



Foto: Sebastián Bogliacino

BUSCANDO ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE PLAGAS: nuevos bioplaguicidas basados en interferentes del ARN (ARNi)

Lic. Bioq. MSc. Claudia Schwartzman¹,
Téc. Vitiv. Sara Murchio¹, Biol. MSc. PhD. Ximena Cibils²,
Ing. Agr. MSc. Dra. Valentina Mujica³,
Téc. Agr. Mabel Pessio²,
Ing. Agr. PhD. Marco Dalla Rizza¹

¹Mejoramiento Genético y Biotecnología Vegetal,
Sistema Agrícola Ganadero, INIA Las Brujas

²Entomología, Sistema Agrícola Ganadero,
INIA La Estanzuela

³Sistema Vegetal Intensivo, INIA Las Brujas

El presente artículo pone el foco en una nueva biotecnología que INIA se encuentra evaluando para el control de la chinche de la soja. Los bioplaguicidas basados en ARNi forman parte de una estrategia de manejo de plagas amigable con el ambiente y con bajo impacto en especies no blanco, requerimientos necesarios para una agricultura sostenible.

En el contexto de una agricultura sostenible, basada en prácticas y tecnologías que combinan la eficacia agronómica con una huella ambiental mínima, la biotecnología está abordando la sustitución de fitosanitarios para el control de plagas. Nuestro grupo de trabajo se encuentra enfocado en buscar alternativas de control a la chinche *Piezodorus guildinii*, que afecta el cultivo de la soja, con estrategias basadas en ARN de interferencia (ARNi). ARNi es un mecanismo celular que ocurre naturalmente en eucariotas mediado por

moléculas de ARN de doble cadena (dsARN) y pequeños ARN (sARN) que desencadena el silenciamiento génico. Si este proceso se dirige a genes esenciales puede tener efectos en la viabilidad y, consecuentemente, el ARNi surge como una tecnología para el control de plagas. El desarrollo de esta tecnología involucra la identificación de genes blanco, el diseño de moléculas de ARN secuencia- específica de especie, y el desarrollo de bioensayos y pruebas en campo que permitan evidenciar su uso como potencial bioplaguicida.

IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE SOJA EN URUGUAY

La soja es el principal cultivo extensivo de secano en Uruguay. La zafra 2021/22 alcanzó un total de 1.165.000 ha, con un total aproximado de 3.000 productores, con un rendimiento medio de 2,8 toneladas por hectárea (siendo el tercer registro histórico más alto) (1). El 85 % de soja de primera y casi la totalidad de la soja de segunda se ubican en la región litoral y en la última zafra cerrada (2021/22) el valor agregado por el complejo oleaginoso superó los USD 1.577 millones, implicando un 2,8 % del valor agregado total de la economía (considerando toda la cadena de oleaginosos en la que la soja ocupa el 90 %), el valor más alto desde que se tienen registros (1). Esto generó transferencias al resto de la economía de alrededor de USD 334 millones (1).

A nivel regional, el cultivo ocupa una importancia relativa, determinando que Sudamérica alcance alrededor del 55 % de producción global de soja (2). No obstante, el uso de fitosanitarios para el control de plagas, malezas y enfermedades en el cultivo es un tema que tiene consecuencias económicas, ambientales y sociales. En el caso de Uruguay, desde hace al menos cinco zafras se tiene registros de que se realizan, en promedio, cinco y cuatro aplicaciones en cultivos de primera y segunda respectivamente, de los cuales dos, son para el control de insectos, especialmente hemípteros fitófagos, comúnmente conocidos como chinches (1).

EL COMPLEJO DE CHINCHES EN SOJA

El complejo de chinches constituye la mayor amenaza para cultivo de soja en toda la región causando un daño directo e irreversible sobre las semillas en desarrollo. En nuestro país, coexisten cuatro especies que, en orden de importancia por su abundancia y los daños que ocasionan, son: la 'chinche de la alfalfa' *Piezodorus guildinii* (Westwood), la 'chinche verde' *Nezara viridula* (Linnaeus), la 'chinche barriga marrón' *Dichelops furcatus* (Fabricius) y la 'chinche de las huertas' *Edessa meditabunda* (Fabricius). Los daños generados por chinches en la semilla resultan de la frecuencia de su picado en conjunto con la duración del período alimenticio, proceso en el que inyectan secreciones salivales que licúan el contenido del grano culminando con la succión de sus contenidos.

Como resultado se produce aborto y deformación de granos, pérdida de vigor y disminución en la germinación (3). Se dan además cambios en la composición del grano, en el contenido de proteínas y en la calidad del aceite. *Piezodorus guildinii* (Figura 1) es la especie de mayor importancia económica en nuestro país debido a que es la más frecuente y la que tiene mayor capacidad de daño (4). *P. guildinii* coloniza el cultivo cuando se inicia la formación de vainas y lo abandonan en el momento de la cosecha, siendo el período de mayor daño desde el inicio del estado R4 hasta el llenado del grano (R5).

El control actual está basado en la aplicación de insecticidas en base a mezclas de piretroides y neonicotinoides. Sin embargo, se ha demostrado que estos insecticidas impactan negativamente en enemigos naturales, son particularmente nocivos para abejas y tienen un efecto perjudicial en el ambiente (5). Además, el manejo de las chinches es complejo debido a que pueden causar daños económicos en bajos niveles de población (eficiente dispersión de adultos), y tienen una tolerancia intrínseca a los insecticidas de uso común, por lo que es frecuente la necesidad de realizar aplicaciones adicionales de insecticidas para mantener las poblaciones debajo de los niveles de daño económico (6).

EL ARNi COMO FORMA DE CONTROL

El uso del ARNi como plaguicida se ha convertido en un candidato prometedor para el desarrollo de estrategias de control de base biológica, ofreciendo una excelente especificidad en especies blanco y gestión sostenible de plagas que afectan a la agricultura. A diferencia de pesticidas convencionales, el control basado en ARNi utiliza mecanismos moleculares propios de las especies blanco para iniciar el silenciamiento de genes esenciales. Consecuentemente, este mecanismo impulsa la degradación del ARN mensajero para bloquear la producción de proteínas específicas y así inhibir el crecimiento, desarrollo o viabilidad, dependiendo del gen blanco y la etapa de desarrollo. Es interesante como este mecanismo puede desencadenarse luego de

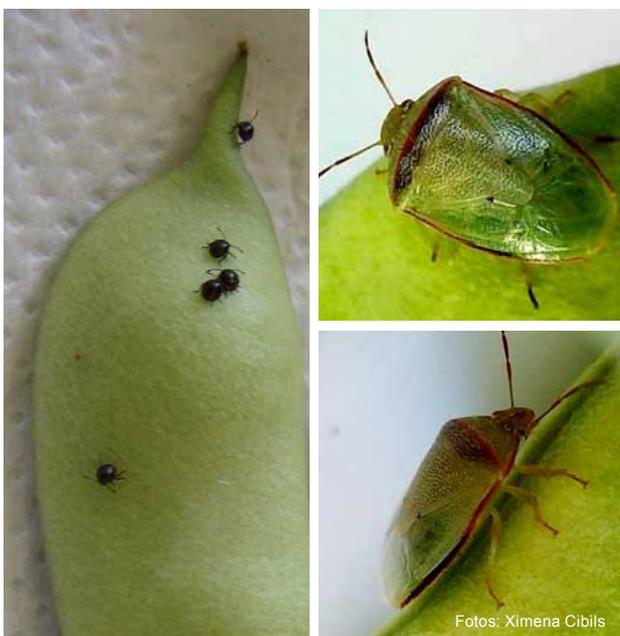


Figura 1 - Chinche de la alfalfa *Piezodorus guildinii*. Izquierda ninfas, derecha adultos.

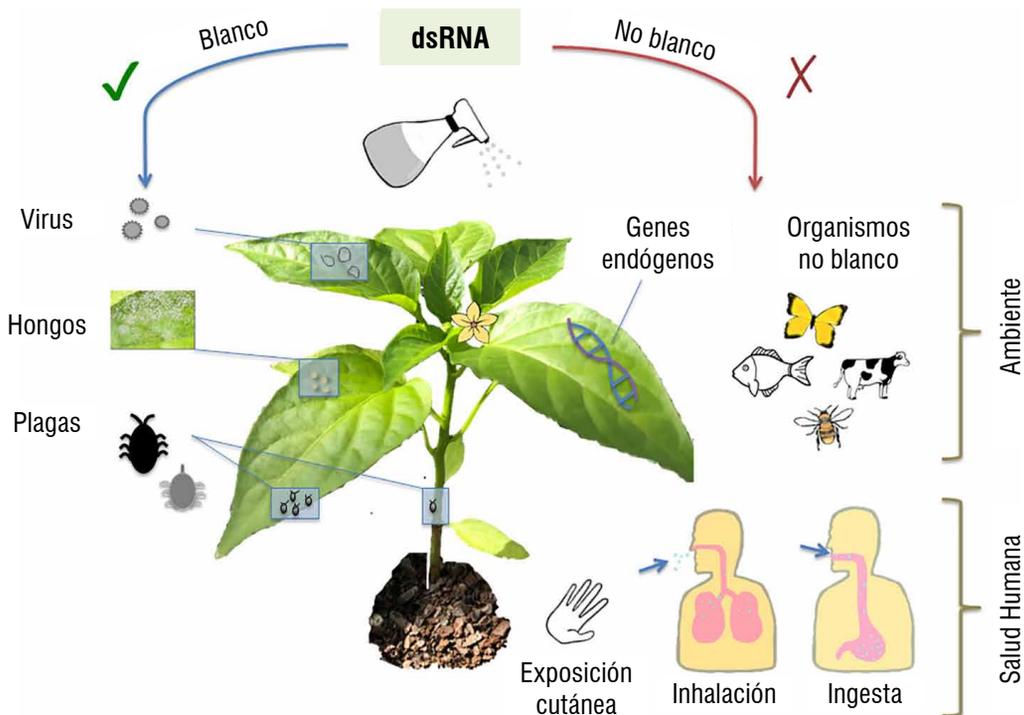


Figura 2 - RNA de interferencia como bioplaguicida. La aplicación tópica de moléculas de dsRNA puede ser dirigida a diferentes tipos de plagas (virus, hongos, insectos). La especificidad de las secuencias seleccionadas lleva a que no tenga un efecto nocivo en el ambiente, sobre especies no blanco así como en la salud humana. Editado de Fletcher *et al.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00051>

ser ingerido por los insectos blanco tras una aplicación tópica (Figura 2). Debido a su diseño relativamente fácil, su origen natural, alta especificidad y aplicabilidad a una amplia gama de plagas, los bioplaguicidas basados en ARNi constituyen una tecnología prometedora. El silenciamiento génico inducido por pulverización (SIGS), basado en la aplicación exógena de moléculas de ARN en las plantas, puede ser especialmente útil para reducir el impacto de plagas y aumentar el rendimiento agronómico de los cultivos (7).

ARNi EN EL CONTROL DE PIEZODORUS GUILDINII WESTWOOD

En 2019, nuestro grupo comenzó a trabajar en el proyecto INNOVAGRO FSA_1_2018_1_151855 ‘RNAi como una alternativa al uso de pesticidas en el control de chinches de la soja’ financiado por ANII, focalizado en generar estrategias para el control de *Piezodorus guildinii* utilizando ARNi.

El manejo de las chinches es complejo debido a que pueden causar daños económicos a bajos niveles de población (eficiente dispersión de adultos) y tienen una tolerancia intrínseca a los insecticidas de uso común.

El complejo de chinches constituye la mayor amenaza para cultivo de soja en toda la región causando un daño directo e irreversible sobre las semillas en desarrollo.

Este proyecto se basó en resultados auspiciosos de trabajos previos en ARNi en otras chinches (*N. viridulans*, *E. heros*). En primer lugar, se estudió el transcriptoma del insecto, es decir, se secuenciaron y ensamblaron todos los ARNm expresados de *P. guildinii*. Este análisis bioinformático nos permitió, por un lado, estudiar los componentes relacionados a la interferencia por ARN y, por otro, nos facilitó información para el diseño de moléculas candidatas a evaluar. Se diseñaron y sintetizaron 11 moléculas a partir de secuencias específicas de *P. guildinii* con blanco en genes esenciales y se evaluó el efecto de la administración de estas moléculas por inyección con el seguimiento de la mortalidad durante 14 días (8).



Fotos: Claudia Schwartzman

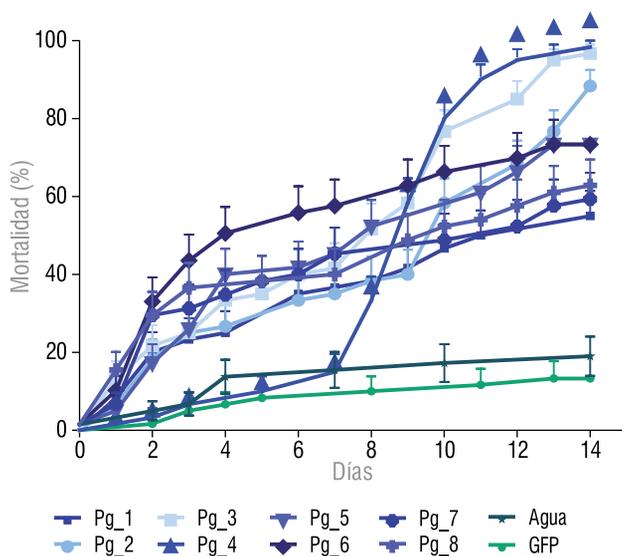


Figura 3 - Evaluación de ARNi en ensayos de inyección. Grupos tratados con dsARN dirigidos a genes esenciales de *P. guildinii* se muestran en azul, grupos control tratados con agua o un dsARN-GFP en verde.

De los tratamientos evaluados, nueve mostraron diferencias significativas respecto a los controles, llegando algunos candidatos a un 98 % de mortalidad acumulada a los 14 días (Figura 3).

Seleccionamos los tres candidatos de mayor actividad y realizamos ensayos de ingesta, donde pudimos verificar nuevamente diferencias significativas respecto a los controles, llegando a una mortalidad corregida del 50 % a los 14 días post-ingesta.

En todos los casos, confirmamos que los insectos tratados redujeron los niveles de expresión del gen blanco, evaluando los niveles relativos de ARNm mediante RT-qPCR. Estos resultados muestran, por primera vez, que esta estrategia tiene un efecto en la viabilidad de los adultos y son promisorios en el desarrollo de compuestos basados en ARN para el control de *P. guildinii*.

PRÓXIMOS PASOS

Una de las principales dificultades en el desarrollo de formulaciones comerciales basadas en ARN es la sensibilidad a la degradación, tanto por enzimas del huésped, así como factores ambientales como la lluvia o la radiación UV, que reducen su eficacia. Varias estrategias se han desarrollado para superar estas dificultades, como el encapsulamiento en vesículas lipídicas (liposomas), la generación de complejos con agentes quelantes, o la modificación química del ARN.

Nuestro grupo de trabajo está generando acuerdos estratégicos con la empresa de biotecnología NanoSUR (www.nanosur.com/), quien cuenta con la tecnología para generar ARN modificado químicamente resistente a degradación.

Una vez confirmada la actividad de la formulación de NanoSUR mediante nuevas pruebas de ingesta, se escalará la producción con el fin de evaluar el producto en planta.

CONCLUSIONES

Esta tecnología es considerada la nueva ola de protección de cultivos en el mundo y está siendo evaluada en INIA para evaluar su contribución en el control de la chinche de la soja. Reúne características de innovación abierta en INIA e interacción con empresas biotecnológicas que son socios naturales para llegar al mercado. Se trata de una estrategia de manejo de plagas amigable con el ambiente y con bajo impacto en especies no blanco, requerimientos necesarios para una agricultura sostenible. Cabe destacar, además, que para la implementación de esta tecnología de forma tópica es clave el desarrollo de marcos regulatorios, la identificación de riesgos y el establecimiento de estrategias de prevención y mitigación.

REFERENCIAS

- 1 - Fernández. 2022. 10 Encuentro Nacional de la Mesa de Oleaginosos
- 2 - Ferraro, *et al.* 2017. *Ecol Indic*, vol. 83, pp. 328–337,
- 3 - Panizzi, *et al.* 2000. *Heteroptera of Economic Importance*, CRC Press, Boca Raton, FL., USA
- 4 - Zerbino, *et al.* 2016 *Neotrop Entomol*, vol. 45, no. 2, pp. 114–122
- 5 - Giorio, *et al.* 2021 *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 28, no. 10, pp. 11709–11715
- 6 - Zerbino & Panizzi, 2019. *Arthropod Plant Interact*, no. 0123456789
- 7 - Cagliari, *et al.* 2019. *Front Plant Sci*, <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01319>
- 8 - Schwartzman *et al.* (2022). *Front. Plant Sci.* 13. doi: 10.3389/fpls.2022.804839