

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES CON POTENCIAL BIOINSECTICIDA UTILIZANDO *DROSOPHILA MELANOGASTER* COMO SISTEMA MODELO

Sánchez, Juan Andrés^A.

^A*Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, IAL, UNL-CONICET*

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: Y

Palabras clave: Bioinsecticidas, Genes apoptóticos, *Drosophila melanogaster*.

INTRODUCCIÓN

La actividad agrícola es uno de los pilares fundamentales de la economía argentina, el extenso territorio y la variedad climática existente permiten una gran distribución de los cultivos. Las nuevas tecnologías han permitido extender esta actividad hacia regiones en donde los suelos no solían ser productivos, alcanzado así un total de 38 millones de hectáreas sembradas en la temporada 2014/2015. La relevancia de este sector ha convertido a nuestro país en el tercer consumidor a nivel global de plaguicidas, necesarios para combatir los diferentes agentes que afectan los cultivos ocasionando cuantiosas pérdidas de producción. Los plaguicidas representan entonces no sólo un producto económico importante sino también un factor de impacto medio ambiental a considerar ya que se usan en grandes cantidades y en una vasta porción del territorio. Los insecticidas químicos de amplio espectro se han utilizado durante muchos años como el principal agente de control de las plagas agrícolas, demostrando ser de gran utilidad para prevenir las pérdidas asociadas al ataque por insectos. Las sucesivas aplicaciones de los agroquímicos han llevado a la aparición de insectos resistentes, provocando el aumento de las dosis y el uso excesivo e indiscriminado de estos productos. Como consecuencia se produce un impacto ambiental significativo, enfatizado por las fumigaciones vía aérea que provocan la dispersión no controlada de los químicos, afectando especies autóctonas de flora y fauna y a las sociedades rurales. Por lo tanto existe una necesidad creciente por desarrollar estrategias alternativas que permitan reducir el uso de pesticidas químicos, para disminuir los costos de producción y el impacto medio ambiental y social sin dejar de lado las pérdidas ocasionadas por los insectos y así contribuir a una agricultura más sustentable.

La biotecnología moderna ha demostrado ser una de las principales y más prometedoras alternativas al uso de pesticidas químicos a partir de la generación de plantas transgénicas. En Argentina, por ejemplo, se siembran varios cultivos transgénicos Bt o Vip incluyendo algodón y maíz. Estos genes confieren resistencia a cierta variedad de insectos mientras que no afecta el ataque por otras variedades. Esta especificidad es una ventaja en el diseño de estrategias específicas de control de plagas cuando existe solo una o unas pocas especies perjudiciales, mientras que es una desventaja en el caso de cultivos susceptibles al ataque por una amplia variedad de insectos. Por otro lado, y al igual que con los pesticidas químicos, el uso indiscriminado de una única característica de resistencia ha llevado a la aparición de

Proyecto: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES CON POTENCIAL
BIOINSECTICIDA UTILIZANDO *DROSOPHILA MELANOGASTER* COMO SISTEMA MODELO

Programa de Becas para Proyectos de Innovación Tecnológica de Fundación Banco Santa Fe

Director de proyecto: Dr. Andrés Dekanty

insectos resistentes. Surge entonces la necesidad de identificar otros genes candidatos, con un modo de acción diferente y de amplio espectro como insecticida biológico, para la protección de plantas de interés comercial.

En este contexto, el presente proyecto de investigación tiene como objetivo principal evaluar el uso de genes específicos de insectos, con potencial bioinsecticida, con el fin de generar nuevas estrategias en el control de plagas de insectos de cultivos de relevancia económica. Para ello disponemos de un organismo modelo como la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, que nos permite realizar experimentos genéticos de forma sencilla y controlada. Al mismo tiempo, y mediante el uso de ingeniería genética y otras herramientas biotecnológicas, evaluaremos el potencial bioinsecticida de diferentes genes a través de su inducción o inhibición. Nos planteamos encontrar blancos mediante un análisis bioinformático, y constatar *in vivo* si afectan el ciclo normal de las moscas, ya sea produciendo un retardo en el crecimiento o una interrupción en el estadio de larva o pupa.

OBJETIVO

El presente proyecto de investigación y desarrollo tiene como objetivo general evaluar a partir de estudios funcionales *in vivo* el potencial uso de genes pro-apoptóticos específicos de insectos como agentes bioinsecticida utilizando *Drosophila melanogaster* como sistema modelo.

METODOLOGÍA

Búsqueda bioinformática.

Realizamos una búsqueda bibliográfica de posibles genes blancos candidatos para ser seleccionados como potenciales bioinsecticidas. Para la elección establecimos ciertas características preferenciales que dichos genes debían cumplir:

- Estar involucrados en funciones vitales para los insectos, priorizando aquellos que intervienen con la respuesta inmune a nivel del intestino y que presentan fenotipos de letalidad ya sea por sobreexpresión o inhibición.
- Presentar ortólogos en diferentes variedades de insectos, principalmente en aquellos que son plagas y que representan pérdidas en la producción agrícola.
- Localización extracelular y/o transmembranas, que puedan ser transportadas al interior de intestino, o que posean receptores que desaten la respuesta.

Bases de datos utilizadas: Flybase, Uniprot, Interprot y Blast.

Genes Candidatos seleccionados: Duox, Egr (Eiger), Irc (Immune-regulated catalase), Keap1, SPE (Spatzle-Processing Enzyme), Spn27A (Serpín27A), Spz (Spatzle) y Vha44 (Vacuolar H⁺ ATPase 44kD subunit).

Sistema de expresión utilizado (GAL4/UAS).

La segunda etapa del proyecto consistió en evaluar el potencial insecticida de los genes blancos seleccionados. Para ello hicimos uso del sistema GAL4/UAS que permite realizar la expresión de construcciones de interés en tejidos específicos de forma controlada. Este sistema de expresión ha sido ampliamente utilizado en *Drosophila melanogaster*, por lo que se dispone de gran cantidad de herramientas genéticas que permiten sobreexpresar y silenciar genes de forma espacial y temporal. El sistema GAL4/UAS está constituido, en su versión más simple, por dos componentes: I) un promotor tejido específico fusionado al GAL4 y II) una construcción que se quiere sobreexpresar fusionada a las secuencias UAS. El GAL4 es un factor de transcripción que activa la expresión de las construcciones de interés que se encuentran fusionadas y corriente abajo de los UAS, de esta forma la construcción se expresará en aquellos tejidos en el que el GAL4 este activo y esto se puede elegir

mediante el promotor seleccionado. A su vez se puede agregar un tercer elemento al sistema que permite elegir el momento de expresión, el GAL80. Este componente es un represor del GAL4 y es controlado por temperatura, a 18°C el GAL80 se encuentra activo y a 29°C inactivo. Esta característica hace al sistema controlable de forma temporal de acuerdo a la temperatura de trabajo.

Análisis funcional in vivo de los candidatos.

El esquema de trabajo empleado para la evaluación de los diferentes candidatos consistió en los siguientes pasos:

1. Cruzar las líneas con las construcciones de interés, sea sobreexpresante o silenciadoras de un gen blanco determinado, con la línea *pMyo1A-GAL4; ptub-GAL80* que permite la expresión del GAL4 en el intestino dado que posee el promotor Myo1A y además posee el GAL80 bajo un promotor constitutivo de tubulina.
2. Realizar ovipuestas durante toda la noche a temperatura ambiente.
3. Colocar los embriones a 18°C hasta la eclosión para evitar la activación del sistema de expresión. El fin de este paso es evitar que la expresión de los transgenes produzca un fenotipo de letalidad antes de nacer.
4. Colocar las larvas que se encuentran en el estadio larva 1 (L1) a 29°C para activar el sistema de expresión GAL4/UAS.
5. Contabilizar las larvas que alcanzaron el estadio de pupa y las que llegaron a mosca adulta para evaluar si el transgen utilizado posee un potencial bioinsecticida.

Para verificar que la expresión se produce efectivamente en el intestino, realizamos un cruce control de dicha línea con una mosca que posee la construcción UAS-GFP (**Figura 1**).

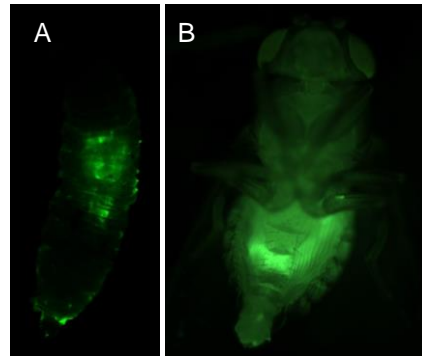


Figura 1: Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) mediante el sistema GAL4/UAS con el promotor pMyo1A. **A:** Larva L3. **B:** Mosca adulta.

RESULTADOS

Evaluamos el potencial insecticida de diferentes construcciones que permitían sobreexpresar o silenciar (mediante ARN de interferencias, RNAi) diferentes vías involucradas, principalmente, en mecanismos de defensa a nivel intestinal de *Drosophila melanogaster*. Encontramos que la mayoría de los genes candidatos silenciados poseen una baja incidencia en el ciclo de desarrollo de las moscas, tal es el caso de *Egr*, *Keap*, *Vha44*, *Duox*, *Irc* y *Spn27A* (**Figura 2**). Esto sucede, posiblemente, porque existen mecanismos laterales capaces de suplir la desregulación de algún gen específico. Dicho efecto se podría contrarrestar utilizando más de una construcción en simultáneo, lo que trae aparejado un aumento en la complejidad del experimento y del potencial insecticida. Resultado similar mostró la línea sobreexpresante de *Spn27A*.

Algunos genes mostraron generar un cierto grado de susceptibilidad en la supervivencia, como es el caso de las construcciones inhibidora de SPE (*SpeRNAi*) y sobreexpresante de *Spatzle* (*Spz*) (**Figura 2**). Estos genes participan en respuesta a patógenos, controlando los niveles de ROS (especies reactivas del oxígeno) en el intestino. Es muy probable que esta susceptibilidad aumente en condiciones de estrés como también en presencia de patógenos; sin embargo durante el proyecto trabajamos en condiciones óptimas de desarrollo para independizarnos de los factores ambientales externos.

Eiger (Egr) ha mostrado ser 100% letal para las moscas cuando es sobreexpresado en intestino, por lo que es un gen interesante para ser utilizado como agente insecticida. Los resultados de la hiperactivación de Eiger muestran que solo un 47% de las larvas son capaces de llegar al estadio de pupa, mientras que ninguna fue capaz de eclosionar y alcanzar la fase de mosca adulta generando letalidad total en los individuos (**Figura 2**).

Eiger es un gen capaz de inducir muerte en diferentes tejidos, desatando una respuesta apoptótica en las células blanco. Esto se debe a que forma parte de una vía finamente regulada (vía JNK), que participa en diferentes procesos de desarrollo, homeostasis y de defensa en *D. melanogaster*; y cuya hiperactivación tiene como resultado final la muerte del tejido. Eiger es capaz de activar la vía JNK de forma autócrina (dentro de una misma célula) y parácrina (en células vecinas), dado que posee un dominio extracelular capaz de ser secretado y activar a sus receptores. Además presenta ortólogos en muchas especies de insectos, características que lo hacen atractivo a la hora de pensar en bioinsecticidas de amplio espectro.

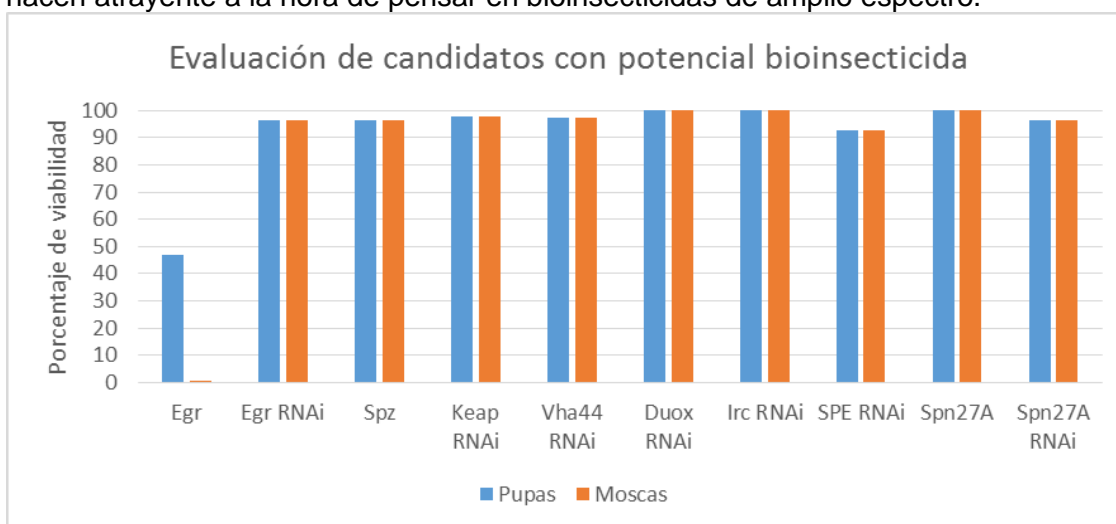


Figura 2: Análisis funcional *in vivo* de los genes candidatos mediante el sistema GAL4/UAS dirigido a intestino.

BIBLIOGRAFÍA

- Aktar, M. y Islam, M.**, 2015. An eco-friendly approach to reduce reproductive attributes in the housefly, *Musca domestica* L. using crude plant extracts. *Sch. Acad. J. Biosci.*; 3, 443-451.
- Duffy, J.**, 2002. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*; 34, 1-15.
- Gassmann et al.**, 2011. Field-Evolved Resistance to Bt Maize by Western Corn Rootworm. *PLoS One* 6: e22629.
- Krattiger, A.**, 1996. Insect resistance in crops: A case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries: The International Agricultural Service for the Acquisition of Agribiotech Applications (ISAAA).
- Lemaitre B y Hoffmann J.**, 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol.*; 25, 697-743.
- McGraw, Elizabeth y O'Neill, Scott L.**, 2013. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature reviews. Microbiology*, 11, 181-193.
- Ruiu, L.**(2015). Insect Pathogenic Bacteria in Integrated Pest Management. *Insects*, 6, 352-367.
- Siegrwart, M et al.**, 2015. Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-19.
- Stevens, J et al.**, 2012. Biotechnological Approaches for the Control of Insect Pests in Crop Plants. INTECH, chapter 12, 270-310.
- Subrata, D.**, 2012. Bio pesticides and fertilizers: novel substitutes of their chemical alternates. *Journal of Environmental Research and Development*, 6, 773-778.