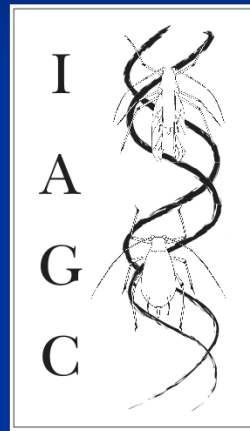


International Aphid Genomics Consortium



Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva
Universitat de València

Aphid Genomics Workshop

(Paris, junio 2003)

- INRA (Francia)
- SCRI (Reino Unido)
- Rothamsted (Reino Unido)
- University of York (Reino Unido)
- Imperial College (Reino Unido)
- **Universitat de València (España)**
- University of Jena (Alemania)
- RIKEN (Japón)
- University of Tokyo (Japón)
- CSIRO (Australia)
- Universidad Austral (Chile)
- University of Maryland (EEUU)
- Ithaca College (EEUU)
- University of Arizona (EEUU)
- Princeton University (EEUU)

IAGC Steering Committee

- M. Caillaud (Ithaca College, USA)
- O. Edwards (CSIRO, Australia)
- L. Field (BBSRC, UK)
- D. Giblot-Ducray (INRA, France)
- S. Gray (Cornell University, USA)
- D. Hawthorne (University Maryland, USA)
- W. Hunter (USDA-FL, USA)
- G. Jander (BTRI, USA)
- N. Moran (University Arizona, USA)
- **A. Moya** (**Universitat de València, España**)
- A. Nakabachi (RIKEN, Japan)
- H. Robertson (University Illinois, USA)
- K. Shufran (USDA-OK, USA)
- J.C. Simon (INRA, France)
- D. Stern (Princeton University, USA)
- D. Tagu (INRA, France)



“White paper”
on
aphid
genomics

Objetivos generales del IAGC

- Secuenciación del genoma de una especie modelo
- Desarrollo de recursos genómicos en pulgones
 - Construcción de genotecas de cDNA específicas
 - Secuenciación de ESTs
 - Desarrollo de chips de DNA
- Acceso libre e inmediato a los recursos

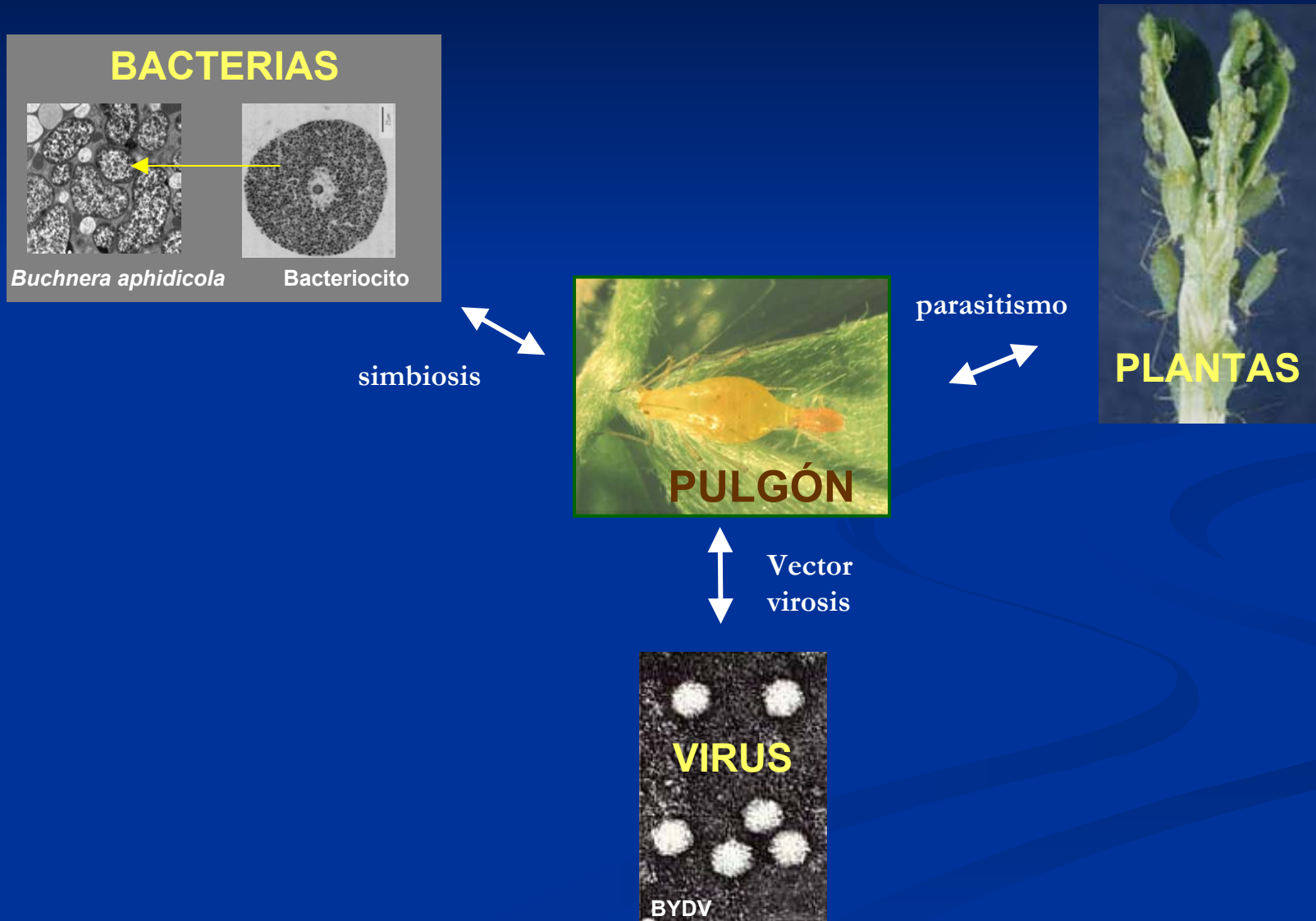
<http://www.eco.princeton.edu/mailman/listinfo/aphidgenomics>

Biología de los pulgones

- Familia Aphididae, orden Hemiptera
- Aspectos interesantes de su biología
 - Centro de varias interacciones (simbiosis, parasitismo)
 - Ciclos vitales complejos
- Agricultura: varias especies plaga



■ Centro de varias interacciones

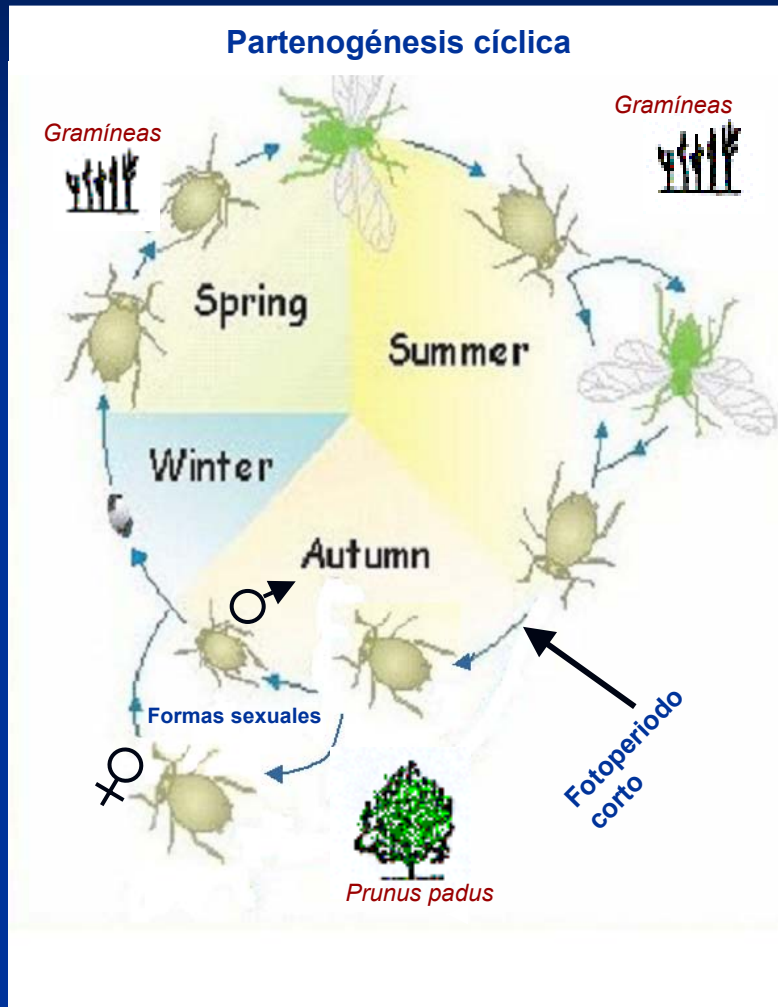


Biología de los pulgones

- Familia Aphididae, orden Hemiptera
- Aspectos interesantes de su biología
 - Centro de varias interacciones (simbiosis, parasitismo)
 - Ciclos vitales complejos
- Agricultura: varias especies plaga

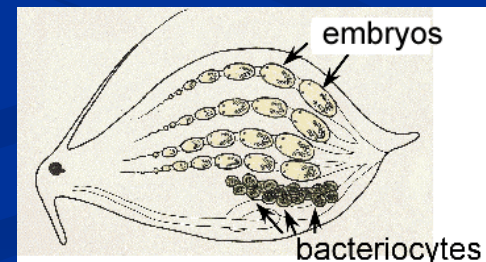


■ Ciclos de vida complejos



■ Cuestiones de interés práctico

- Manipulación del ciclo en el laboratorio
- Mantenimiento indefinido de "clones"
 - Stocks genéticos (sin necesidad de equilibradores)
 - Estudio de interacciones genotipo-ambiente (réplicas indefinidas)
- Reproducción rápida
 - Partenogénesis (viviparidad)
 - Generaciones "telescópicas"



Biología de los pulgones

- Familia Aphididae, orden Hemiptera
- Aspectos interesantes de su biología
 - Centro de varias interacciones (simbiosis, parasitismo)
 - Ciclos vitales complejos
- Agricultura: varias especies plaga



■ Agricultura: varias especies plaga

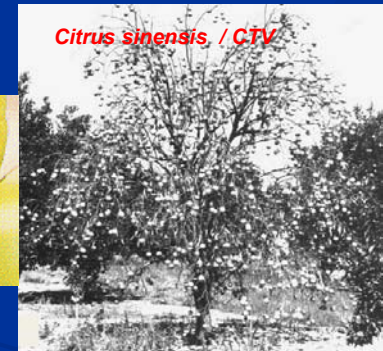
■ Daños directos

- Desvío de nutrientes
- Alteraciones de la fisiología de la planta (secreción de saliva)



■ Daños indirectos

- Producción de melaza (crecimiento de hongos)
- Vectores de virosis (BYDV, PLRV, CTV, etc...)



■ Agricultura: varias especies plaga

- *Rhopalosiphum padi*
- *Sitobion avenae*
- *Schizaphis graminum*
- *Diuraphis noxia*
- *Myzus persicae*
- *Macrosiphum euphorbiae*
- *Aphis gossypii*
- *Aphis fabae*
- *Aphis spiraecola*
- *Toxoptera citricida*
- *Toxoptera aurentii*



Detectado en Méjico (1980)

Pérdidas 120 millones \$ /año en EEUU

BYDV, factor biótico más importante responsable de las pérdidas en cereal en America, Europa del Norte, Australia y zonas de Africa



Myzus persicae, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aphis gossypii*, causan pérdidas de hasta el 50% de las cosechas de patatas sobre todo por la transmisión de virus (PVA,M,Y ; PLRV)

Genómica del pulgón: áreas de investigación beneficiarias

- Resistencia a insecticidas
- Transmisión de virosis
- Interacciones planta-pulgón
- Simbiosis
- Polifenismos
- Genómica comparativa

■ Resistencia a insecticidas

- Necesidad de controlar las poblaciones de pulgones
- Unas 20 especies han desarrollado resistencias a insecticidas actuales
- Mecanismos diversos
 - Incremento de enzimas detoxificantes
(esterasas, hidrolasas, glutathion transferasas, P450s)
 - Mutación de genes “diana”
(canal de sodio, acetilcolinesterasa, receptores GABA)
- En *Myzus persicae* se han descrito varios mecanismos
(esterasas elevadas, mutaciones en acetilcolinesterasas y canal de sodio)
- No se conocen todos los enzimas detoxificantes y proteínas diana
- El conocimiento del genoma permitirá la caracterización de todos los enzimas implicados en detoxificación y/o las proteínas diana de los insecticidas (p.ej. no se conocen las P450 o las GTS en pulgones)
- Permitirá estudiar cambios en la expresión a nivel genómico en respuesta a los (nuevos) insecticidas → identificación de genes adicionales



Genómica del pulgón: áreas de investigación beneficiarias

- Resistencia a insecticidas
- Transmisión de virosis
- Interacciones planta-pulgón
- Simbiosis
- Polifenismos
- Genómica comparativa

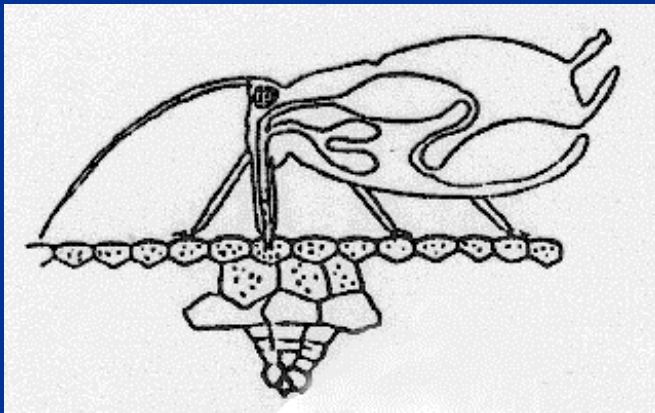
■ Transmisión de virus

- Los pulgones son vectores de cientos de virus de plantas
- La transmisión es consecuencia de la forma de alimentarse
 - Varias “pruebas” en el tejido epidérmico
 - Ingestión del floema
 - Inyección de saliva
- Dos tipos de virus
 - No circulativos (no persistentes) PVA, CMV
 - Circulativos (persistentes), BYDV, PLRV

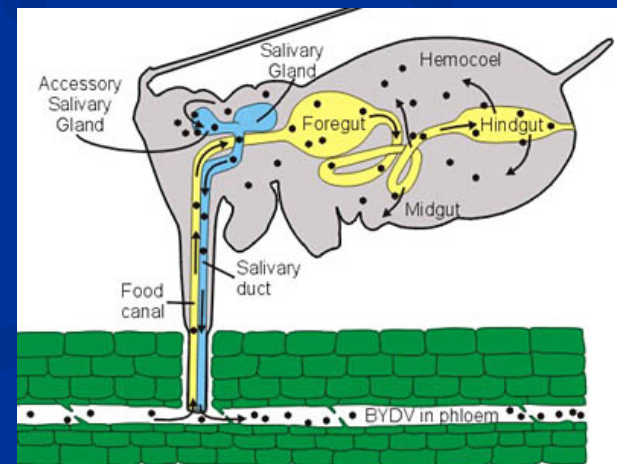


Interacciones moleculares específicas virus-pulgón

Virus no circulativos

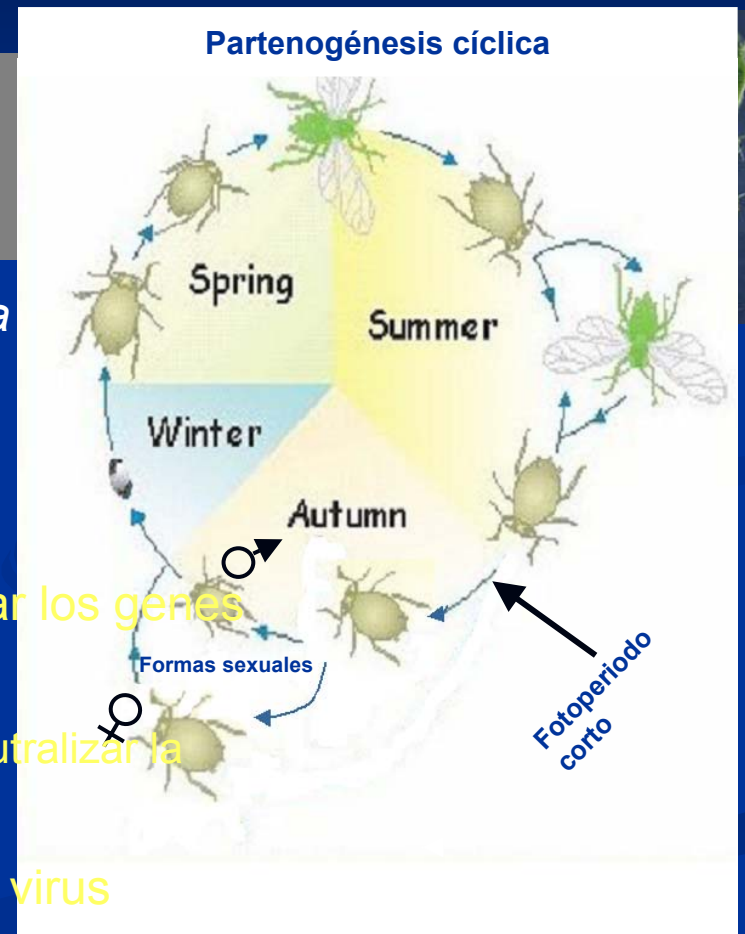


Virus circulativos



Transmisión de virus: factores relevantes

- Diferentes cepas de virus transmitidas con distinta eficiencia por diferentes pulgones
- Variabilidad en la susceptibilidad de diferentes variedades de plantas
- Se ha descrito la interacción entre *Buchnera* (proteína GroEL) y algunos virus (PLRV)
- Relevancia del ciclo de vida
- El genoma del pulgón contribuirá a identificar los genes implicados en la transmisión
(crucial para poder diseñar estrategias para neutralizar la transmisión de virus)
- Modelo para otros insectos transmisores de virus vegetales (mosca blanca)



Genómica del pulgón: áreas de investigación beneficiarias

- Resistencia a insecticidas
- Transmisión de virosis
- Interacciones planta-pulgón
- Simbiosis
- Polifenismos
- Genómica comparativa

■ Relaciones planta-pulgón



- Los pulgones presentan alta especificidad de huésped
 - especialización → divergencia genética y especiación (*A. pisum*)
 - Existen especies polífagas (*Myzus persicae*)
 - Algunas especies de plantas desarrollan resistencias a pulgones
 - (antibiosis, antixenosis, tolerancia)
 - En varias especies de pulgón se han descrito “biotipos” (*S. graminum*)
 - La identificación/aceptación de la planta huésped se basa en el olfato
 - Odorant-Binding Proteins (OBPs)
 - Quimiorreceptores (dominios transmembrana)
 - Transducción mediante GPCR
- } Familias génicas de evolución rápida
- Ideal: disponer de recursos genómicos para un pulgón y su planta huésped

Relaciones planta-pulgón

- Se dispone de recursos genómicos de plantas
 - *Arabidopsis* puede ser usada por *Myzus persicae*
 - *Medicago trunculata* es huésped de *Acyrtosiphon pisum* y *Myzus persicae*
 - 16.000 unigenes disponibles para *M. trunculata* (www.medicago.org)
 - genoma iniciado en 2003 (NSF Plant Genome Project 9872664)
 - Varios estudios sobre expresión en respuesta a los pulgones (microarrays)
- El desarrollo de recursos genómicos en pulgones permitirá
 - Estudios de respuesta del pulgón a defensas específicas de la planta
 - Caracterización de proteínas relacionadas con la elección de huésped (p.ej. OBPs, quimiorreceptores...)*
 - Estas proteínas podrían ser útiles para el control de las poblaciones



* Nota: en *Drosophila* y *Anopheles* hay unas 35 OBPs y 130 quimiorreceptores (en general son proteínas muy poco conservadas, específicas de especie)

Genómica del pulgón: áreas de investigación beneficiarias

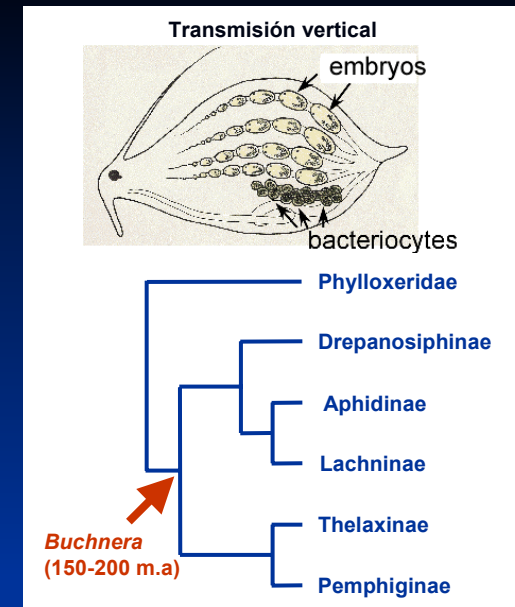
- Resistencia a insecticidas
- Transmisión de virosis
- Interacciones planta-pulgón
- Simbiosis
- Polifenismos
- Genómica comparativa

■ Simbiosis

■ *Buchnera aphidicola* (endosimbionte primario, obligatorio)

- Transmisión vía materna (estudios coevolución)
- Función nutricional (aminoácidos esenciales)
 - Sensibilidad al calor (determinan la distribución geográfica)
 - Protección de virus patógenos vegetales
- Modelo para el estudio de la simbiosis
- Se han secuenciado tres genomas
 - Reducción génica masiva (0,61-0,65 Mb)
 - No aparecen genes nuevos simbiosis-específicos
 - Algunos genes aparentemente esenciales están ausentes
 - Biosíntesis de fosfolípidos (membranas)
 - Ausencia de genes reguladores

■ **El genoma del pulgón permitirá identificar genes implicados en la simbiosis**



• ¿Cómo se regula la expresión génica en *Buchnera*?

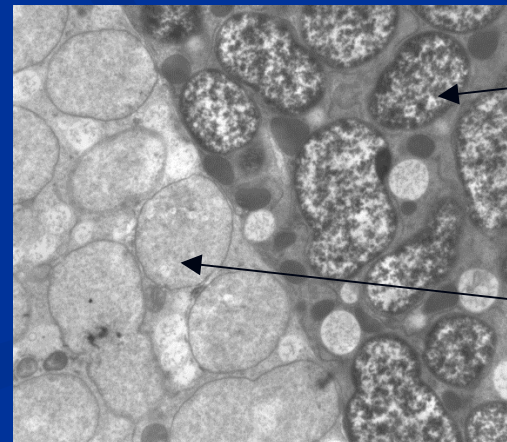
• ¿Cómo se coordina con las necesidades del pulgón?

• ¿Ha habido transferencia de genes al pulgón?

• ¿Cómo se regula la densidad de las poblaciones bacterianas?

■ Simbiosis

- Simbiontes facultativos (endosimbiontes secundarios)
 - Transmisión via materna
 - Localización variable (bacteriocitos secundarios, hemolinfa...)
 - En *A. pisum* se han descrito al menos 5 diferentes (3 son γ -proteobacteria)
 - Algunos confieren ventajas adicionales al pulgón (resistencia al calor, matan larvas de parasitoides...)
 - Modelo para el estudio de simbiosis incipientes



P-Symbiont
(*Buchnera*)

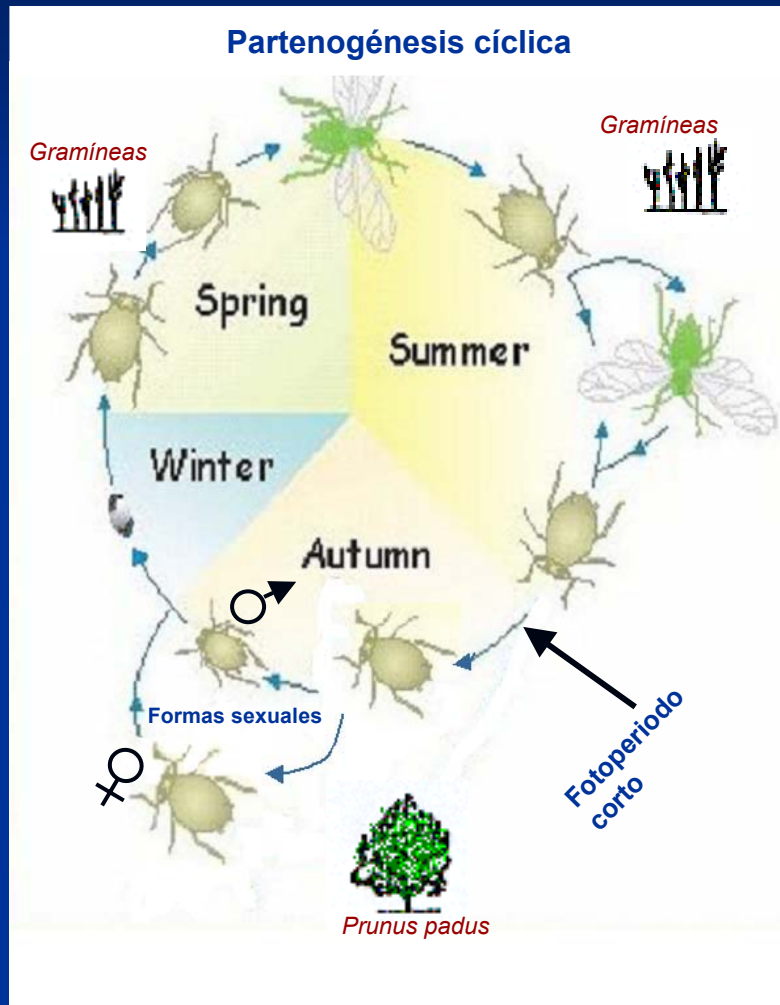
S-Symbiont

Genómica del pulgón: áreas de investigación beneficiarias

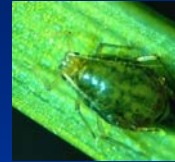
- Resistencia a insecticidas
- Transmisión de virosis
- Interacciones planta-pulgón
- Simbiosis
- Polifenismos
- Genómica comparativa

■ Polifenismos

(Múltiples fenotipos alternativos en respuesta a cambios ambientales)



■ Polifenismo alar (densidad)



Rhopalosiphum padi

■ Polifenismo reproductivo (fotoperiodo)



Rhopalosiphum padi

■ Polifenismo “nutricional”

■ Polimorfismos reproductivos

- Línejas partenogenéticas
- Estudios teóricos sobre el papel del sexo.

■ Las aproximaciones genómicas permitirán comprender la estructura genética de estos polifenismos

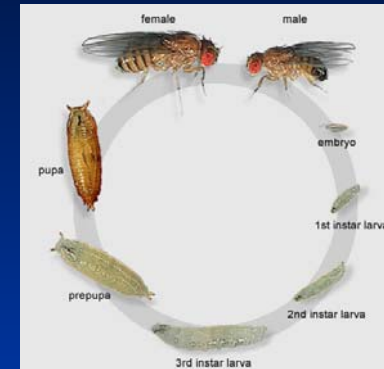
(y de los cambios genómicos asociados a la pérdida de la sexualidad)

Genómica del pulgón: áreas de investigación beneficiarias

- Resistencia a insecticidas
- Transmisión de virosis
- Interacciones planta-pulgón
- Simbiosis
- Polifenismos
- Genómica comparativa

■ Genómica comparativa

- Holometábolos (moscas, abejas, escarabajos, mariposas...)
 - Estadios inmaduros completamente diferentes al adulto (metamorfosis)



- Hemimetábolos (cucarachas, saltamontes, pulgones...)
 - Estadios inmaduros similares al adulto



- La secuencia del genoma del pulgón sería la primera de un hemimetábolo
 - Análisis comparativo con las secuencias de holometábolos existentes

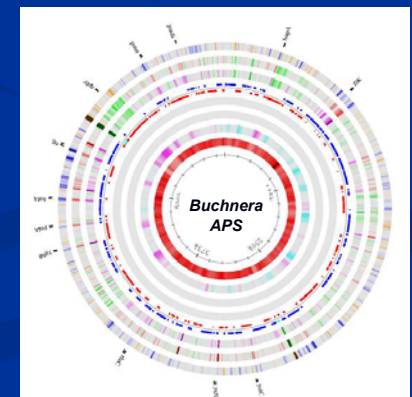
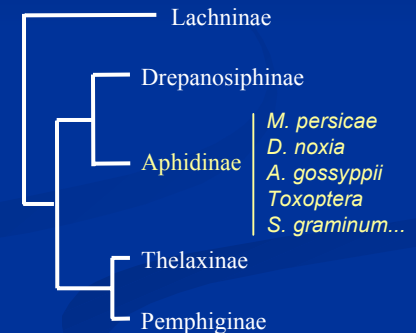
IAGC: objetivos concretos

- 1.- Secuenciación del genoma de *Acyrtosiphon pisum*
- 2.- Secuenciación de ESTs de *A. pisum*
- 3.- Desarrollo de mapas genéticos y físicos
- 4.- Establecer centros “stock” (mantenimiento de clones)
- 5.- Desarrollar una base de datos de libre acceso: “Aphidbase”

1.- Secuenciación del genoma de *A. pisum*

(Razones para la elección)

- *A. pisum*, la especie más utilizada en el laboratorio
 - Mantenimiento en un solo huésped todo el ciclo
 - Puede utilizar la especie *Medicago trunculata*
 - Posibilidad de utilizar dietas artificiales
- Próxima filogenéticamente a especies plaga (Aphidinae)
- Se dispone de mapas genéticos (preliminares)
- Su endosimbionte primario ampliamente caracterizado
- Existencia de cepas con diferentes características
 - Diferencias en preferencias por el huésped
 - Diferencias en respuesta al fotoperiodo...etc
- Datos relevantes:
 - Tamaño genoma haploide: 300 Mb
 - 4 pares de cromosomas holocéntricos



2.- Secuenciación de ESTs

- IAGC propone unos 100.000 ESTs a partir de genotecas de cDNA específicas

Library	Biological Question	Source of library	Number of ESTs
1	General expressed genes	Full body, mixed stage	10,000
2	Polyphenism control	Head	15,000
3	Olfaction	Antennae	15,000
4	Digestion, viral transmission	Gut	15,000
5	Feeding, viral transmission	Salivary glands	15,000
6	Endosymbiosis	Bacteriocytes	10,000
7	Reproduction, maternal transcripts	Sexual ovaries	10,000
	Embryogenesis	Staged sexual embryos as below	
8		0-12 h after egg laying	5,000
9		12-24 h after egg laying	5,000
10		24-36 h after egg laying	5,000
11		36-48 h after egg laying	5,000



- Desarrollo de una colección de “unigenes” de libre distribución para la impresión de microarrays

IAGC: recursos genómicos disponibles

■ 1.- Stocks de pulgones

- Unos 900 clones de *A.pisum* disponibles en distintos laboratorios
- 600 de ellos varían para caracteres como: resistencia a parasitoides, preferencia por el huésped, presencia de endosimbiontes secundarios, ciclo vital, inducción de polifenismos...

■ 2.- Genoteca genómica (en BAC): 18.500 clones, 120 kb/inserto

(Clemson University Genomics Institute)

■ 3.- ESTs:

cDNA library source	Group	Country	ESTs	Expected completion date
<i>A. pisum</i> heads	Tagu/Moya	Francia España	3000	Dec. 2003
<i>A. pisum</i> life-cycle	Moya	España	3000	2004
<i>A. pisum</i> gut	Tagu	Francia	1000	Dec. 2003
<i>A. pisum</i> antennae	Tagu	Francia	500	Dec. 2003
<i>A. pisum</i> bacteriocyte	Nakabachi	Japón	3000	Done
<i>A. pisum</i> bacteriocyte	Nakabachi	Japón	7000	2004
<i>A. pisum</i> whole body	Hunter/Stern	USA	1101	Done
<i>Toxoptera citricida</i> whole body	Hunter	USA	4304	Done
<i>Rhopalosiphon padi</i> whole body	Simon	Francia	700	Done

~ 15.000 ESTs de *A.pisum* en 2004

IAGC: recursos genómicos disponibles

- 4.- Mapas de ligamiento:
 - 250 marcadores para *A. pisum* (Hawthorne and Via,2001; Caillaud, M,2004)
 - 60 marcadores para *Rhopalosiphum padi* (Simon)
- 5.- Genómica de endosimbiontes
 - Secuencia completa de *Buchnera aphidicola* de tres especies
 - *A. pisum*, *S. graminum* (subfamilia Aphidinae) (Univ.Tokio; Univ. Uppsala)
 - *Baizongia pistaciae* (subfamilia Pemphiginae) (Univ. Valencia)
 - ❖ *Cinara tujaefilina* (subfamilia Lachninae) (en curso, Univ. Valencia)
 - ❖ Secuencia completa de un endosimbionte secundario de *A. pisum* (Univ. Arizona)

IAGC: financiación de objetivos

■ 1.- Secuenciación del genoma de *A. pisum*

- Proyecto presentado al National Human Genome Research Institute (NHGRI, NIH) U.S.A.

■ 2.- Secuenciación de ESTs

- Proyecto internacional aprobado por Genoscope (Centre National de Séquençage, France): 47.000 ESTs.
(2 grupos franceses, 1 grupo N-americano, 1 grupo español)
- Financiación por grupos individuales

Financiación grupos individuales

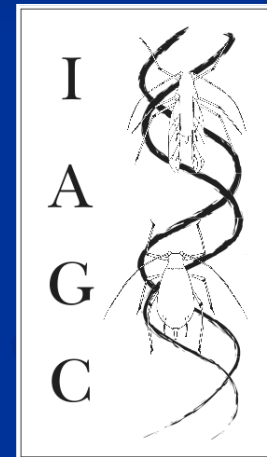
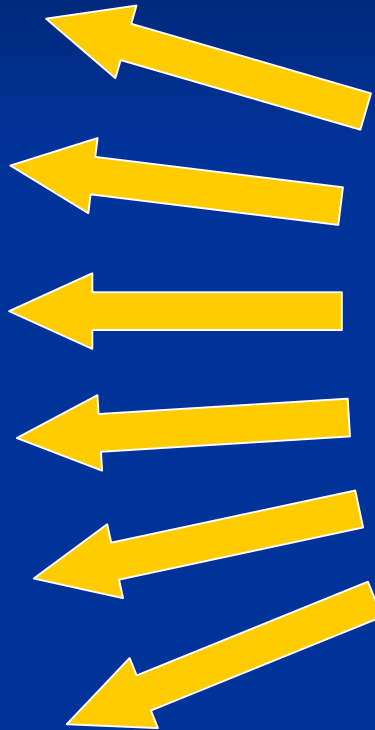
- Algunos proyectos actualmente vigentes relacionados con la genómica de los pulgones

Pais	Responsable	Cuantía (US\$)	Organismo	Proyecto
USA	N. Moran	2.100.000	NSF	Simbiontes y estres térmico
USA	W. Hunter	10.000/año	USDA	Genómica pulgones
USA	D. Stern	1.854.000	NIH	Polifenismo, transgénesis en pulgones
Japón	A. Nakabachi	96.000	JSPS	ESTs bacteriocitos
Francia	Simon-Tagu	300.000	INRA	ESTs, A. pisum
España	A. Moya	500.000	EU, GE, GV	Genómica simbiosis
Chile	C. Figuera	100.000	GCh	Expresión en Myzus persicae

Total: 4,9 millones de \$

Pulgones: áreas de estudio

- Genética
- Fisiología
- Agricultura
- Microbiología
- Virología
- Ecología
- Evolución
- Desarrollo
- Comportamiento



**International
Aphid
Genomics
Consortium**