

Cultivos arbóreos: avances en el manejo de plagas y enfermedades

Tree Crops: Advances in Insects and Disease Management



Wayne B. Hunter

USDA-ARS, U.S. Horticultural
Research Lab, 2001 South Rock
Road, Fort Pierce
FL 34945, USA
Wayne.hunter@ars.usda.gov

**Xiomara H.
Sinisterra-Hunter**

Science, Biotechnology Advisor
Port St. Lucie, FL 34983, USA

Palabras CLAVE

Próxima generación, genomas, manejo de insectos plaga y fitopatógenos, control biológico de insectos plaga, sistema de "entrega letal del macho", fitopatógenos, reducción de pérdidas en industrias palmeras

Next generation, genome, insect pest and plant pathogen, biological control of insect pests, system "Lethal Male Delivery", pathogens, emerging technologies



Resumen

Los avances en las técnicas de secuenciación han permitido la secuenciación rápida y eficiente de muchos genomas. Esto ha cambiado la forma como los investigadores y las industrias ahora pueden mirar el manejo de insectos plaga y patógenos de plantas. El control biológico de los insectos plaga en áreas extensas en donde se cultivan bosques y árboles frutales ha sido el elemento básico de supresión de plagas de manera rentable. Virus que atacan insectos han demostrado ser eficaces cuando las condiciones biológicas apropiadas pueden ser satisfechas. Uno de los sistemas propuestos es la "introducción de machos letales", en el que los machos se infectan con un virus y luego son liberados para que busquen y se apareen con las hembras sanas provocando así la propagación de la infección y, por tanto, el aumento de la mortalidad en la población. Sobre la base de este sistema y adicionando enfoques provenientes de las técnicas genómicas emergentes tales como el ARN de interferencia (RNAi), ahora es posible identificar y suprimir la expresión génica de manera que solo especies específicas de insectos son afectadas. También es posible usar estas técnicas para reducir agentes patógenos de plantas como virus y hongos. Aquí se presenta y discute una visión general de estos tipos de enfoques que se están desarrollando para reducir las plagas y los patógenos en cítricos, vides y otros árboles cultivables, junto con las aplicaciones de otras tecnologías genéticas emergentes.

Abstract

Advances in next-generation sequencing have enabled genome sequencing to be fast and affordable. This has changed the way researchers and industry can now address the management of insect pests and pathogens. Biological control of insect pests that occur in large areas, such as forests and farming systems of fruit trees, have been the main element for cost effective pest suppression. A proposed system is 'lethal delivery by male' (Lethal Male Delivery), in which males are infected with a virus and then released to seek out females, which mate thus spreading the virus infection throughout the population. This system has been used successfully since the early 1970's, against the Rhinoceros Palm beetle, and is now being expanded to include other genetic approaches such as RNA interference (RNAi). Strategies like RNAi make it possible to focus on suppressing gene expression in a highly species specific way in insects, as well as targeting viruses and some fungi. A review of these types of approaches that are being developed to reduce pests and disease pathogens in citrus, grapevine, and other tree fruit crops along with the applications of other emerging gene-based technologies are discussed with respect to "how they can help to reduce losses in palm industries".



¿Qué es la estrategia de ARN de interferencia?

¿Qué es el ácido ribonucleico de interferencia, ARNi, la estrategia?

Mientras que muchos en la industria están familiarizados con el ARN de interferencia (RNAi), es necesario ofrecer una breve explicación del proceso para el público más amplio. Una explicación sencilla es que el proceso ARNi utiliza una molécula pequeña para cortar el ARN mensajero (ARNm), lo cual suprime la producción de la proteína correspondiente, que es necesaria para la supervivencia del insecto, alterando de esta manera funciones biológicas importantes. En sentido más técnico, el ARN de interferencia (ARNi) es un proceso celular que ha evolucionado de forma natural, por el cual un ARN mensajero (ARNm), es marcado como blanco de degradación por una molécula corta de ARN de doble cadena (ARN corto de interferencia) que tiene complementariedad de secuencia con el ARNm seleccionado como blanco. Cuando el ARNi y el ARNm se unen se inicia el proceso celular que culmina en la degrada-

ción del ARNm evitándose así la producción de proteínas, lo que resulta en la inhibición específica de la expresión génica. El proceso se conoce como "ARN de interferencia".

El aumento de la disponibilidad de los genomas de insectos ha hecho que las aplicaciones de la técnica de ARNi sean indispensables para la caracterización de las funciones de genes en los insectos y para desarrollar métodos de control de plaga y enfermedades. El reconocimiento del ARN de interferencia (ARNi) como un método para el análisis de las funciones de genes individuales (Fuego *et al.* 1998) culminó con la concesión del Premio Nobel a Andrew Z. Fire y Craig C. Mello en 2006. Ellos demostraron el mecanismo celular involucrado en la función de la interferencia de ARN. Mello *et al.* mostraron que una vez el ARNm (necesario para la producción de proteínas, por ejemplo, las enzimas necesarias para la digestión en insectos) se une al ARNi forman un complejo que es reconocido por el Dicer. El Dicer es una proteína especializada en reconocer y cortar ARN de doble cadena generando pedazos de entre 20 a 23 nucleótidos. Estos a su vez se convierten en blanco de reconocimiento para



un segundo complejo proteínico (complejo de silenciamiento inducido por el ARN) cuya función es separar las cadenas del dímero formado en el paso anterior iniciando así el proceso de degradación final. En el ejemplo anterior cuando las enzimas digestivas en el insecto no son sintetizadas este muere por inanición.

¿Cómo se aplica el concepto de ARNi a los problemas agrícolas?

El laboratorio del USDA-ARS se encuentra en la costa este de Florida, en el centro de la península, siendo uno de los más grandes productores de cítricos regionales de los Estados Unidos; es por eso que mi trabajo investigativo actual se centra en el desarrollo de métodos no transgénicos para aplicar ARN interferencia para controlar insectos plaga en árboles frutales. Recientemente la rápida propagación del psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri*, que es el vector de la bacteria causante del Huanglongbing o “enfermedad de enverdecimiento de los cítricos”, ha estimulado las investigaciones sobre el uso de técnicas biotecnológicas basadas en la regulación de la expresión génica. Para poder utilizar las técnicas de ARN de interferencia es necesario identificar las secuencias genéticas que son fundamentales para la biología del insecto.

Con ese énfasis se ha llevado a cabo la secuenciación del transcriptoma del psílido y se han identificado más de 18.600 genes con buena potencialidad. De este grupo se seleccionaron 10 genes para los primeros ensayos de ARN de silenciamiento. También fue necesario identificar la mejor construcción de ARN de doble cadena (ARNdc) que causaría el mayor aumento de mortalidad en el psílido. Pruebas de alimentación, en las que los psílicos ingirieron el ARNdc diseñado, demostraron que los fragmentos más largos eran mejores, por lo general, entre 200 a 480 nucleótidos de largo. Con este diseño se ha podido causar mortalidad de 80-98% en psílicos sometidos a pruebas de alimentación, en que los esquejes de plantas que habían absorbido previamente la solución que contenía el ARNdc. El incremento de mortalidad psílido se empezó a observar dentro de dos a cuatro días postalimentación.

Cuando se agregaron más psílicos a la jaula del ensayo observamos que los psílicos continuaron muriéndose durante los siguientes cuarenta días con una sola aplicación de ARNdc a la planta.

Conclusiones

El proceso de ARN de interferencia es un sistema que se produce naturalmente en todas las plantas, insectos, animales, y algunos hongos. Un sistema similar parece haber sido encontrado en bacterias también. El ARN de interferencia utiliza los mecanismos celulares naturales y no añade ni cambia nada en la genética de la planta o insecto. Mediante el uso de la genética natural de los insectos, podemos diseñar un ARNdc altamente específico para genes del psílido. Conocer las secuencias de genes específicos permite mantener los insectos beneficiosos como la abeja melífera a salvo, ya que el ARNdc dirigido hacia psílicos no funcionará en otros insectos.

Problemas que enfrenta la industria de cítricos de Florida

La rápida propagación de la bacteria patógena, *Asiaticus Liberibacter Candidatus*, que causa la enfermedad de enverdecimiento de los cítricos tiene altos costos en esta industria de Estados Unidos con millones de dólares en pérdidas, rendimientos reducidos, así como muchos puestos de trabajo perdidos. Mientras algunos investigadores están trabajando con un enfoque para producir árboles transgénicos resistentes al enverdecimiento de los cítricos, que llevará entre quince y veinte años, otros estamos utilizando el enfoque de tratar el árbol como paciente en un hospital, en donde se identifica el problema, se diseña el mejor tratamiento y luego se entrega la "medicina", el ARNdc. En este ejemplo, el patógeno es diseminado por el psílido, entonces se diseña el tratamiento (es decir, el ARNdc contra la biología psílido) que podrá ser aplicado rápidamente al árbol a través de aerosoles o de riego.

Los métodos que se están desarrollando no son transgénicos y no cambian el genoma del insecto o la planta. El tratamiento no dura mucho

tiempo en el medio ambiente, ya la mayoría de organismos ha evolucionado mecanismos para destruir ARNdc. Dado que la industria cítrica quiere tener el producto más "natural" que ellos puedan producir, hay un gran interés en el uso de la estrategia de ARN de interferencia. Uno de los principales obstáculos para el desarrollo y el uso de un árbol con resistencia, pero sin llegar a ser transgénico, fue cómo lograr una producción masiva de ARNdc, y a continuación, la forma de aplicar el producto a los árboles. También hubo muchas preguntas sobre las concentraciones de aplicación y el tiempo de permanencia bajo condiciones de campo. Dado que todos los insectos y las plantas son capaces de destruir ARNdc, la gente no creía que este enfoque podría funcionar. Sin embargo, en nuestro trabajo con psílicos, saltamontes, áfidos y chicharritas hemos descubierto que muchos insectos pueden ingerir ARNdc, el cual se mueve de manera sistémica a través de su cuerpos causando interferencia en muchos tejidos diferentes. Una ventaja adicional es el hecho de que solo una dosis muy baja debe ser ingerida para causar la interferencia. Nosotros también demostramos que ARNdc puede sobrevivir en el agua haciendo muy fácil su aplicación directa a las raíces de los cultivos elegidos.

De manera adicional, se demuestra que el ARNdc persiste en los árboles de cítricos, siendo estable y detectable por lo menos durante dos meses (Hunter *et al.*, 2012). Estos resultados son muy diferentes de lo que se conoce en las investigaciones en animales y humanos que muestran como el ARNdc se digiere rápidamente después de la ingestión, por lo que no funciona cuando se administra vía oral. Esta es también otra razón por la cual el ARNi puede ser un método muy seguro de control de plagas de insectos.

El tratamiento de los árboles utilizando riego de las raíces también demostró que el ARNdc se trasladó sistémicamente a través del árbol. Fue posible demostrar la presencia del ARNdc en insectos que se alimentaron de las hojas de los árboles tratados. Esto fue cierto para insectos que se alimentan del floema (psílido asiático) o del xilema (saltador de las alas cristalinas).

Al evaluar la persistencia y la longevidad de la molécula de ARNdc en el árbol, los resultados mostraron de nuevo que las secuencias más largas eran mejores (entre 200 a 860 nucleótidos de longitud), en la inducción de ARNi, y a su vez se detectaron por un periodo de tiempo más largo en los diferentes tejidos de los árboles tratados.

El manejo actual de los psílicos en Florida y otros estados se basa en múltiples aplicaciones de insecticidas para reducir la población de psílicos, pero esto presenta varios problemas como por ejemplo: el costo de los insecticidas es muy elevado y su formulación también mata insectos benéficos. En contraste, ARNdc pueden ser aplicados disueltos en soluciones acuosas, no altera el genoma de las plantas o de las plagas y no afecta a los insectos benéficos. Además, ARNdc pueden ser diseñados rápidamente para combatir una o varias plagas al mismo tiempo. Se considera que los ARNdc solo persistirán en el ambiente por pocos meses, sin embargo, se continúan realizando investigaciones sobre la seguridad y eficacia de la estrategia de ARNi y trabajando con las oficinas gubernamentales encargadas de la regulación de agroquímicos para obtener licencias para la aplicación de estos productos, tanto industrial como agrícola.

Ensayos con árboles y plantas como protección

El enverdecimiento de los cítricos ha causado gran preocupación a todos los productores de cítricos en el mundo. La bacteria causante de la enfermedad es transmitida por psílicos y las últimas investigaciones han mostrado que hay muchas especies de esta bacteria capaces de infectar una gran variedad de cultivos como el tomate, la papa, la cebolla y los cítricos. La llegada y la rápida diseminación del psílido asiático en el sur de Estados Unidos, en 1998, fue seguida en 2005 por reportes de detección de la bacteria patógena; actualmente, se cree que si no se encuentra pronto una solución, dentro de otros seis o siete años la producción podría ser tan baja que no sería rentable seguir produciendo cítricos en el área, esto ha hecho que



muchos productores de cítricos se motivaron a financiar la búsqueda de una rápida solución al problema. La investigación enfocada en los insecticidas disponibles, las técnicas de biotecnologías emergentes (ARNi), junto con otras estrategias, ha producido una gran cantidad de nueva información sobre el manejo los psílidos y los patógenos que estos diseminan. En Colombia hay cultivos y productos que enfrentan problemas similares, por ejemplo, cuando se siembran nuevas áreas o nuevos árboles, estos se demoran algunos años para entrar en producción, lo cual significa que se deben desarrollar estrategias de manejo que sean rentables y seguras para el ambiente, por lo menos por veinte años hacia el futuro.

ARN de interferencia para reducir plagas de insectos: de infusión y de inyección

Otra ventaja de utilizar la estrategia ARNi es que puede ser diseñada para combatir el insecto plaga deseado de una manera altamente específica, sin perjudicar a los insectos beneficiosos, tales como los depredadores y parasitoides. En Estados Unidos se han invertido millones de dólares para desarrollar el control biológico, utilizando parasitoides y depredadores para reducir las poblaciones de insectos plaga. Tener poblaciones viables de insectos benéficos en el campo proporcionaría una medida adicional de control de las plagas. Además, la investigación ha demostrado que mediante el uso de ARNi algunos insectos pueden hacerse más sensibles a concentraciones más bajas de insecticidas. Se están estudiando este tipo de estrategias porque pueden ahorrar dinero a los productores sin dejar de ofrecer un manejo altamente específico de plagas.

Diseñando la especificidad del ARN: Cuando el psílido asiático de los cítricos fue reportado por primera vez en Estados Unidos empezamos a producir marcadores genéticos de secuencias expresadas (EST acrónimo en inglés) que resultó en una base de datos de casi 20.000 secuencias que se utilizaron para examinar la biología psílido y para el desarrollo de estrategias de manejo potenciales como el ARNi.

En 2009 organicé el Consorcio Internacional del Genoma del Psílido y en 2010 se completó el primer borrador del genoma completo del psílido, recientemente se han escrito versiones mejoradas del genoma (490MB) y del transcriptoma (más de 18.300 seqs), DIACI_1.1, descargas gratuitas de conjuntos de datos en (<http://www.psyllid.org/>). Al igual que con cualquier problema de plagas/patógeno, hoy el primer paso es llevar a cabo la secuenciación del transcriptoma, o del genoma, y proporcionar rápidamente esta información a la comunidad científica para que todos puedan comenzar de inmediato a identificar genes asociados con la supervivencia del insecto y la transmisión de patógenos. El costo de la secuenciación hoy es muy asequible, pero el procesamiento de datos (Bioinformática) es más costoso y consume mucho más tiempo.

Con Internet la mayoría de los investigadores tienen acceso a una gran cantidad de información que se puede utilizar para avanzar en sus propios esfuerzos de investigación. Cada semana aparecen nuevas publicaciones sobre ARNi insectos, indicando cuáles genes son fundamentales para la biología de los insectos y cuáles son buenos candidatos para usar en esquemas de ARNi. A continuación, el investigador puede producir el ARN de doble cadena a su ARNm elegido utilizando un kit disponible comercialmente. Dependiendo del insecto plaga, el ARNdc puede ser aplicado vía alimentación, vía tópica en forma de aerosoles, o por inyección para evaluar la eficacia del ARNdc producido. La evaluación de los niveles de mortalidad es bastante fácil y rápida, pero como no todas los ARNdc funcionan

Tener poblaciones viables de insectos benéficos en el campo proporcionaría una medida adicional de control de las plagas.

con la misma eficacia, o en la misma concentración, se necesita hacer varias pruebas para determinar las condiciones específicas de cada ARNdc.

Para examinar en forma concienzuda ARNdc se deben probar tres concentraciones diferentes. Para los ensayos de alimentación por lo general se utiliza un rango de 20 a 100 nanogramos por mililitro, para ser absorbidos por aproximadamente 0,25 gramos de corte de tejido de la planta y se utilizan de 10 a 20 insectos por jaula para el monitoreo de la mortalidad durante un periodo de diez días. Si se trabaja con especies de escarabajos, ellos se pueden alimentar directamente en soluciones de sacarosa suplementadas con ARNdc. Una vez identificado el mejor ARNdc se puede pasar a experimentar con plantas o árboles completos, introduciendo el complejo vía riego en soluciones acuosas o mediante inyecciones de tronco/tallo utilizando el mismo tipo de jeringas que son comunes en los ensayos de absorción de antibióticos. Las jeringas están disponibles comercialmente, se pueden utilizar para inyectar hasta 20 ml de solución de ARN por planta (Hunter *et al.*, 2012).

El progreso de la investigación actual

Investigaciones conducidas con insectos masticadores como hormigas, escarabajos, avispas, abejas, tiene una logística sencilla ya que estos se pueden alimentar fácilmente con una mezcla de cebo/solución de sacarosa suplementada con ARNi.

La dificultad aparece cuando se trabaja con hemípteros que se alimentan de plantas, debido a que tienen piezas bucales que son perforadoras-chupadoras. Por eso es importante administrar el tratamiento de ARNi a la planta huésped que es donde los insectos se alimentan. Investigaciones recientes están demostrando que esto es mucho más fácil de lo que se pensaba inicialmente. Por ejemplo ARNdc disuelto en agua puede ser absorbido por el sistema radicular de muchas plantas, la prevalencia del producto en planta depende de la concentración inicial y de la actividad de ARN polimeraza que utiliza templetos ARN (RdRp acrónimo en inglés). Este estudio demostró que moléculas

ARNdc se pueden detectar hasta 63 días después del tratamiento inicial. Árboles maduros también mostraron una propagación sistémica del ARNdc. Otros estudios también evidenciaron que una vez ingerido por psílicos o saltahojas, el ARNdc se mueve de manera sistémica en los insectos. Como la mayoría de investigadores eligen genes que se expresan en el intestino medio de los insectos, ya que es el primer tejido en contacto con el tratamiento, el hecho de que el ARN se mueve de manera sistémica contribuirá a que se estudien más genes, cuya expresión ocurre en otros tejidos como el área neural, etcétera, ampliando así los blancos aceptables para estrategias ARNi.

Las similitudes entre los sistemas de palma de aceite y cítricos

La información que se está obteniendo de la investigación de ARNi en los árboles de cítricos tiene aplicación en muchos otros cultivos arbóreos. Por ejemplo, los cultivos de árboles son los sistemas de cultivo a largo plazo que necesitarán protección durante veinte a treinta años o más. Los cultivos arbóreos cubren grandes áreas que necesitan frecuentes aplicaciones de insecticidas. El uso de estrategias basadas en ARNi podría brindar beneficios adicionales mediante la protección de otros insectos benéficos en el campo, de modo que el aumento en la supervivencia de los depredadores y parasitoides tendría un efecto sinérgico en el control de plagas. Como los cultivos arbóreos desarrollarán diferentes problemas a través de los años de producción, el ARNi ofrece un sistema que puede ser diseñado contra cada nueva plaga, sobre la base de sus secuencias genéticas específicas que puede ser utilizado con los equipos convencionales de riego o de aplicación de pesticidas. Sin embargo, debido a que este método de manejo es una tecnología emergente, solo ahora se están produciendo las normas para la regulación y registro de los productos basados en ARNi. Como con cualquier nueva tecnología, tomará tiempo y muchas pruebas de campo antes de que estos productos estén ampliamente disponibles.



Bibliografía

- Burand, J.P.; Hunter, W.B. 2012. RNAi: future in insect management. *Journal of Invertebrate Pathology*. 112(2013)S68-S74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.07.012>.
- Hunter, W.B.; Avery, P.B.; Pick, D.; Powell, C.A. 2011. Broad spectrum potential of *Isaria fumosorosea* on insect pests of citrus. *Florida Entomologist*. 94:1051-1054.
- Hunter, W.B.; Glick, E.; Paldi, N.; Bextine, B.R. 2012. Advances in RNAi interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest population suppression. *Southwestern Entomologist*. 37(1):85-87.
- Hunter, W.B. 2011. RNAi technology for control of Asian citrus psyllid, Two Part video. <http://www.youtube.com/watch?v=t4j31k2OuSg> . (Published Video)
- Hunter, W.; Glick, E.; Bextine, B.R.; Paldi, N. 2011. RNAi strategy in citrus trees to reduce Hemipteran pests: psyllids and leafhoppers 9.2, p. 148. The 2nd International Research Conference on Huanglongbing, January 10-14, Orlando, FL. (Proceedings)
- Hunter, W.B.; Stover, E.; Glick, E.; Bextine, B.R.; Paldi, N. 2011. RNAi – evaluating injection into citrus trees and grapevine to target psyllids and leafhoppers. 9.18, p. 164. The 2nd International Research Conference on Huanglongbing, January 10-14, Orlando, FL. (Proceedings)
- Moran, P.J.; Patt, J.M.; Cabanillas, H.E.; Adamczyk, J.L.; Jackson, M.A.; Dunlap, C.A.; Hunter, W.B.; Avery, P.B. 2011. Localized autoinoculation and dissemination of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus psyllid in South Texas. *Subtropical Plant Science*. 63:23-35.
- Pick, D.A.; Avery, P.B.; Hunter, W.B.; Powell, C.A.; Arthurs, S.P. 2012. Entomopathogenic fungus, *Isaria fumosorosea*, and aphid parasitoid, *Lysiphlebus testaceipes*, for managing infestations of Brown Citrus Aphid, *Toxoptera citricidus*. *Florida Entomologist*. 95: 774-776.