

“Estudio de nuevos genes candidatos para el control de plagas de insectos en plantas transgénicas de interés agro-biotecnológico.”

Rúffener, Sofía M.

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL-CONICET) - Laboratorio de Biología Molecular (LBM).

Ciencias Biológicas-Biotecnología

INTRODUCCIÓN:

El uso generalizado de insecticidas químicos como principal agente de control de plagas agrícolas ha llevado a la aparición de insectos resistentes, así como también ha causado efectos perjudiciales para la salud y el medio ambiente (Fitt GP. 1994; Gatehouse AM. et al. 1994; Gunning RV et al. 1991; Haq SK et al. 2004.). La generación de plantas transgénicas ha demostrado ser una de las principales y más prometedoras alternativas en el control de plagas que afectan a cultivos de interés comercial.

En este contexto, el presente proyecto de investigación pretende evaluar el uso de genes específicos de insectos, con potencial bioinsecticida, con el fin de obtener plantas resistentes y así mejorar la calidad y productividad de los cultivos de relevancia económica en la región (Haq SK et al. 2004; Lynch RE et al. 2003; Gassmann AJ et al. 2011; Tabashnik BE et al. 2008.). Evaluamos el posible uso del gen *eiger*, un gen proapoptótico específico de insectos. El mismo se identificó originalmente en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, y codifica una proteína transmembrana cuyo dominio extracelular puede ser secretado y funcionar como ligando sobre células distantes (Igaki, T. et al. 2002). *Eiger* está involucrado en diversos tipos de respuestas en insectos, incluyendo la activación de la respuesta inmune, procesos inflamatorios y la inducción de apoptosis ante diferentes tipos de estrés (Igaki, T. et al. 2009; Vidal, M. 2010.). Estas funciones de *eiger* dependen de su interacción con el receptor específico *Wengen* (Stevens J et al. 2012.). Tanto *eiger* como *wengen* son genes específicos de insectos y están ampliamente conservados en los géneros Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera y Diptera, los cuales constituyen las principales plagas para los cultivos de interés en la agricultura (Pardo-López L et al. 2013). Analizamos la expresión de *eiger* específicamente en células del intestino de larvas de *Drosophila*, ya que el mismo es un órgano blanco de particular interés debido a que las proteínas producidas por el transgen en los cultivos transgénicos se ingieren cuando las larvas se alimentan de las partes blandas de la planta. Por otra parte, estos genes no están presentes en plantas y animales superiores. Estas características convierten al gen bajo estudio en un candidato prometedor para su uso como agente bioinsecticida.

OBJETIVO:

El proyecto tiene como objetivo utilizar el gen *eiger* con el fin de desarrollar herramientas biotecnológicas que permitan obtener plantas resistentes al ataque de insectos y así mejorar la calidad y productividad de los cultivos de relevancia económica en la región. Particularmente, se pretende evaluar a partir de estudios de estructura-función diferentes versiones del gen *eiger* como potencial bioinsecticida utilizando *Drosophila melanogaster* como sistema modelo de insectos.

METODOLOGÍA Y RESULTADOS:

Generación de moscas transgénicas

Para generar moscas transgénicas que nos permitan sobre-exresar el gen *eiger* se clonó el fragmento de ADN del gen en el vector p-UAST. El mismo contiene las secuencias necesarias para su inserción en el genoma de *Drosophila* y un promotor inducible por el factor de transcripción Gal4. Una vez obtenido el vector pUAST-*eiger*, se utilizó un servicio comercial para la inyección de embriones de *Drosophila melanogaster*.

Estudio y caracterización de las líneas de moscas transgénicas obtenidas.

Una vez obtenidas las moscas transgénicas, en adelante moscas *UAS-eiger*, se procedió al estudio del efecto de sobre-exresar la proteína en diferentes tejidos.

Expresión del gen *eiger* en ojos de *Drosophila*: Se expresó *eiger* en el ojo de la mosca utilizando el sistema *Gal4-UAS* (Figura 1A). Para esto, se cruzaron moscas de la línea generada *UAS-eiger* con moscas de la línea *eyeless-Gal4* (*ey-Gal4*) cuya expresión se restringe al primordio de ojo de la mosca. Se analizó el fenotipo de ojos de la descendencia (genotipo *ey-Gal4/UAS-eiger*) crecidas a 25°C. Se utilizó como control la línea heterocigota *ey-Gal4/+*. Como se puede ver en las Figuras 2A y B, la expresión de *eiger* reduce el tamaño del ojo e induce una desorganización de la estructura normal del tejido, muy probablemente a partir de inducir muerte celular. Para confirmar el resultado, se utilizó una segunda línea de moscas que dirige la expresión de Gal4 al ojo bajo un promotor más fuerte (*gmr-Gal4*). La expresión de *eiger* bajo el control de *gmr-Gal4* produce un efecto tóxico (Figura 2C-D). En este caso, el efecto observado es más severo, consistente con una mayor expresión. Nuestros resultados muestran que la expresión de *eiger* es tóxica y produce daños severos al tejido que la expresa.

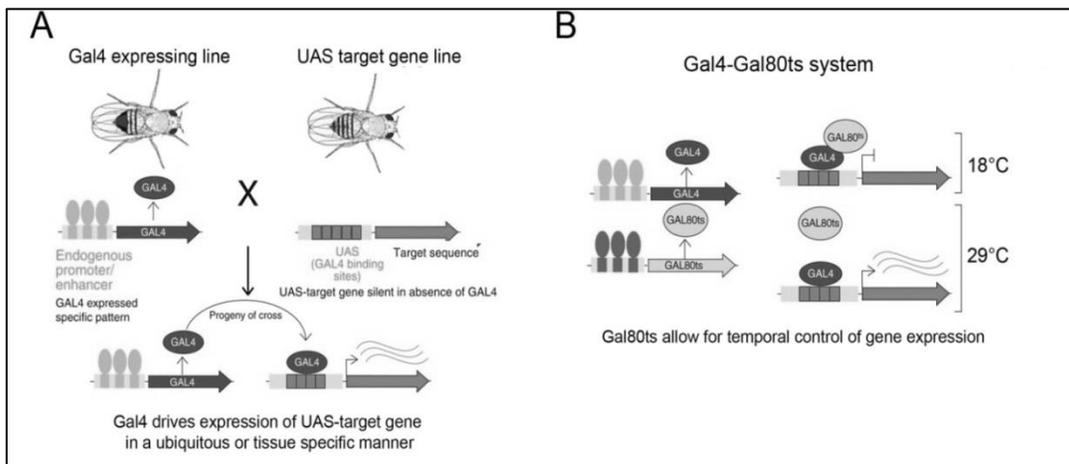


Figura 1. (A) Representación esquemática del sistema de expresión génica Gal4/UAS. El factor de transcripción Gal4 se expresa bajo el control de un promotor endógeno; el sitio de unión de Gal4 (UAS) controla la expresión de un gen de interés. (B) La expresión de una versión termosensible del represor de Gal4 (Gal80ts) permite controlar temporalmente el funcionamiento del sistema. A 18°C el Gal80ts es funcional (Temperatura permisiva), mientras que a 29°C se inactiva (Temperatura restrictiva)

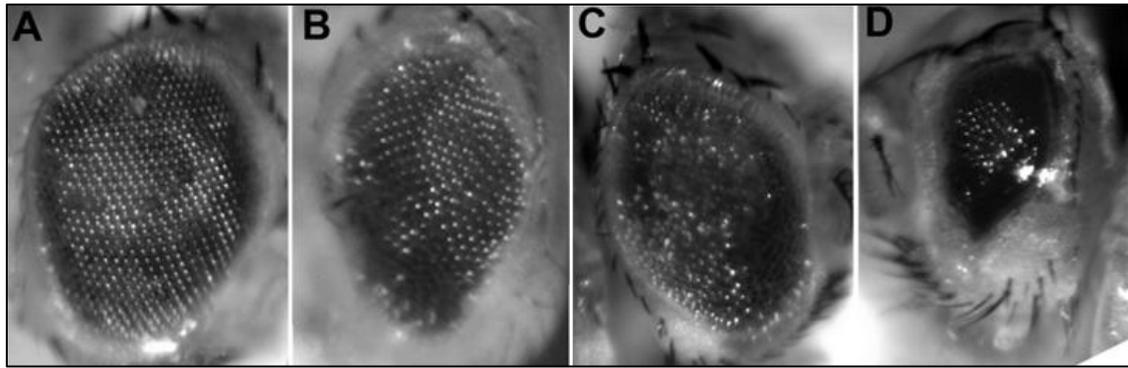
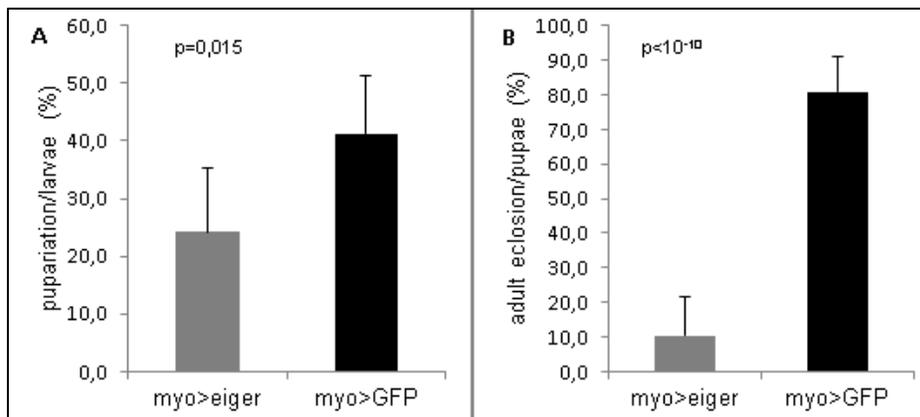


Figura 2. Imágenes tomadas con lupa estereoscópica de moscas con genotipo: (A) *ey-Gal4/+*; (B) *ey-Gal4/UAS-eiger*; (C) *gmr-Gal4/+*; (D) *gmr-Gal4/UAS-eiger*.

Análisis de la sobrevivencia de larvas: Para evaluar el efecto de la expresión de *eiger* en el intestino sobre la viabilidad de las moscas que lo expresan, se cruzaron moscas *Myo-Gal4;tub-Gal80*, cuya expresión se restringe a el intestino de las larvas y en las glándulas salivales, por moscas *UAS-eiger* y se analizó la viabilidad de la descendencia (genotipo *Myo-Gal4/+;tub-Gal80/UAS-eiger*). El experimento se realizó a 29°C (Figura 1B) colocando un número conocido de larvas por tubo. Como control se utilizaron larvas *Myo-Gal4/+;tub-Gal80/ UAS GFP*. Por último, se realizó el recuento de la cantidad de pupas y moscas sobrevivientes, y se calculó el porcentaje de sobrevivencia. Como se puede observar (Figuras 3 A y B), del total de larvas analizadas para el genotipo control (*Myo>GFP*), solo el 42.2% llegaron a pupar. Esto indicaría que las condiciones del experimento afectan la viabilidad de las larvas, debido a que la expresión del factor de transcripción Gal4 en el intestino de las larvas podría tener una toxicidad moderada. A pesar de este efecto, se observó una diferencia significativa en la viabilidad de las larvas de genotipo *Myo>eiger*, en donde solo un 26,15% llegaron a pupar.



Figuras 3: Grafico de barras que representan: (A) el número de animales que puparon respecto al número total de larvas por tubo, para la línea *Myo-Gal4/+; tub-Gal80/UAS-eiger* (*myo>eiger*) y la

línea *Myo-Gal4; tub-Gal80/UASGFP* (*myo>GFP*); (B) el número de moscas adultas respecto al número de pupas por tubo, para las mismas líneas. Los resultados se presentan como el promedio +/- la desviación estándar.

Se ha demostrado que larvas en condiciones de estrés son capaces de pupar, pero dichas pupas son inviables y mueren en ese estadio. Por lo tanto, se decidió cuantificar el número de moscas adultas que son capaces de eclosionar para cada genotipo. La Figura 3B muestra que el porcentaje de adultos que eclosionaron para la línea Myo>eiger fue del 10,29%; en cambio, dicho porcentaje para la línea Myo>GFP fue del 81,45%. Efectivamente hay una diferencia significativa entre los porcentajes obtenidos para línea que expresa eiger y para la que no lo expresa.

CONCLUSIÓN:

A partir de los estudios realizados se pudo comprobar que efectivamente la expresión del gen eiger induce muerte celular y daña los tejidos en donde se expresa. En el caso particular de las células del intestino de las larvas de *Drosophila*, demostramos que la expresión de eiger afecta al correcto funcionamiento del tejido y esto reduce drásticamente la viabilidad de los animales. En conjunto, estos resultados apoyan nuestra hipótesis de trabajo sobre el posible uso del gen eiger como agente bioinsecticida y su utilización para generar plantas resistentes al ataque por insectos. En el futuro intentaremos obtener plantas transgénicas que expresen Eiger para así evaluar la susceptibilidad de dichas plantas al ataque por insectos plaga.

BIBLIOGRAFÍA:

- Fitt GP.** 1994. Cotton pest management: part 3. An Australian Perspective. *Annu Rev Entomol* 39: 532-562.
- Gatehouse AM. et al.** 1994. Insect-resistant transgenic plants: choosing the gene to do the 'job'. *Biochem Soc Trans* 22: 944-949.
- Gunning RV et al.** 1991. Pyrethroid resistance mechanisms in Australian *Helicoverpa armigera*. *Pestic Sci* 33: 473-490.
- Haq SK et al.** 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Arch Biochem Biophys* 431: 145-159.
- Haq SK et al.** 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Arch Biochem Biophys* 431: 145-159.
- Lynch RE et al.** 2003. United States department of agriculture—agricultural research service: research on improving host-plant resistance to pests. *Pest Manage Sci* 59: 718-727.
- Gassmann AJ et al.** 2011. Field-evolved resistance to bt maize by western corn rootworm. *PLoS One* 6: e22629.
- Tabashnik BE et al.** 2008. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nat Biotech* 26: 199-202.
- Igaki, T. et al.** 2002 Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *The EMBO journal* 21, 3009–18.
- Igaki, T. et al.** 2009. Intrinsic tumor suppression and epithelial maintenance by endocytic activation of Eiger/TNF signaling in *Drosophila*. *Developmental cell* 16, 458–65.
- Vidal, M.** 2010. The dark side of fly TNF: an ancient developmental proof reading mechanism turned into tumor promoter. *Cell Cycle* 9, 3851–3856.
- Kaupilla, S. et al.** 2003. Eiger and its receptor, Wengen, comprise a TNF-like system in *Drosophila*. *Oncogene* 22, 4860–7.
- Stevens J et al.** 2012. Biotechnological approaches for the control of insect pests in crop plants, pesticides - advances in chemical and botanical pesticides, Dr. R.P. Soundararajan (Ed.), ISBN: 978-953-51-0680-7, InTech, DOI: 10.5772/46233.