

Descifrando la resistencia a mosca blanca en yuca (*Manihot esculenta*)

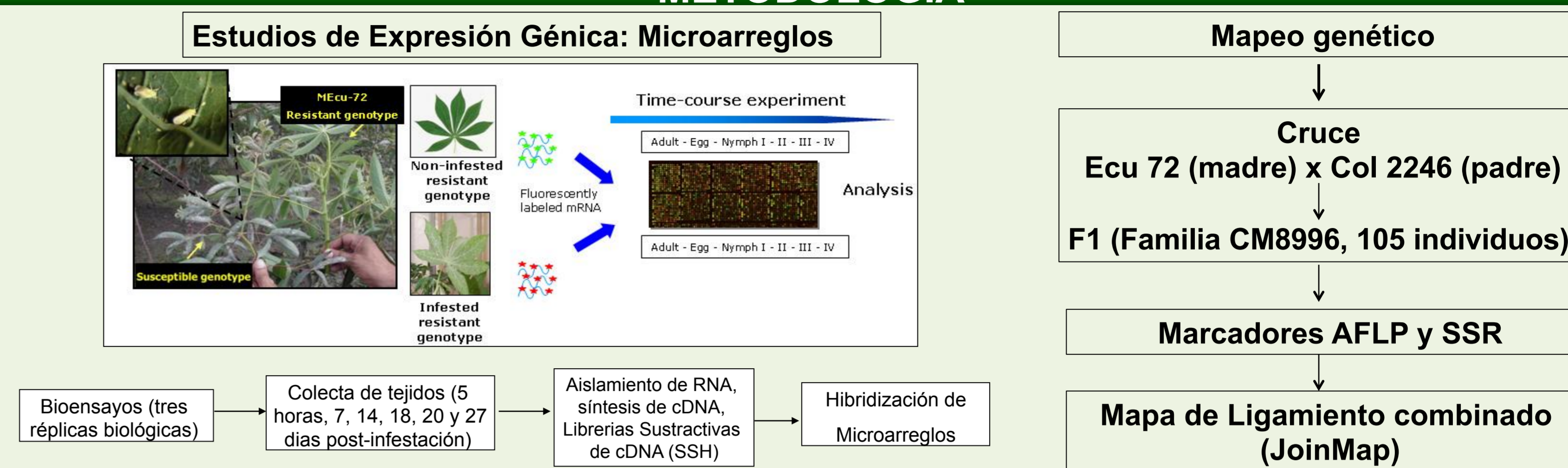
Bohorquez, Adriana¹, Becerra Lopez-Lavalle, Luis¹, Bellotti, Anthony C. y Joe Tohme, J.

¹CIAT, Agrobiodiversity and Biotechnology Project, AA6713, Cali, Colombia

INTRODUCCION

Las moscas blancas son el mayor estrés biótico que amenaza la sostenibilidad de cultivos básicos, incluyendo la yuca, causando daño directo por alimentación pudiendo arrasar un cultivo entero de yuca. Once especies de mosca blanca son plagas importantes en yuca, siendo las más importantes *Aleurotrachelus socialis* (LAC) y *Bemisia tabaci* (Africa). Generalmente, las fuentes naturales de resistencia a mosca blanca son muy raras o inexistentes; sin embargo, en el género *Manihot*, tanto silvestres (*M. flabellifolia*) como cultivadas (*M. esculenta* Mecu72 y MPer415) la yuca despliega resistencia a *A. socialis*, tanto en invernadero como en campo. Sobre las variedades de yuca resistentes, *A. socialis* tiene bajas oviposiciones, establece pocos sitios de alimentación, hay retraso en el desarrollo de las ninfas e incremento en la mortalidad. Varios enfoques han sido propuestos para descifrar los mecanismos genéticos de la resistencia a mosca blanca, entre estos, perfiles de expresión génica utilizando Microarreglos, librerías sustractivas, mapeo genético y análisis de QTL's. El objetivo fue capturar los genes que están diferencialmente inducidos durante el ataque de la mosca blanca. Para esto se utilizó la tecnología de Microarreglos y librerías sustractivas de plantas resistentes y susceptibles infestadas y no infestadas con mosca blanca y el Cassava Unigene Microarray (Lopez et al, 2004). También se construyó un mapa de ligamiento genético de un cruzamiento entre la variedad Resistente y una variedad susceptible a *A. socialis*, utilizando marcadores AFLP y SSR.

METODOLOGIA



RESULTADOS

Estudios de Expresión Génica: En este estudio, cambios en el perfil del transcriptoma de la yuca, fueron examinados a través del ciclo de vida de *A. socialis*, en respuesta a estadios ninfales y adultos. El software *Significant Analysis of Microarray (SAM)* identificó 550 genes como significativamente regulados en los seis tiempos de colecta y en las dos comparaciones (resistente infestado vs resistente no infestado y resistente infestado vs susceptible infestado), de los cuales 310 fueron inducidos y 240 reprimidos. Categorías funcionales fueron definidas utilizando el esquema de clasificación de GO. De función desconocida, sin resultados o "expressed proteins" correspondieron al 21% de las secuencias encontradas. GO identificó genes envueltos en respuesta de Defensa, modificación de pared celular, estrés oxidativo, fotosíntesis, transporte celular, respuesta a estímulos, proteólisis, etc. (Fig. 1). Algunos de estos genes son parte de las vías de señalización reguladas por el ácido jasmónico (JA) y Etileno (ET), los cuales están implicados en la respuesta de defensa durante el ataque de patógenos y herbívoros a las plantas (Fig. 2). **Mapeo genético:** Un mapa base integrado a partir de dos mapas de ligamiento en el la familia CM8996 fue construido (Fig. 4). Para genotipificación se utilizaron marcadores dominantes AFLP (233) y marcadores codominantes SSR (150). Para mapear se utilizó el programa JoinMap y el multipoint-likelihood maximization. Todos los tipos de marcadores se corrieron primero en los parentales y los polimórficos se corrieron en la progenie, con el fin de identificar los más informativos. Los parentales se corrieron siempre junto a la progenie para obtener resultados reproducibles de los alelos parentales. La prueba de X-cuadrado integrada en el software JoinMap 4.0 fue utilizada para la evaluación de la discrepancia a partir de las proporciones de segregación esperadas en la progenie. Los marcadores que mostraron distorsión en la segregación a partir de las proporciones Mendelianas esperadas con una probabilidad más alta de $p = 0.0001$ fueron excluidos de los análisis. Los marcadores con proporciones que tenían probabilidades entre $p = 0.1$ y $p = 0.005$ fueron utilizados en el análisis pero con precaución. Los marcadores fueron clasificados dentro de diferentes clases de segregación dependiendo de los patrones alélicos de los parentales. En total, seis clases de marcadores fueron definidos, utilizando el esquema par Cross pollinator: (1) <lmxl>, (2) <nnxnp>, (3) <efxeg>, (4) <abxcd>, (5) <hkhk> y (6) <hkhk> (hh, k-). Los marcadores Dominantes (AFLP) pertenecían a la clase 6 mientras que los codominantes (SSR e EST) fueron incorporados en las clases 1 al 5. Las proporciones de segregación esperadas fueron 1:1 para las clase 1 y 2, 1:1:1:1 para las clases 3 y 4, 1:2:1 para la clase 5 y 1:3 para la clase 6. Se construyeron los mapas de cada parental y se combinaron utilizando la herramienta de JoinMap "Combine Group for Map Integration", teniendo en cuenta en cada alelo los marcadores de anclaje para formar el mapa concenso (Fig. 4). Nuestros resultados sugieren que la resistencia a mosca blanca es un rasgo complejo, en el cual más de una región génica esta involucrada. Esta Resistencia puede ser utilizada en mejoramiento molecular para acelerar el desarrollo de variedades de yuca resistentes a *A. socialis* con buenas características agronómicas útiles para los pequeños campesinos en Latinoamérica.

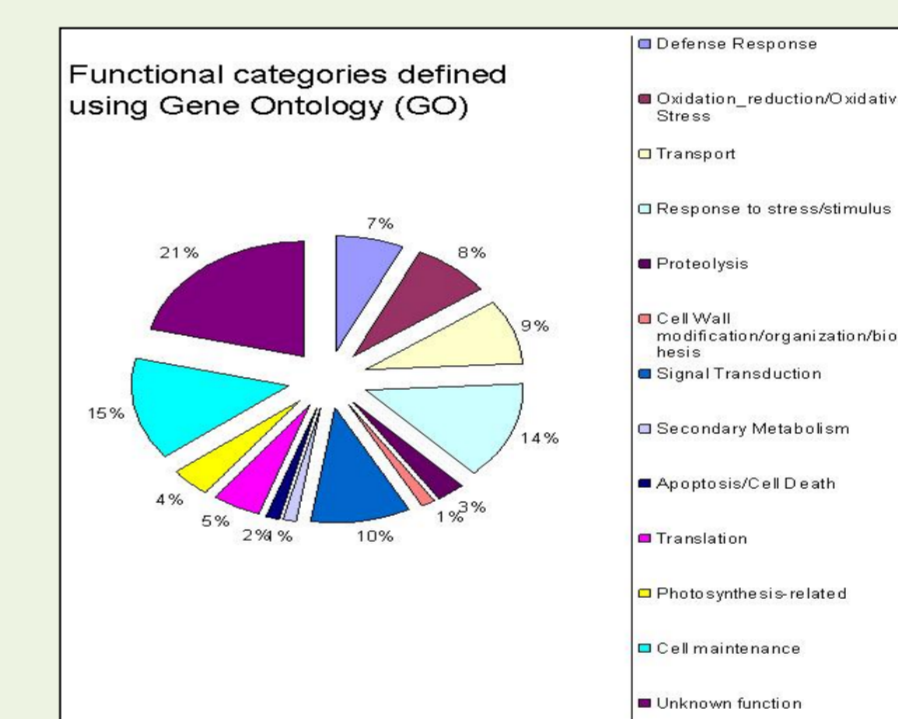
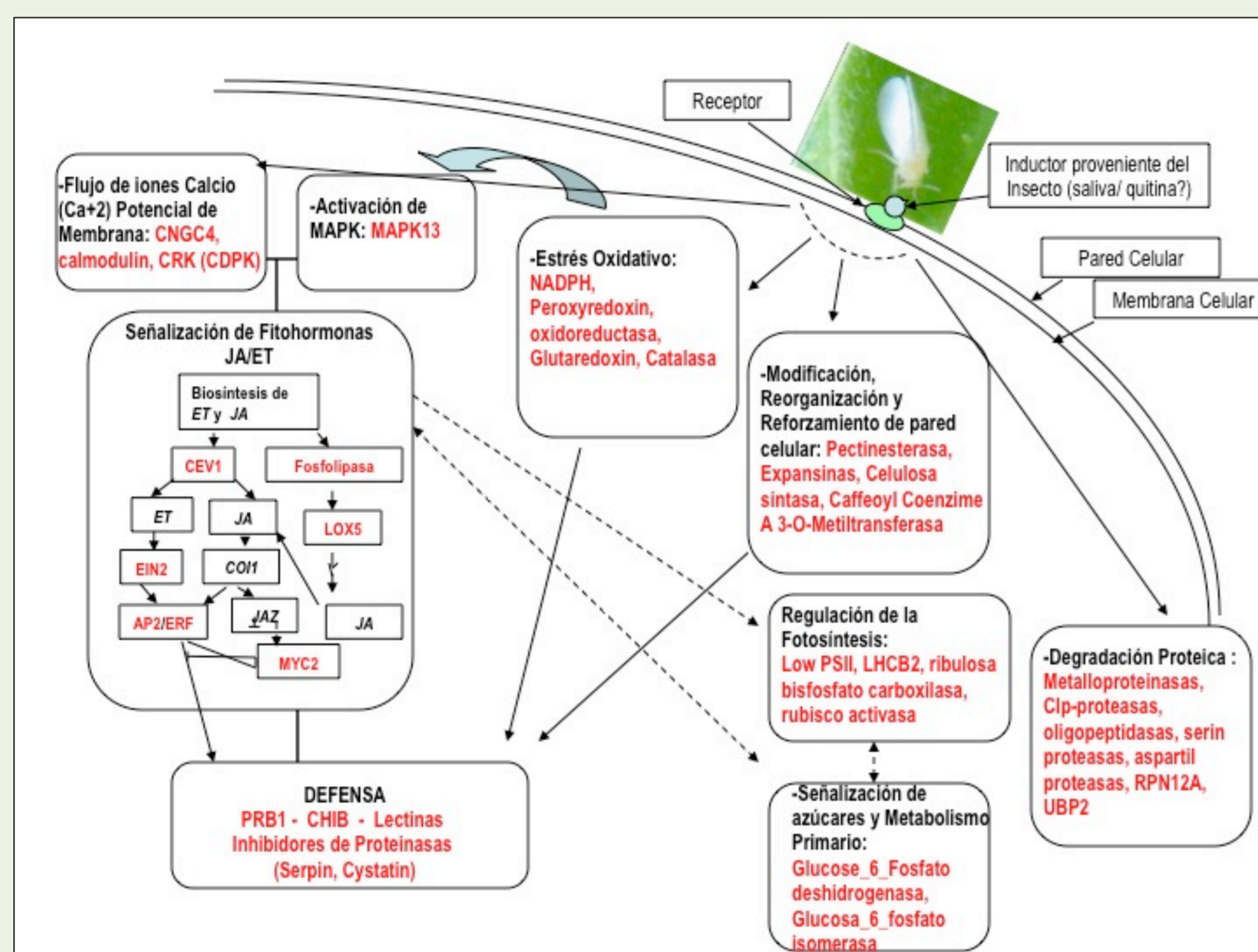


Figura 1: Categorías Funcionales de genes regulados durante la interacción yuca-mosca blanca, definidas utilizando Gene Ontology (GO). Las hibridaciones fueron hechas con el Cassava Unigene Microarray, 5000 unigenes.

Figura 4: Mapa de Ligamiento Integrado del cruce para Resistencia mosca Blanca entre Mecu-72 y MCol2246 utilizando marcadores SSRs y AFLPs.

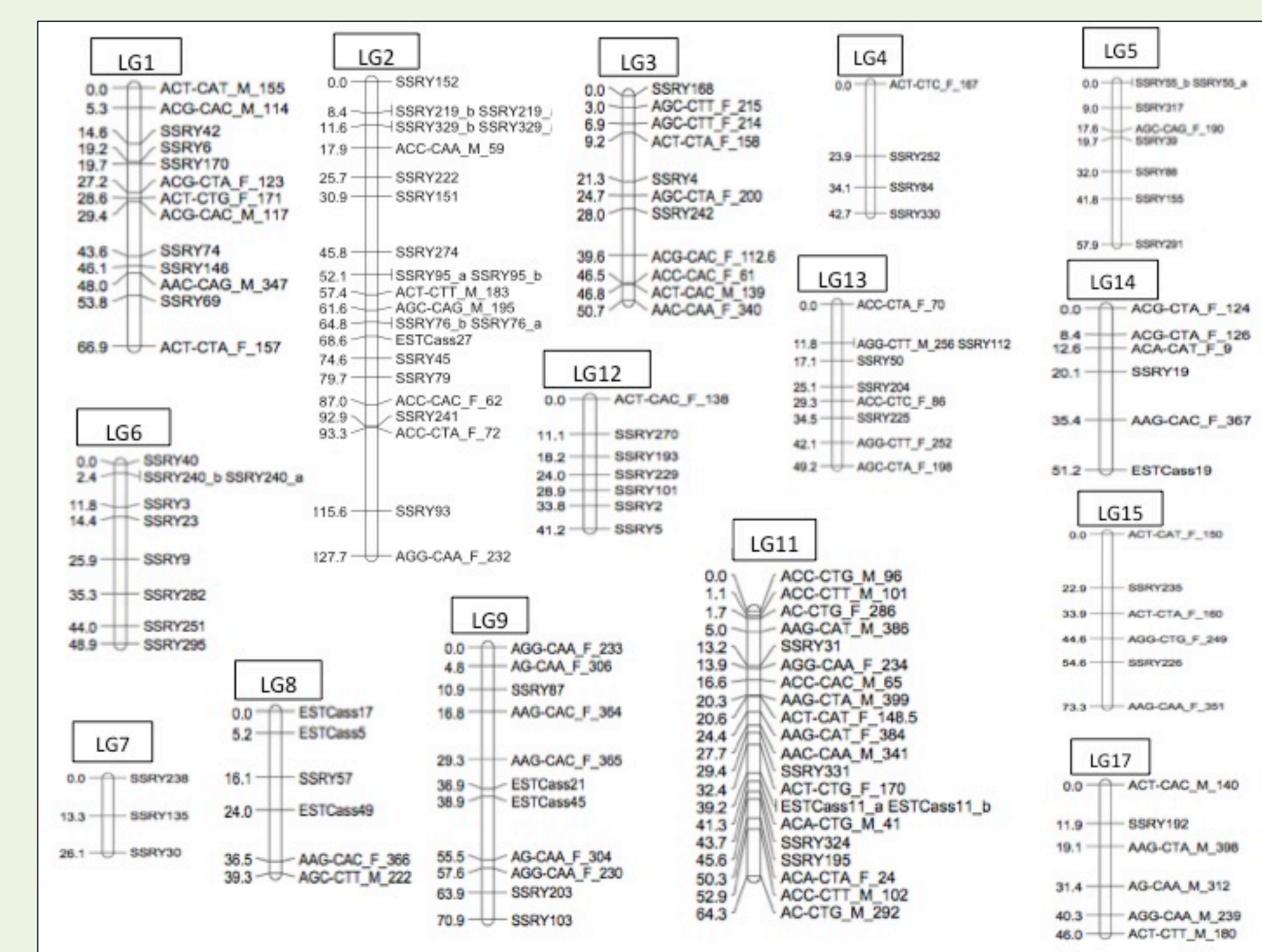


Figura 2: Representación gráfica del modelo hipotético de la respuesta de defensa disparada por el ataque de la mosca blanca *A. socialis*, cuando se alimenta sobre el genotipo de yuca Mecu 72. Este modelo esta basado en las secuencias aisladas en las librerías sustractivas y las secuencias diferencialmente expresadas en la hibridación con Microarreglos (Proteinas mostradas en rojo). Las flechas punteadas indican que la Fotosíntesis y el metabolismo primario son reprimidos.

- 1- Cuando *A. socialis* se alimenta sobre las hojas del genotipo Mecu 72, introduce su estilete y un inductor derivado del insecto es reconocido por un receptor de la planta. En el caso de la quitina, se ha comprobado que la familia de factores de transcripción (TF) *AP2/ERF* son inducidos por quitina.
- 2- El *TFAP2/ERF* también es inducido por la cascada de señalización que empieza con la despolarización de la membrana plasmática y el flujo de iones Ca²⁺, luego son activadas las cascadas de señalización de las MAPK y subsecuentemente ocurre la inducción de las vías metabólicas de las fitohormonas tales como JA/ET.
- 3- Los *TFAP2/ERF* son potenciales mediadores de la inducción sinérgica de los procesos entre JA y ET e inducen genes de defensa tales como las proteínas vacuolares básicas *PRB1*, *CHIB* (*PR-3*), así como también lectinas e inhibidores de proteasas. Análisis de RT-PCR mostró que RNAs de *PRB1* y *LOX5* son acumulados cuando *A. socialis* se alimenta sobre el genotipo Mecu 72 (Figura 3).
- 4- La respuesta de defensa es compleja y envuelve todos los procesos del metabolismo celular, algunos de los cuales en si mismos pueden ser mecanismos efectores que son controlados durante el ataque. Entre estos están la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS).
- 5- Modificación de pared celular, la cual podría dificultar la alimentación del insecto y también podría mediar la respuesta de defensa regulada por JA/ET, y finalmente la maquinaria de degradación proteica. Al mismo tiempo que estas respuesta se dan, la planta reprime su metabolismo primario y fotosíntesis, reasignando los recursos de N y C hacia la defensa de la planta.

	Resistant infested			Resistant non-infested			Susceptible infested		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
PRB1	+	+	+	-	-	-	-	-	-
LOX5	+	+	+	-	-	-	-	-	-
G3PDH	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Figura 3: Análisis de RT-PCR de RNA aislado de las variedades de yuca Ecu72 (Resistente) y CMC40 (susceptible). El RNA total fue extraído tanto hojas infestadas como no infestadas, en el tiempo 1 (adulto & huevo), tiempo 2 (ninfas I & II), y tiempo 3 (ninfas III & IV). Se observan los genes envueltos en defensa *PRB1* (*ATPRB1*) y *LOX5*. *G3PDH* (se utilizó como gen endógeno).

TRABAJO EN CURSO

- Análisis de QTL's para encontrar las regiones genómicas asociadas con la resistencia a mosca blanca.
- Genotipificación utilizando marcadores SNPs obtenidos a partir de secuenciación de ultima generación GBS (Genotyping by Sequencing).
- Validar datos de expresión génica utilizando RNA-seq.

BIBLIOGRAFIA