. Bol.San.Veg. Plagas 29:17-25.
- WHYARD, S.; SINGH, A. D.; & WONG, S. 2009. Insect Biochem. Mol. Biol. 39(11), 824–832.
- ZERBINO, D. R., BIRNEY, E., 2008. GenomeRes. 18, 821–9.