

Genómica Funcional para el estudio de la Interacción Planta-Insecto, Yuca, *Manihot esculenta* Crantz: Mosca Blanca, *Aleurotrachelus socialis*, Bondar (Hemiptera: Aleyrodidae)



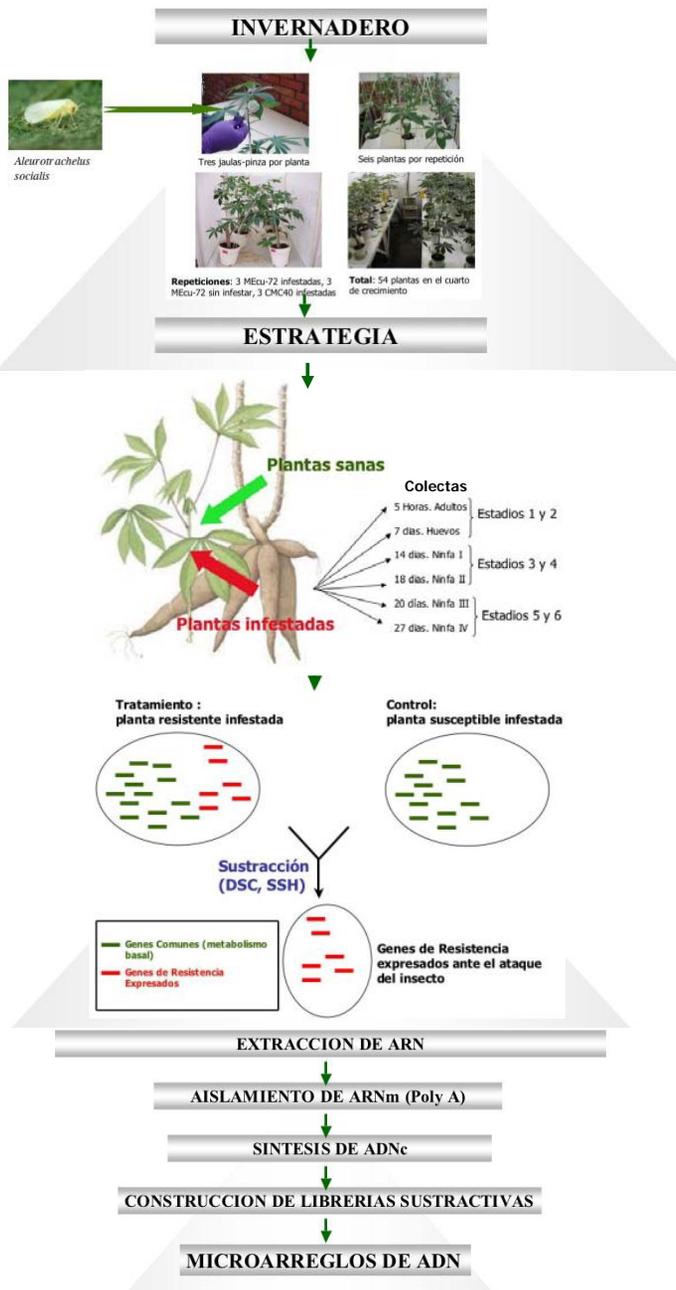
Bohorquez, Adriana¹, Arias, Bernardo¹, Bellotti, Anthony C.¹ y Tohme, Joe¹.
¹CIAT, Agrobiodiversity and Biotechnology Project, AA6713, Cali, Colombia



INTRODUCCION

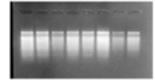
Las moscas blancas causan severos daños en los agroecosistemas de yuca en las Américas, África y Asia, tanto por alimentación directa, como por ser vector de virus. En yuca la especie más importante que causa daño por alimentación directa en Colombia, Venezuela y Ecuador es *Aleurotrachelus socialis*, la cual causa pérdidas económicas entre un 70 a un 80%. La mosca blanca es un insecto chupador que basa su alimentación exclusivamente de floema. En yuca, una de las más importantes fuentes de resistencia a *A. socialis*, es el genotipo MEcu-72, el cual alarga el ciclo de vida del insecto y produce alta mortalidad en ninfas. En este contexto la Genómica Funcional es una herramienta útil para descubrir eficientemente los elementos genéticos subyacentes a los caracteres polimórficos relacionados con la resistencia en genotipos como MEcu-72. Herramientas como las librerías sustractivas y los Microarreglos de ADN nos permitirían obtener un primer acercamiento y entendimiento de las bases moleculares de la respuesta de defensa de yuca al ataque de Mosca Blanca, y nos ayudaría a entender los mecanismos de defensa hacia otras importantes plagas y enfermedades. El objetivo de este trabajo es obtener las secuencias diferencialmente expresadas durante el ataque del insecto y realizar un análisis global de transcritos en la interacción yuca- mosca blanca.

METODOLOGIA

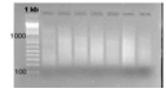


RESULTADOS Y DISCUSION

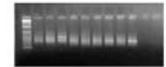
Extracción de ARN: La extracción del ARN a partir de hojas de los materiales colectados en los diferentes tiempos, se realizó con el *SV™ Total RNA Isolation System (Promega)* y con el método de Cloruro de Litio.



Aislamiento de ARN mensajero (ARNm) y síntesis de ADN complementario (ADNc). El aislamiento del ARNm se realizó con el *Oligotex mRNA Spin-Column®* de Qiagen. Para la síntesis del ADNc se utilizó el *Smart™ PCR cDNA Synthesis kit* de Clontech



Obtención de Amplicones: para la metodología de sustracción según Luo et al (1999) es necesario digerir el ADNc obtenido a partir de conglomerados de las repeticiones de cada uno de los tiempos. Luego le son ligados adaptadores y posteriormente amplificados para obtener los amplicones que serán utilizados en la hibridación sustractiva.



Hibridación Sustractiva: los amplicones fueron hibridados según las comparaciones mostradas en la tabla 1. Se realizaron tres rondas de hibridación para cada comparación. En la figura A señaladas por flechas se observan bandas correspondientes a transcritos expresados únicamente en estadios tempranos (1 y 2 adulto y huevo) y únicas en estadios tardíos (3 y 4, 5 y 6, estados ninfales). Según algunos autores (Walling, 2000, Kempema et al, 2007) la mayoría de transcritos relacionados con defensa se expresan en estadios tardíos de la mosca blanca, cuando esta se encuentra en estos estadios ninfa III y ninfa IV, donde lleva alimentándose sobre la planta más de 20 días. Estas bandas fueron aisladas del gel y clonadas. También se clonó la tercera ronda de hibridación de cada comparación, utilizando el vector *pGEM-T easy* (Promega), se transformó en células competentes de la cepa DH5a de *E. coli*. Estas crecieron en medio SOC y fueron plaqueadas en medio LB + ampicilina + X-Gal + IPTG. Se picaron las colonias blancas y se obtuvieron las librerías sustractivas (Tabla 1). Para verificar los tamaños de los insertos (menos de 800 pb) se realizó PCR de algunos clones escogidos al azar de las librerías, mostrados en la figura B.

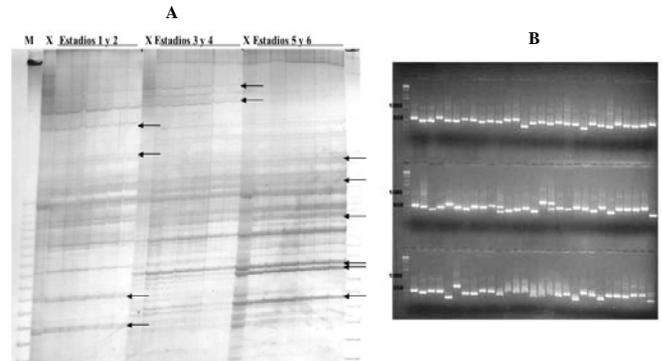


Tabla 1: resumen de las comparaciones hechas con dos variedades de yuca infestadas y no infestadas con *A. socialis*, y número de clones obtenidos para cada librería.

Varietal	Condición	Comparación para la Librería Sustractiva	Tiempos de Colecta	No. de clones por Librería Sustractiva
MEcu-72	Resistente alta Antibiosis + Antixenosis	Infestada vs. Sin Infestar	1 y 2	768
			3 y 4	768
			5 y 6	768
CMC40	Susceptible	Resistente Infestada vs. Susceptible sin Infestar	1 y 2	768
			3 y 4	768
			5 y 6	768

TRABAJO EN CURSO

- PCR de los clones de las librerías
- Secuenciación de algunos clones para verificar la redundancia de la librería.
- “Spotting” de la librería amplificada por PCR en los poly-L-lysine slides utilizando el arrayer SPI-BIO de Hitachi.
- Hibridación de las librerías sustractivas “spotted” con ARN de cada tiempo de colecta, utilizando los colorantes Cye3 y Cye5 (Amersham) para testigo y tratamiento respectivamente.
- Análisis de microarreglos.
- Secuenciación y análisis bioinformático de los clones diferencialmente expresados.
- Verificación de los genes candidatos utilizando Real-Time PCR.