



Endosimbiontes obligados (*yeast-like symbionts*) del vector *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera: Delphacidae). Cultivo e identificación

Brentassi M.E ¹; Toledo A ²; Medina R ²; de la Fuente D ¹; Franco E ²; Balatti P ²

1. División Entomología. Fac. Cs Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata (UNLP).
2. Centro de Investigaciones en Fitopatología (CIDEFI). Fac. Cs Agrarias y Forestales (UNLP-CICPBA).

Financiamiento

“Estudios biológicos y moleculares de los endosimbiontes obligados asociados a hemípteros delfácidos y cicadélidos de importancia fitosanitaria para el agroecosistema maíz en Argentina”

1- Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (PICT).

2- Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

3- Comisión Investigaciones Científicas, Provincia de Buenos Aires (CICBA).



Orden Hemiptera

Fulgoromorpha

Familia Delphacidae (*planthoppers*) “Chicharritas”

Arroz



Maíz



Insectos sucto-picadores



Savia del floema



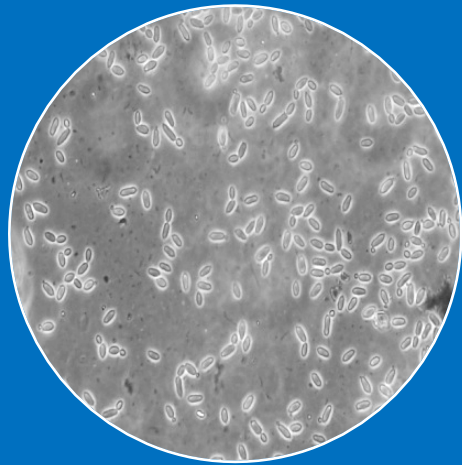
Dietas deficientes



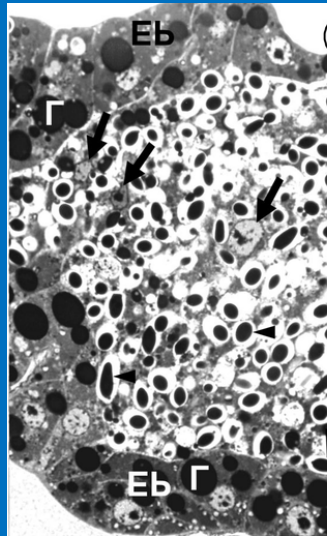
Relaciones mutualistas (hongos y bacterias)

Planthoppers – endosimbiontes obligados

Yeast-like symbionts (YLS)

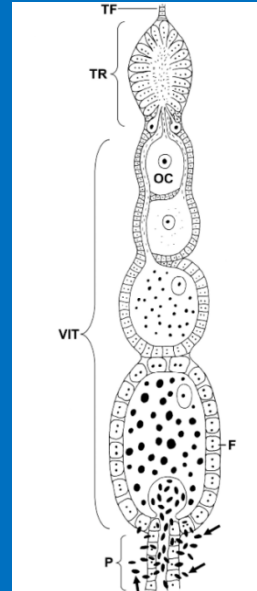


Aspecto levaduriforme
(10-12 μm)



Cuerpo graso

Transmisión transovarial



Michalik et al 2009

- Ascomycota
(Clase Pyrenomycetes)
Ejs: *Candida* sp; *Pichia* sp.
- Basidiomycota
Ej: *Cryp*-like symbionts

Funciones

- Proveen de aminoácidos esenciales
- Metabolismo del N y del esterol
- Desarrollo embrionario

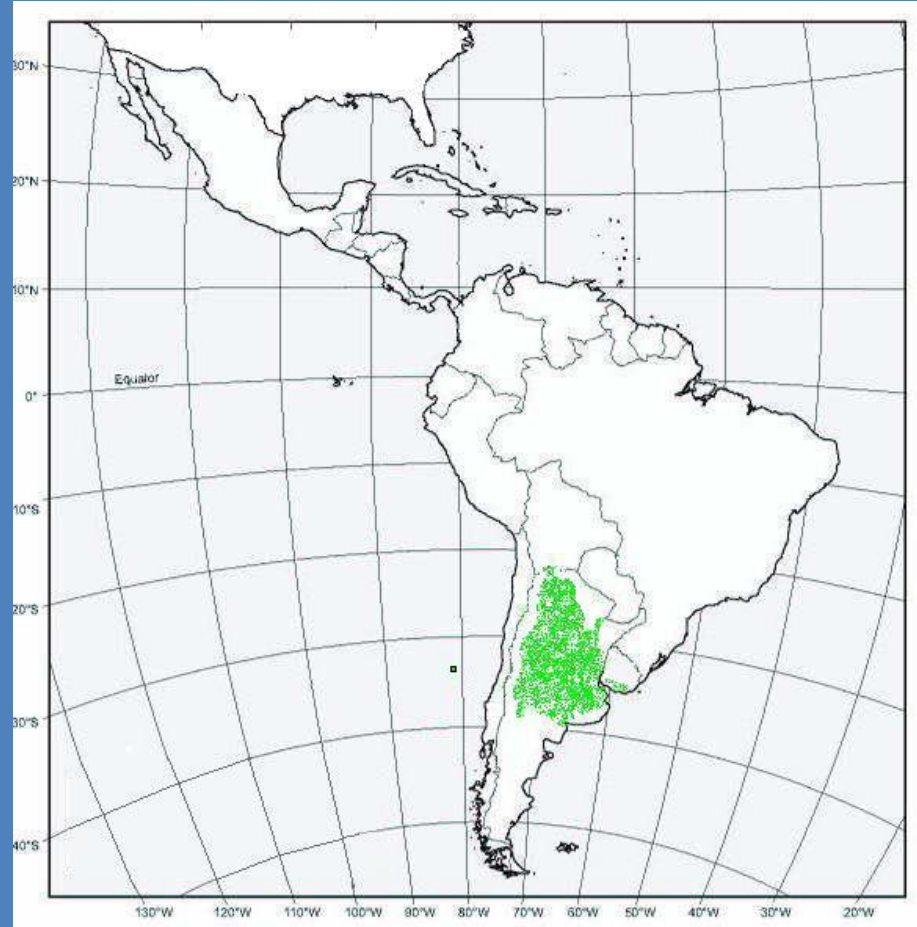


Consideración en el manejo integrado de estas plagas!

Delphacodes kuscheli Fennah



Distribución: Isla Juan Fernández (Chile), Centro y Norte de Argentina, Sur de Uruguay (Remes Lenicov *et al.* 1985; Ornaghi *et al.* 1999).



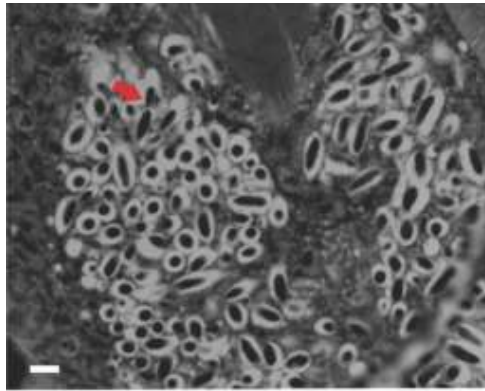
Plantas huésped: gramíneas cultivadas y cebada, centeno, maíz, sorgo granífero, *Cynodon sp.*, *Bromus sp.*

Patógeno: *Virus del Mal de Río Cuarto de* (Remes Lenicov *et al.* 1985)

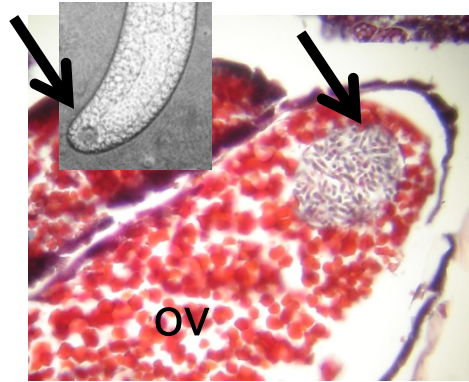
Fuente: Giménez Pecci *et al.* 2012

Estudios previos

- ✓ Alimentador del floema (Brentassi, 2004)
- ✓ Identificación de endosimbiontes levaduriformes *yeast-like symbionts* (Brentassi *et al.* 2014)

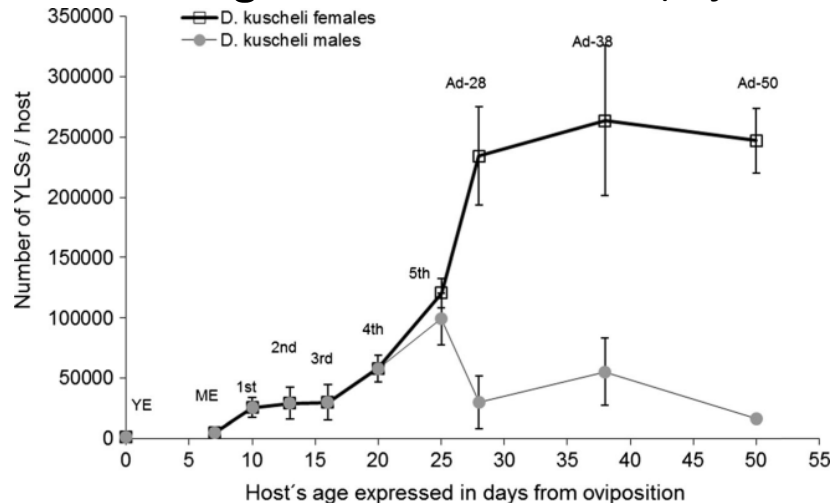


Cuerpo graso



Polo posterior de ovocito primario

- ✓ Cuantificación de YLS a lo largo del ciclo de vida (Liljeström & Brentassi 2016)



A microscopic image showing numerous yeast-like endosymbionts. The organisms are small, oval-shaped, and appear to be budding or dividing. They are distributed across the field of view, with some appearing in pairs or small clusters. The background is a light blue, slightly textured surface.

Objetivo

Aislar a los endosimbiontes (del tipo yeast-like) cultivables *in vitro* e identificarlos en base a sus características morfológicas y a secuencias de su genoma.

Materiales y Métodos



Cría del vector en laboratorio



Posturas endofíticas



Huevos

Siembra en placas de Petri

Macerado

Esterilización (Alcohol 70°
e hipoclorito de sodio al 0.5 %)

**Medios
de cultivo
utilizados**

(cloranfenicol
250 mg/l)

1- SDAY 1% (Sabouraud dextrosa agar -1% extracto de levaduras)

2- AEM 2% (Agar extracto de malta 2%)

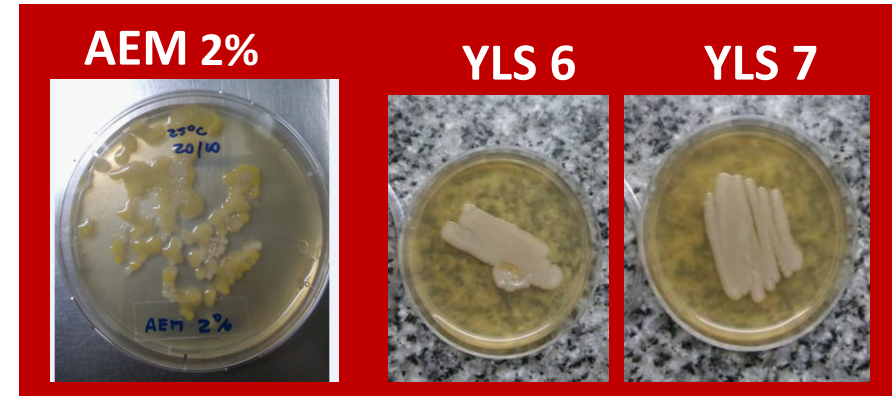
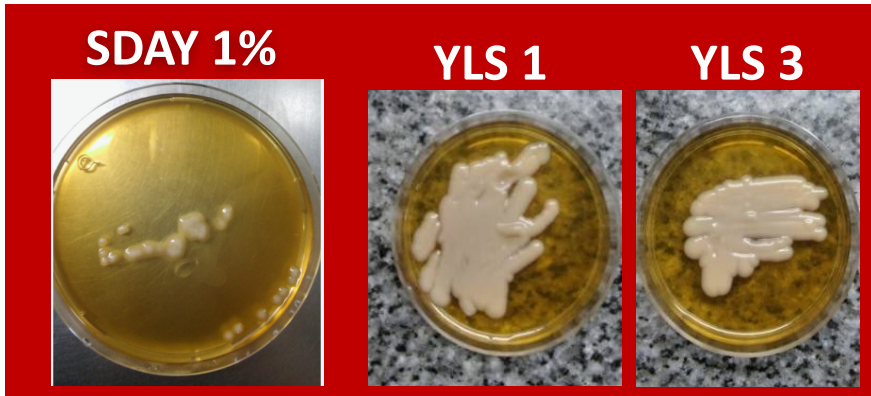
3- AS amaranto 4% (Agar sacarosa - 4% de harina de amaranto)

4- AS chía 4% (Agar sacarosa - 4% de harina de chía)

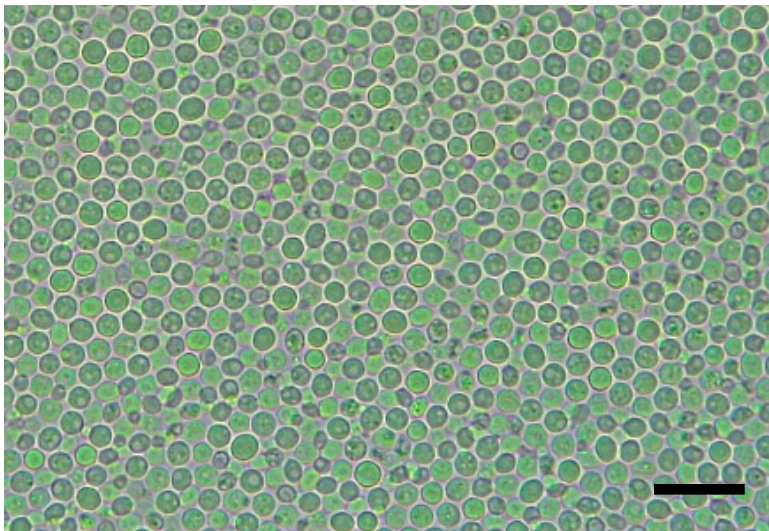
Resultados

Desarrollo de colonias

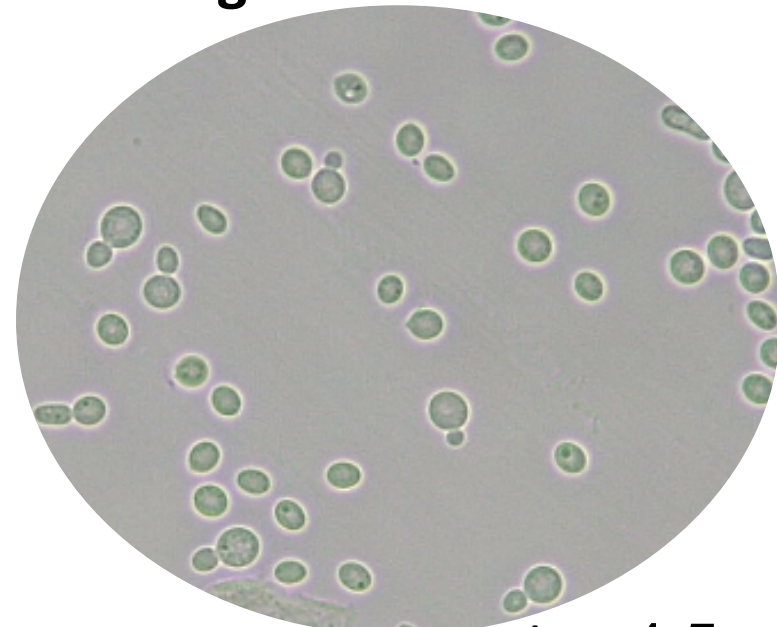
Incubación: 4 días - 25 °C



➤ Caracterización morfológica



Forma: globosas - elongadas



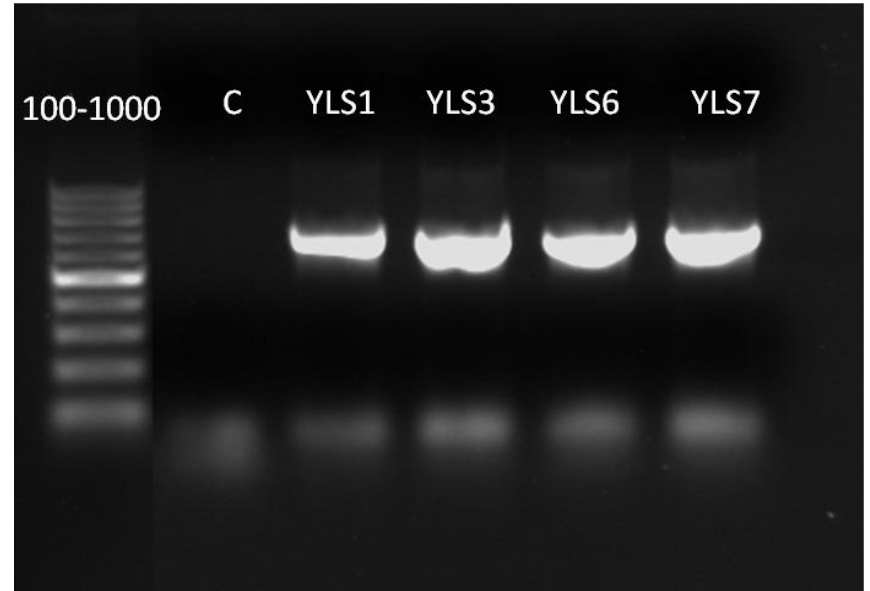
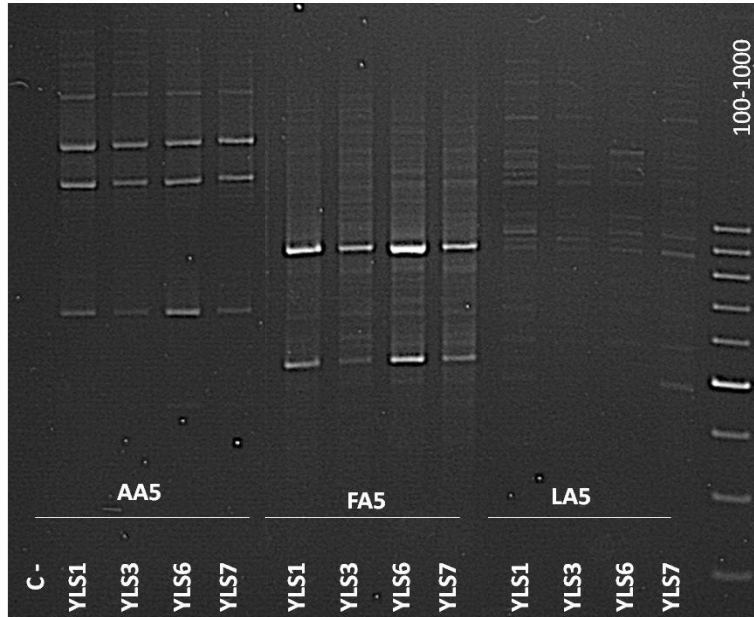
Largo: 5 μm ; Ancho: 4.5 μm

➤ Caracterización molecular

1- Amplificación de ISSR
(Inter Simple Sequence Repeat)



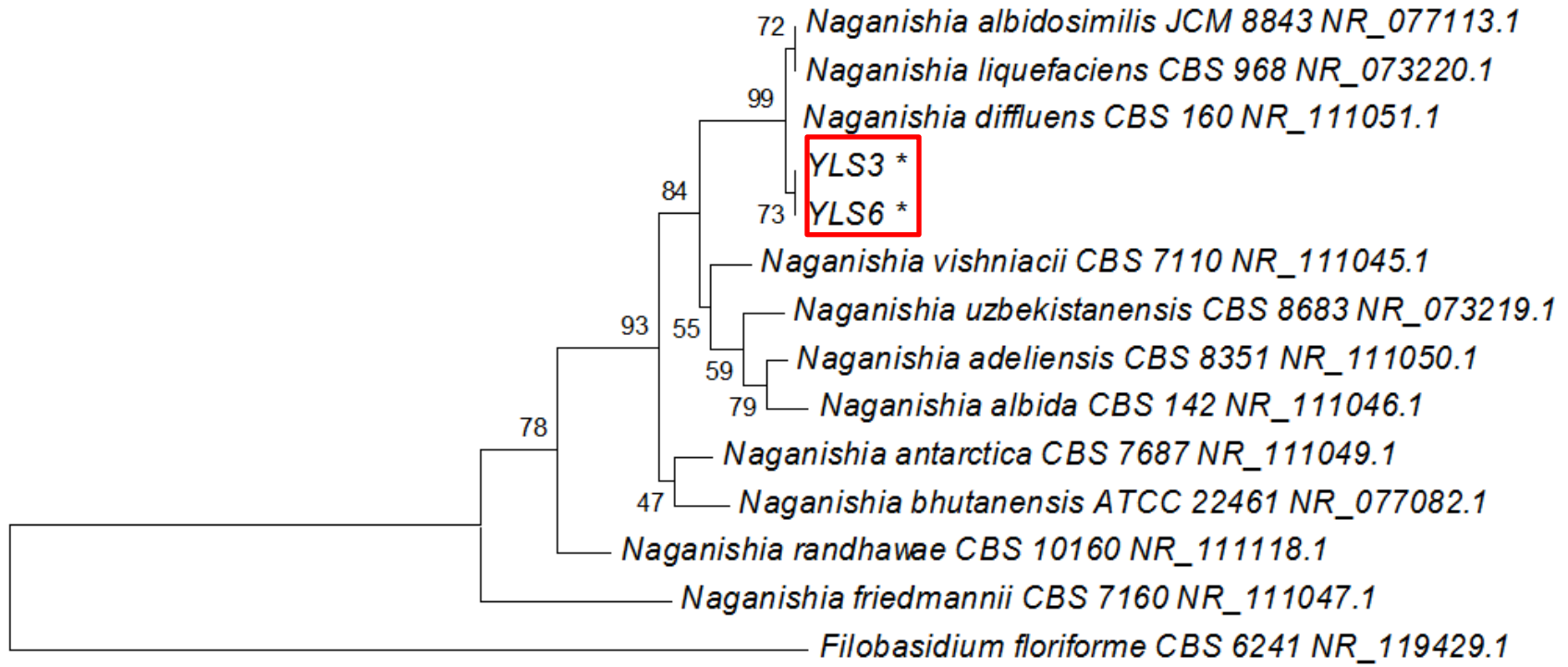
2 - Amplificación de ITS
ITS 5 (F) e ITS 4 (R) (White 1990)



Primer (5' a 3')	Temp. annealing
AA5: GAG (AAG) ₅	48° C
FA5: TAC (GA) ₈	53° C
LA5: CAG (AAC) ₅	53° C

3 - Secuenciación (YL3 e YL6)
(560pb) *Macrogen*

Árbol filogenético-Máxima verosimilitud



0.02

**Identidad: *Naganishia* sp (*Cryptococcus*)
(Basidiomycota: Tremellomycetes)**

Conclusiones

- Se logró cultivar e identificar por primera vez a un endosimbionte del tipo YLS aislado a partir de *D. kuscheli*.
- El género ***Cryptococcus*** fue mencionado en defécidos plagas del arroz (Dong *et al.* 2011) y en otros hemípteros Coccoidea con su mención en la participación del metabolismo del ácido úrico (Ponce de León *et al.* 2016).

Cuestiones a elucidar y futuros pasos.....

- Corroborar la presencia de YLS en adultos y ninfas.
- Probar otros medios y condiciones de cultivo a fin de lograr el aislamiento de otras especies de YLS.
- Estudiar la diversidad de YLS mediante estudios metagenómicos.



Muchas gracias por su atención!!