

LOCALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ENDOSIMBIOTES
OBLIGADOS DE *Delphacodes kuscheli* Y *Dalbulus maidis*, DOS ESPECIES DE CHICHARRITAS
VECTORAS DE ENFERMEDADES DEL CULTIVO DE MAÍZ EN ARGENTINA (HEMIPTERA:
AUCHENORRHYNCHA)

LOCALIZATION AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF OBLIGATE ENDOSYMBIONTS
OF *Delphacodes kuscheli* AND *Dalbulus maidis*, TWO HOPPERS SPECIES VECTORS OF MAIZE CROP
DISEASES IN ARGENTINA (HEMIPTERA: AUCHENORRHYNCHA)

María Eugenia BRENTASSI^{1,2}; Daniela DE LA FUENTE¹; Agustín LAMEIRO¹

¹División Entomología. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. Argentina. ²Investigador Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC). Argentina.

RESUMEN.

Delphacodes kuscheli y *Dalbulus maidis* son dos especies de hemípteros auquenorrincos de importancia fitosanitaria que transmiten el “Mal de Río Cuarto virus” y el “Corn Stunt *Spiroplasma*” respectivamente, enfermedades que afectan al cultivo de maíz en Argentina. Entre los hemípteros es conocida la presencia de endosimbiontes obligados (bacterias u hongos) que proveen de aminoácidos esenciales y vitaminas indispensables para completar su ciclo vital. El objetivo de este trabajo es dar a conocer la localización y caracterización morfológica de los endosimbiontes obligados asociados a ambas especies. Los insectos provinieron de crías mantenidas en el Bioterio de la División Entomología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata. Las observaciones se realizaron con microscopio óptico y electrónico de transmisión para lo cual hembras adultas se procesaron según técnicas convencionales de fijación, inclusión y coloración. *D. kuscheli* aloja organismos eucariotas, *yeast-like symbionts* (YLS) en el cuerpo graso abdominal y en el polo posterior de los ovocitos; a nivel ultraestructural se destaca el grosor de la pared celular. Los endosimbiontes de *D. maidis* se alojan en órganos pares abdominales (bacteriomas) formados por células uninucleadas y una zona sincitial donde se localizan bacterias de forma irregular de gran tamaño (8-12 µm de longitud).

Palabras claves: endosimbiontes, maíz, *Delphacodes kuscheli*, *Dalbulus maidis*, Argentina.

ABSTRACT.

Delphacodes kuscheli and *Dalbulus maidis* are two species of hemipterans auchenorrhynchans of phytosanitary importance that transmit the “Mal de Río Cuarto virus” and the “Corn Stunt *Spiroplasma*” respectively, diseases which affects maize crop in Argentina. Among hemipterans the presence of obligate endosymbionts (bacterial and/or fungal) that providing of essential amino acids and vitamins necessary for the life cycle of the host is known. The aim of this work is to provide the localization and morphological characterization of the obligate endosymbionts related with both species. The insects were reared in the Bioterio of the División Entomología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata. The observations were made using light and transmission electron microscopy. Adult females were processed using conventional methods of fixation, inclusion and coloration. *D. kuscheli* harbors eukaryotic organisms, *yeast-like symbionts* (YLS) in the abdominal fat body and in the posterior pole of the oocytes; at ultrastructural level the main character is the thickness of the cell wall. Endosymbionts of *D. maidis* are harbored in paired abdominal organs (bacteriomes) formed by uninucleate cells and a syncytial zone where irregular and big bacterium (8-12 µm long) are localized.

Keywords: endosymbionts, corn, *Delphacodes kuscheli*, *Dalbulus maidis*, Argentina.

Recibido junio 15, 2013 - Aceptado septiembre 28, 2013

* **Correspondencia de autor:** María Eugenia Brentassi. CIC. División Entomología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo. UNLP. Paseo del Bosque s/n Tel. 54 221 425-7744 Int. 139. Fax: 54 221 425-7527.(CP 1900). La Plata, Argentina. e-mail: eubrenta@fcnym.unlp.edu.ar, eubrenta@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Los hemípteros auquenorrincos son insectos que poseen sus piezas bucales adaptadas para alimentarse de los fluidos vegetales (savia del xilema o floema) de sus plantas hospederas. Esta fuente de alimentación resulta nutricionalmente desbalanceada (1, 2) por lo cual viven asociados con microorganismos (bacterias u hongos) que complementan sus dietas proveyéndolos de aminoácidos esenciales o vitaminas (3, 4). En general estas asociaciones simbióticas son obligadas ya que estos microorganismos son esenciales para completar el ciclo vital del insecto y se transmiten verticalmente a través del ovario a la descendencia (5, 6, 7, 8, 9, 10). En Argentina, *Delphacodes kuscheli* Fennah (Familia Delphacidae) y *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Familia Cicadellidae) son dos chicharritas que revisten importancia fitosanitaria por vehicular patógenos al cultivo de maíz al cual le provocan cuantiosas pérdidas económicas. *D. kuscheli* es una especie nativa con capacidad vectora del virus causal del "Mal de Río Cuarto del maíz" (MRC) (11) y actualmente considerada como la principal especie vectora natural de ese patógeno (12, 13, 14).

Dalbulus maidis, especie endémica de regiones tropicales registrada por primera vez en Argentina en 1990 (15), es la especie vectora más importante del *Spiroplasma kunkelii*, causal del "Achaparramiento del maíz" o "Corn Stunt *Spiroplasma*" (CSS) (16), que afecta al maíz en las regiones tropicales y subtropicales de América y que se ha ido expandiendo en Argentina desde el año 1997 (17, 18, 19).

Debido a la importancia de los microorganismos simbiotes en el ciclo vital de los insectos vectores y a la ausencia de estudios referidos a los endosimbiontes obligados de los auquenorrincos plagas presentes en la

zona maicera de nuestro país se propuso dar a conocer la localización y caracterización morfológica de los endosimbiontes obligados predominantes asociados a *D. kuscheli* y *D. maidis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cría de insectos

Los insectos provinieron de crías llevadas a cabo bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad (L: 16, D: 8); 24 °C ± 2; HR: 55-65 %) en el Bioterio de la División de Entomología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata. Los insectos fueron criados sobre sus hospedantes preferenciales: plantas de *Avena sativa* L. para *D. kuscheli* y plantas de *Zea mays* L. para *D. maidis*; las plantas fueron obtenidas desde la siembra de semillas en tierra fértil. Los ejemplares de *D. kuscheli* utilizados para fundar la colonia provinieron de muestreos realizados en Río Cuarto, provincia de Córdoba, zona endémica del MRCV mientras que los de *D. maidis* provinieron de muestreos llevados a cabo en El Manantial, localidad de la provincia de Tucumán, zona agroecológica del Chaco Subhúmedo durante las campañas 2009-2010.

Localización y caracterización morfológica de endosimbiontes

Para la obtención de cortes histológicos se utilizaron hembras adultas de ambas especies obtenidas de la cría experimental. Los ejemplares, luego de ser anestesiados con éter etílico, fueron desprovistos de sus alas y patas con ayuda de pinzas de punta fina; posteriormente se llevó cabo la fijación de los mismos en glutaraldehído (2%), post-fijación en tetróxido de osmio (1%), deshidratación en una serie creciente de etanol (50-100%) e inclusión en resina Epoxi por 36 hs a 35°, 50° y

60°C. De este material se realizaron tanto cortes semifinos (2-3 µm) como secciones ultrafinas (60 nm) utilizando un ultramicrotomo Ultracut Reichert J-Supernova provisto de una cuchilla de diamante. Los cortes semifinos se colorearon con 0,05% de azul de toluidina O y se examinaron con un microscopio de luz Nikon YS2-H equipado con una cámara digital Nikon D40. Las secciones ultrafinas (60 nm) se montaron en grillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación con un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 1200 EX II. Las microfotografías se tomaron con una cámara digital Erlangshen ES 1000W. Para la descripción de los bacteriomas de *D. maidis* además se llevó a cabo la disección de hembras adultas con agujas entomológicas bajo un microscopio estereoscópico.

RESULTADOS

Localización de endosimbiontes en ambas especies.

Delphacodes kuscheli presenta endosimbiontes de tipo levaduriforme, de 10 a 12 µm de longitud que se reproducen por brotación. Estos se distribuyen en el tejido graso abdominal y en el polo posterior de los ovocitos primarios. Estudios de la ultraestructura evidenciaron que presentan una pared celular gruesa conformada por dos capas, una externa electrodensa de aproximadamente 30 nm de espesor y una capa interna menos electrodensa y de mayor espesor, aproximadamente 100 nm (Fig. 1).

Dalbulus maidis presenta órganos pares (bacteriomas) alojados en la cara lateral interna de los primeros segmentos abdominales. Estos órganos poseen un aspecto arriñonado, miden aproximadamente 0,06 mm de largo, su color es blancuzco y

presentan una zona amarillenta. Los estudios microscópicos mostraron que los bacteriomas están formados por células uninucleadas y presentan una zona sincitial que contiene a bacterias de forma irregular y de gran tamaño (3-4 µm de ancho y 8-12 µm de largo). Las mismas presentan cuerpos densos en su citoplasma y se encuentran rodeados de membranas (Fig. 2).

DISCUSIÓN

La morfología y la localización de los endosimbiontes presentes en *D. kuscheli* (Familia Delphacidae) indican que los mismos corresponderían a los endosimbiontes obligados del tipo levaduriforme conocidos como “yeast-like symbionts” que han sido descritos en otras especies de auquenorrincos particularmente de la familia Delphacidae (20, 21, 22, 23). Si bien este tipo de simbiosis son los predominantes en las especies de esta familia, también han sido registrados en especies pertenecientes a la familia Cicadellidae (10). En *D. maidis* (Familia Cicadellidae) los endosimbiontes obligados se encuentran en bacteriomas, cuya morfología y ubicación en el huésped permiten relacionar a estos órganos con los hallados en otras especies de la familia (24, 25). Asimismo la morfología de los microorganismos alojados en la zona sincitial del bacterioma se asemeja a la descrita para organismos endosimbiontes observados en otras especies de Cicadellidae (25, 26).

El ciclo vital de las chicharritas no puede completarse sin la intervención de los endosimbiontes obligados los cuales complementan sus dietas proveyéndolos de aminoácidos esenciales y vitaminas. En este marco, estudios recientes realizados sobre especies de delfácidos consideradas plagas del arroz en Asia discuten la factibilidad de la utilización de estos

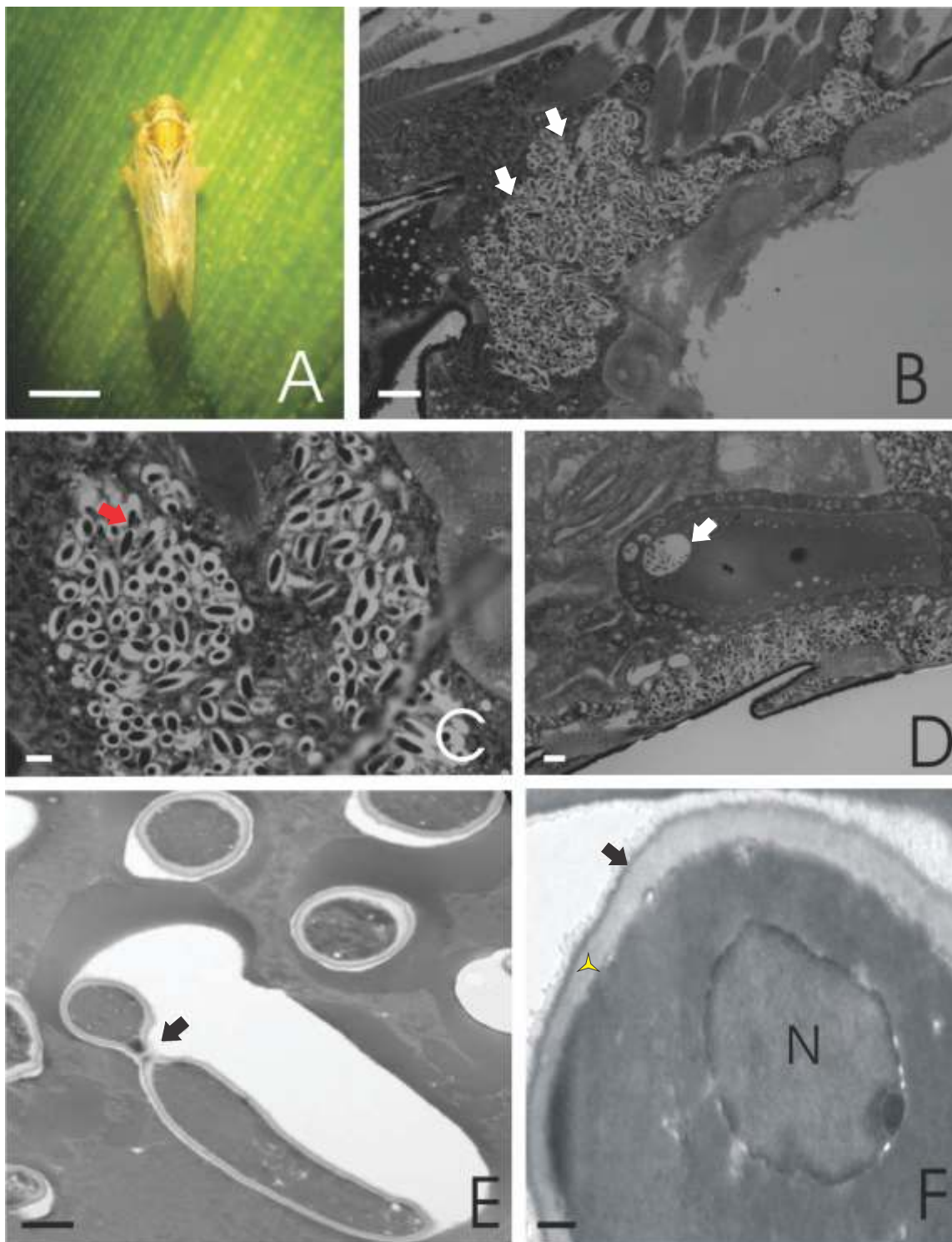


Figura 1. A: Ejemplar hembra de *Delphacodes kuscheli*. Escala: 0,1 mm. B-D Cortes histológicos observados con microscopía óptica. Escala: 10 μ m. B: Las flechas indican los "yeast-like symbionts" (YLS) formando agregados en el cuerpo graso abdominal. C: Detalle de los endosimbiontes mostrando el aspecto baciliforme y la reproducción por brotación (flecha). D: YLS alojados en el polo posterior del ovocito. E-F Microfotografías observadas con microscopio electrónico de transmisión. E: endosimbiontes unicelulares alojados en el tejido graso abdominal y reproducción por brotación (flecha). Escala: 1 μ m. F: Detalle de la pared celular del endosimbionte mostrando la diferente densidad de la capa externa (flecha) e interna (\blacktriangle). N = núcleo. Escala: 0,2 μ m.

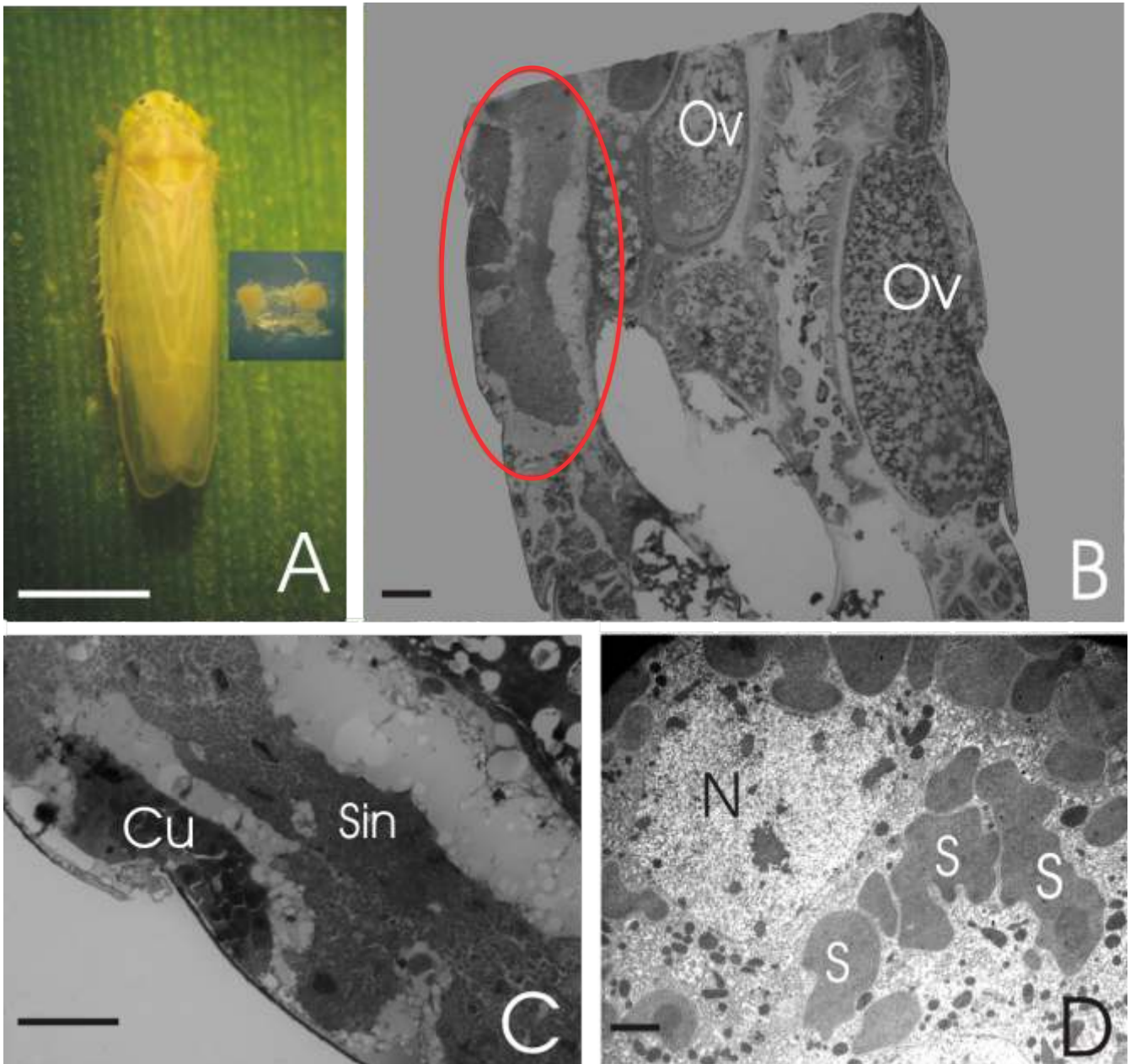


Figura 2. A: Ejemplar hembra de *Dalbulus maidis*. Detalle de los bacteriomas extraídos bajo microscopio estereoscópico desde la parte lateral interna de los primeros segmentos abdominales. Escala: 0,1 mm. B: Corte longitudinal del abdomen mostrando la ubicación del bacterioma (delimitado con línea curva roja) en proximidad con los ovocitos (Ov). Escala: 50 μ m. C: Detalle del bacterioma mostrando las células uninucleadas (Cu) y el sincitio (Sin) que aloja bacterias simbiotes. Escala: 25 μ m. D: Microfotografía tomada a partir de la observación con microscopio electrónico de transmisión. Detalle de la zona sincitial con bacterias simbiotes (S) de forma irregular y gran tamaño. N = núcleo. Escala: 2 μ m.

simbiontes en el manejo integrado de estas plagas (27, 28). Los resultados del presente trabajo aportan información básica para futuros estudios que prevén la disminución experimental de estos endosimbiontes a fin de conocer su efecto en la dinámica poblacional de las especies de chicharritas vectoras. El estudio de los endosimbiontes obligados que viven asociados con los auquenorrincos vectores de enfermedades al cultivo de maíz en la Argentina forma parte de una nueva línea de investigación que tiene como objetivo conocer, a través de estudios moleculares, la identidad taxonómica de estos microorganismos y su rol en el ciclo vital de los vectores.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el FONCYT-PICT-2007-00143-03 y la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Bs As (CIC). Agradecemos al Dr. E. Virla por coleccionar los ejemplares de *Dalbulus maidis* utilizados para el establecimiento de la cría en laboratorio. Los estudios de microscopía electrónica de transmisión se realizaron a partir del material procesado en el Servicio de Microscopía Electrónica de Transmisión de la FCV-UNLP. Especialmente expresamos nuestro agradecimiento a la Dra. Ana Marino de Remes Lenicov por las sugerencias realizadas durante la revisión del presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moran NA (1998) Bacteriocyte-associated symbionts of insects. *Bioscience* 48: 295-304.
2. Sandstrom JP, Moran NA (1999) How nutritionally imbalanced is phloem sap for aphids? *Entomol Exp Appl* 91: 203-210.
3. McCutcheon JP, Moran NA (2007) Parallel genomic evolution and metabolic interdependence in an ancient symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19392-19397.
4. McCutcheon JP, McDonald BR, Moran NA (2009) Convergent evolution of metabolic roles in bacterial co-symbionts of insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:15394-15399.
5. Buchner P (1965) *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms* Interscience Publishers, New York.
6. Cheng DJ, Hou RF (2001) Histological observations on transovarial transmission of a yeast-like symbiote in *Nilaparvata lugens* Stal (Homoptera: Delphacidae). *Tissue Cell* 33: 273-279.
7. Moran NA (2003) Intracellular symbionts of sharpshooters (Insecta: Hemiptera: Cicadellinae) form a distinct clade with a small genome. *Environ Microbiol* 5: 116-126.
8. Moran NA, Tran P, Gerardo NM (2005) Symbiosis and Insect Diversification: an ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial Phylum Bacteroidetes. *Appl Environ Microb* 71: 8802-8810.
9. Müller HJ (1962) Neure vorstellungen uber verbreitung und phylogenie der endosymbiosen der Zikaden. *Z Morph Okol Tiere* 51:190-210.
10. Sacchi L, Genchi M, Clementi E, Bigliardi E, Avanzati AM, Pajoro M, Negri I, Marzorati M, Gonella E, Alma A, Daffonchio D, Bandi C (2008) Multiple symbiosis in the leafhopper *Scaphoideus titanus* (Hemiptera: Cicadellidae). Details of transovarial transmission of *Cardinium* sp. and yeast-like endosymbionts. *Tissue Cell* 40: 231-242.
11. Remes Lenicov AMM de, Tesón A, Dagoberto E, Hugué N (1985) Hallazgo de uno de los vectores del "Mal de Río Cuarto del maíz". *Gaceta Agropecuaria VXXV*: 251-258.
12. Remes Lenicov AMM de, Laguna G, Rodríguez Pardina P, Mariani R, Virla E, Herrera P, Dagoberto E (1999) Diagnóstico del virus del "Mal de Río Cuarto" y sus vectores en maíz, en Argentina. *Manejo Integrado de Plagas, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE)* (eds) Costa Rica, Turrialba, pp. 36-46.
13. Remes Lenicov AMM de, Paradell S (2012) Morfología y biología de especies vectoras de virus y mollicutes al maíz en la Argentina (Insecta-Hemiptera: Cicadomorpha-Fulgoromorpha). En: *Enfermedades del maíz producidas por virus y mollicutes en Argentina*. Giménez Pecci M.P, Laguna G. & Lenardón SL (eds) INTA, Buenos Aires, pp. 82-101.
14. Laguna G, Remes Lenicov AMM de, Virla E, Avila AO, Giménez Pecci MP, Herrera P, Garay J, Ploper D, Mariani R (2002). Difusión del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) del maíz, su vector, delfácidos asociados y huéspedes alternativos en la Argentina. *Rev Soc Ent Arg* 61(1-2):87-97.
15. Virla E, Remes Lenicov AMM de, Paradell S (1990). Presencia de *Dalbulus maidis* sobre maíz y teosinte en la República Argentina (Insecta-Homoptera- Cicadellidae). *Rev Fac de Agr La Plata* 66-67: 23-30.
16. Nault LR, Ammar ED (1989) Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. *Annu Rev Entomol* 34: 503-529.
17. Giménez Pecci MO, Laguna IG, Ploper D, Marino de Remes Lenicov AM, Paradell S, Virla E (1997). Avance del Corn Stunt del maíz en el Norte Argentino. *Rev Avance Agro Industrial EEAOC* 18 (71): 31-33.

18. Giménez Pecci MP, Laguna IG, Avila A O, Marino de Remes Lenicov A M, Virla E., Borgogno C., Nome C F, Paradell S (2002) Difusión del *Corn Stunt Spiroplasma* del maíz (*Spiroplasma kunkelii*) y del vector (*Dalbulus maidis*) en la República Argentina. Rev Fac de Agr La Plata 105 (1-8).
19. Carloni E, Carpane P, Paradell S, Laguna I, Giménez Pecci MP (2013) Presence of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) and of *Spiroplasma kunkelii* in the temperate region of Argentina. J Econom Entomol 106 (4): 1574-1581.
20. Noda H, Nakashima N, Koizumi M (1995) Phylogenetic position of yeast like symbiotes of rice planthoppers based on partial 18S r DNA sequences. Insect Biochem Molec Biol 25: 639-646.
21. Cheng DJ, Hou RF (1996) Ultrastructure of the yeast like endocytobiont in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). (Homoptera: Delphacidae). Endocytobiosis & Cell Res 11: 107-117.
22. Suh SO, Noda H, Blackwell M (2001) Insect symbiosis: derivation of yeast-like endosymbionts within an entomopathogenic filamentous lineage. Mol Biol Evol 18: 995-1000.
23. Xet-Mull AM, Quesada T, Espinoza AM (2004) Phylogenetic position of the yeast-like symbiotes of *Tagosodes orizicolus* (Homoptera: Delphacidae) based on 18S ribosomal DNA partial sequences. Rev Biol Trop 52: 373-381.
24. Galindo Miranda N (1994). Los micetomas: un análisis morfofisiológico de su interacción con los Cicadellidae (Homoptera). Folia Entomol Mex 92: 1-8.
25. Noda H, Watanabe K, Kawai S, Yukuhiro F, Miyoshi T, Tomizawa M, Koizumi Y, Nikoh N, Fukatu T (2012) Bacteriome-associated endosymbionts of the green rice leafhopper *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae). Appl Entomol Zool 47: 217-225.
26. Ishii Y, Matsuura Y, Kakizawa S, Nikoh N, Fukatsua T (2013) Diversity of bacterial endosymbionts associated with *Macrosteles* Leafhoppers Vectoring Phytopathogenic Phytoplasmas. Appl Environ Microbiol 79: 5013-5022.
27. Chen YH (2009) Variation in planthopper-rice interactions: possible interactions among three species? En Planthoppers: new threats to the sustainability of intensive rice production systems in Asia, Heong KL & Hardy B (eds). Los Baños (Philippines), pp. 315-326.
28. Hughes G L, Allsopp PG, Webb RI, Yamada R, Iturbe-Ormaetxe I, O'Neill S (2011) Identification of yeast associated with the planthopper, *Perkinsiella saccharicida*: Potential Applications for Fiji Leaf Gall Control. Curr Microbiol 63(4): 392.