

Embriología de *Dalbulus maidis*

Trabajo Final de Grado de la Alumna

Lucía Inés Dalaisón

El trabajo ha sido presentado como requisito para la obtención
del título de:

LICENCIADA EN GENÉTICA

Carrera:
Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 07 de Marzo del 2018.

Embriología de *Dalbulus maidis*

Trabajo Final de Grado de la Alumna

Lucía Inés Dalaisón

Directora:

Dra. María Inés Catalano

Co-Directora:

Lic. Agustina Pascual

Carrera:

Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

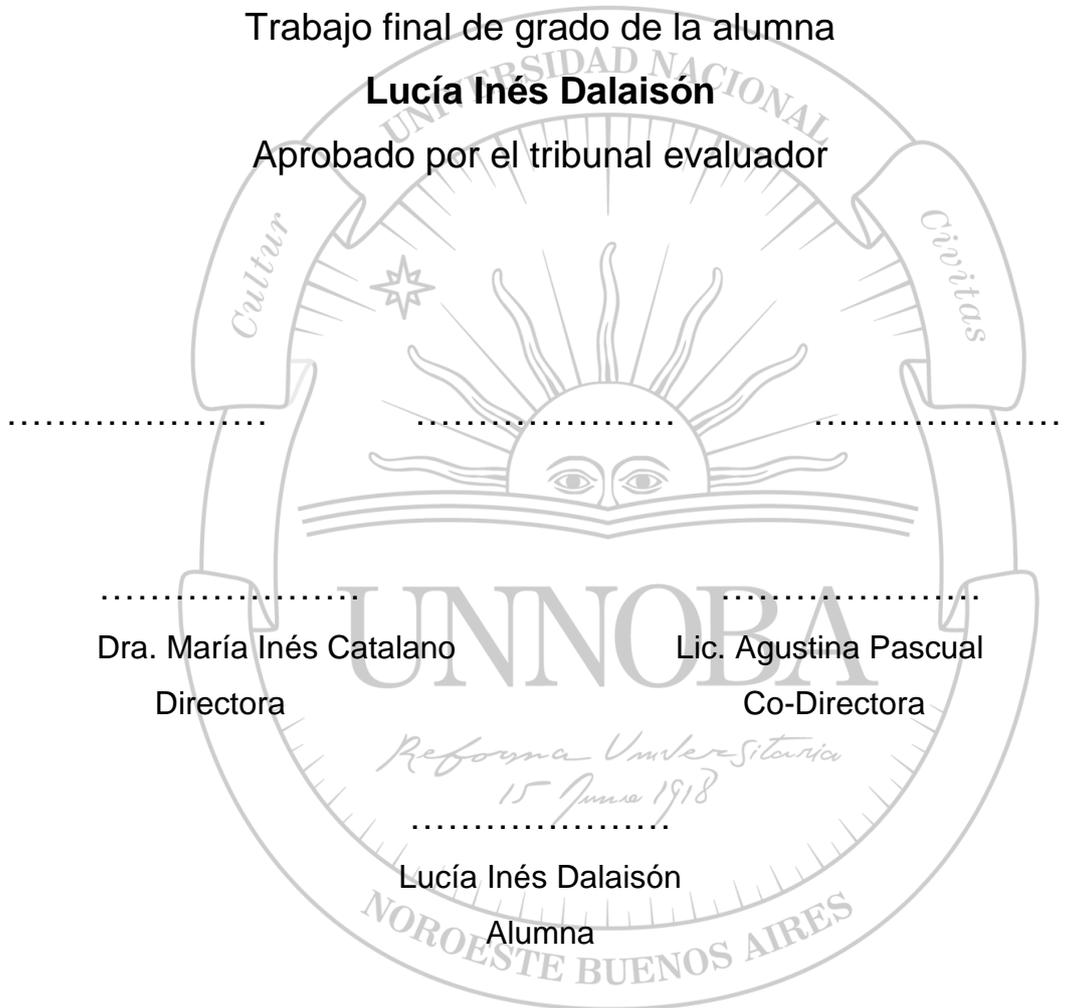
Pergamino, 07 de Marzo del 2018.

Embriología de *Dalbulus maidis*

Trabajo final de grado de la alumna

Lucía Inés Dalaisón

Aprobado por el tribunal evaluador



Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 07 de Marzo del 2018.

Índice

Contenido

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	7
2.1. Generalidades.....	7
2.2. Embriología de insectos.....	8
2.3. Embriología de Hemípteros.....	10
2.4. Ciclo de vida <i>in vitro</i> de los insectos.....	11
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVOS.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1. Mantenimiento de la colonia de <i>D. maidis</i>	18
5.2. Recolección de huevos.....	18
5.3. Disección y fijación de embriones.....	19
5.4. Captura de imágenes.....	20
5.5. Cría <i>in vitro</i> de <i>D. maidis</i>	20
6. RESULTADOS.....	22
6.1. Desarrollo embrionario de <i>D. maidis</i>	22
6.2. Cría <i>in vitro</i> de <i>D. maidis</i>	27
6.2.1. Dieta artificial.....	27
6.2.2. Recipiente de alimentación artificial.....	28
6.2.3. Recipientes de oviposición <i>in vitro</i>	29
7. DISCUSIÓN.....	34
7.1. Desarrollo embrionario de <i>D. maidis</i>	34
7.2. Cría <i>in vitro</i>	36
7.2.1 Alimentación artificial.....	36
7.2.2. Oviposición y embriogénesis <i>in vitro</i>	36
8. CONCLUSIONES FINALES.....	39
9. BIBLIOGRAFÍA.....	41
10. ANEXO I.....	48
10.1. Protocolo de disección y fijación de embriones de <i>D. maidis</i>	48

1. RESUMEN

El análisis de los genes que controlan el desarrollo de los insectos tiene un gran impacto en la entomología básica y aplicada al control de plagas o a insectos beneficiosos. *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera - Auchenorrhyncha) es un insecto monófago que se alimenta exclusivamente de especies del género *Zea*; es el único vector a campo de *Spiroplasma kunkelii*, patógeno causal de la enfermedad *Corn Stunt* o “Achaparramiento del maíz”. Esta enfermedad causa importantes pérdidas en la producción maicera y, en ocasiones, provoca que el rendimiento sea nulo. Con el propósito de generar información acerca del desarrollo embrionario de *D. maidis* y que ésta sirva en un futuro como punto de partida de estudios moleculares, se colectaron huevos a distintos tiempos post ovipuesta y se llevó a cabo una descripción de los diferentes estadios del desarrollo, basándose en los trabajos de Klaus Sander en *Euscelis plebejus*, especie filogenéticamente emparentada con *D. maidis*. Para que fuese factible la aplicación de técnicas de tinción, se desarrolló un protocolo de disección y de fijación de embriones específico para *D. maidis*, que posibilitó la eliminación química de las membranas extraembrionarias. Por otra parte, se elaboró una dieta artificial que permitió alimentar a los insectos fuera de la planta y constituye una vía alternativa para el *delivery* de ARN doble cadena (ARNdc) en experimentos de silenciamiento génico. Al mismo tiempo, se construyó un recipiente de alimentación artificial, en el cual las hembras fueron capaces tanto de alimentarse como de oviponer, lo que permite prescindir de la utilización de plantas como fuente de alimento y oviposición y, a la vez, brinda la posibilidad de realizar ensayos que no son posibles *in situ*.

Introducción

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Generalidades

Dalbulus maidis (DeLong y Wolcott, 1923) (Hemiptera: Auchenorrhyncha) es un insecto monófago que se alimenta exclusivamente de especies del género *Zea* (Triplehorn y Nault, 1985); y pertenece a la familia Cicadellidae (Latreille, 1825), la cual comprende a los insectos fitófagos comúnmente conocidos como “chicharritas” o *leafhoppers* (Fig. 1).

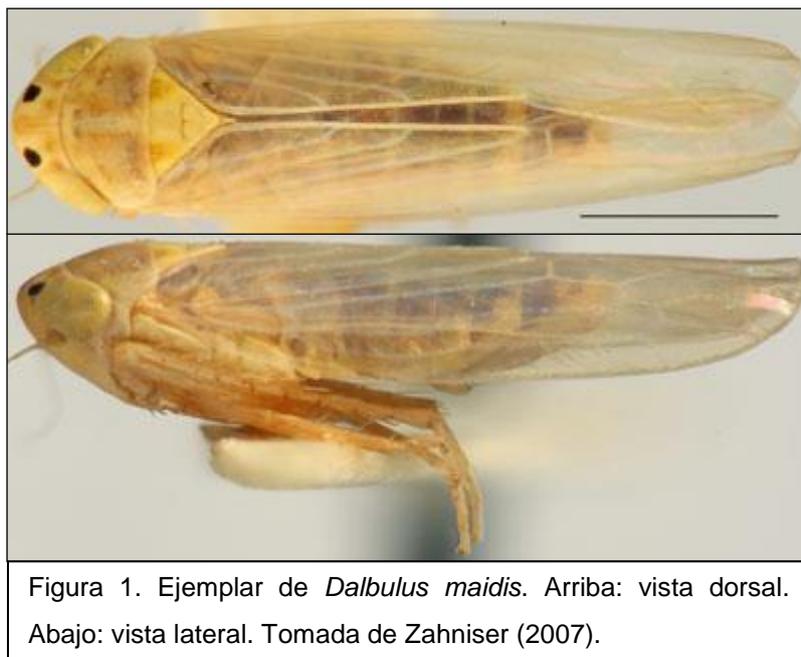


Figura 1. Ejemplar de *Dalbulus maidis*. Arriba: vista dorsal. Abajo: vista lateral. Tomada de Zahniser (2007).

La presencia de esta especie en nuestro país fue señalada por primera vez en 1948 en la provincia de Tucumán (Oman, 1948), y hasta el momento, es el único vector a campo reportado en Argentina de *Spiroplasma kunkelii*, patógeno causal de la enfermedad *Corn Stunt* o “Achaparramiento del maíz” (Virla *et al.*, 1990; Paradell *et al.*, 2001; Giménez Pecci *et al.*, 2002).

D. maidis, al igual que los demás hemípteros, es un insecto hemimetábolo, lo que significa que sufre una metamorfosis incompleta que comprende tres fases: huevo, ninfa y adulto. A diferencia de los insectos holometábolos, no atraviesa una fase pupal, su transformación es menos drástica e implica, esencialmente, la maduración sexual y la transformación de los esbozos alares en alas funcionales (Yang, 2001; Mito *et al.*, 2010). Después

de mudar a adultos, las hembras atraviesan un periodo preoviposicional de 4 días, seguido de una fase oviposicional que dura aproximadamente 33 días a una temperatura de 23°C, durante la cual realizan sus posturas tanto a lo largo de la nervadura central, como en la lámina de la hoja de maíz (Pitre, 1967; Heady *et al.*, 1985; Virla *et al.*, 2017).

2.2. Embriología de insectos

El plan corporal de los insectos se encuentra altamente conservado; todos poseen una cabeza que consta de 6-7 segmentos, un tórax con 3 segmentos y un abdomen constituido por 8-11 segmentos. Pero esta conservación morfológica esconde una gran diversidad subyacente en el desarrollo embrionario que da origen a este plan corporal (Liu y Kaufman, 2005).

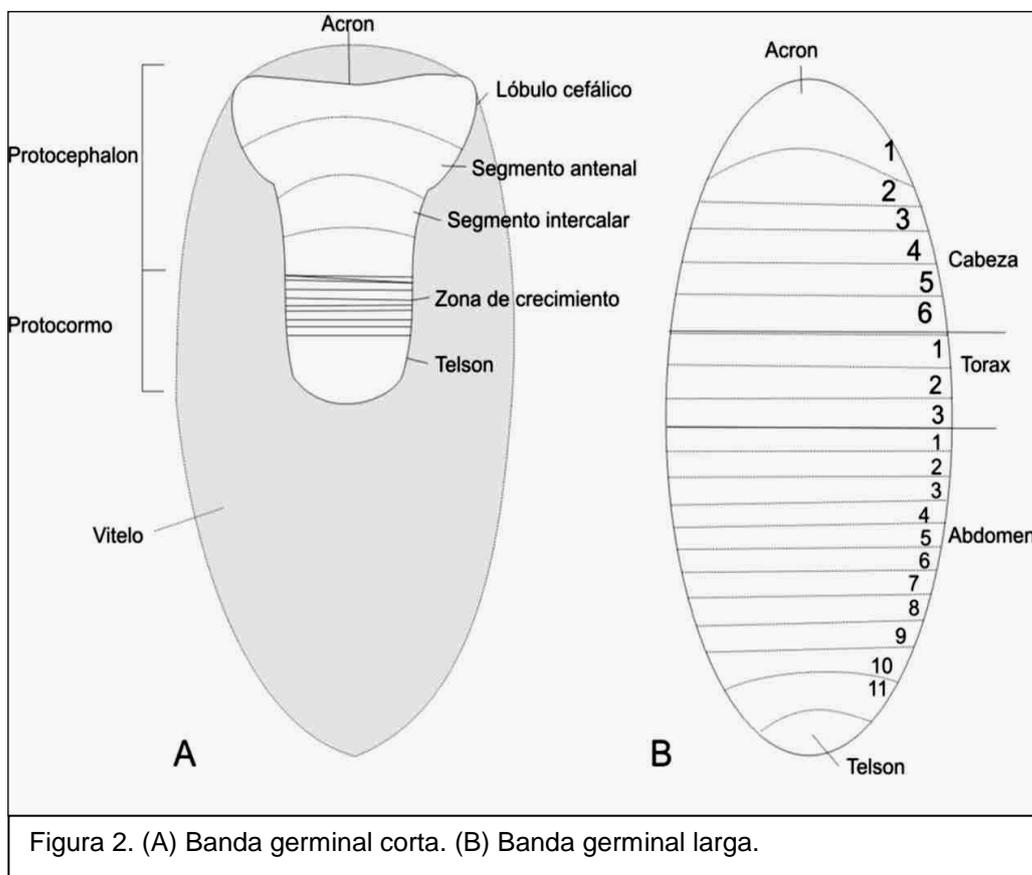
La embriogénesis comienza con una serie de divisiones nucleares en el centro del huevo, formándose un gran sincitio. Luego estos núcleos migran a la periferia y forman el blastodermo, el cual en un principio es sincitial y luego se celulariza formando el blastodermo celularizado. A partir de este momento, la embriogénesis entre los distintos grupos de insectos varía de forma sustancial respecto a cómo y cuándo el patrón corporal segmentado se modela, lo que permite clasificarlos en dos grandes grupos: insectos de banda germinal (BG) larga e insectos de BG corta (Krause, 1939) (Fig.2).

En los insectos de BG larga, como *Drosophila melanogaster*, todos los segmentos son especificados de manera temprana y simultánea durante el estadio de blastodermo y tienen proporciones similares en la larva y en el adulto. En cambio, en los insectos de BG corta, como *Oncopeltus fasciatus*, sólo los segmentos cefálicos prenatales son especificados en estadios previos a la gastrulación; los restantes son formados de manera progresiva, a partir de una zona de crecimiento localizada en la región posterior de la BG (Sander, 1981; Davis y Patel, 2002) (Fig. 2).

El desarrollo embrionario del tipo de BG larga se considera como evolutivamente derivado, ya que este tipo de embriogénesis está restringida a los insectos holometábolos, como dípteros e himenópteros, que se consideran evolutivamente más avanzados; en cambio el tipo de BG corta se encuentra

altamente representado en los órdenes más basales de insectos (Liu y Kaufman, 2005).

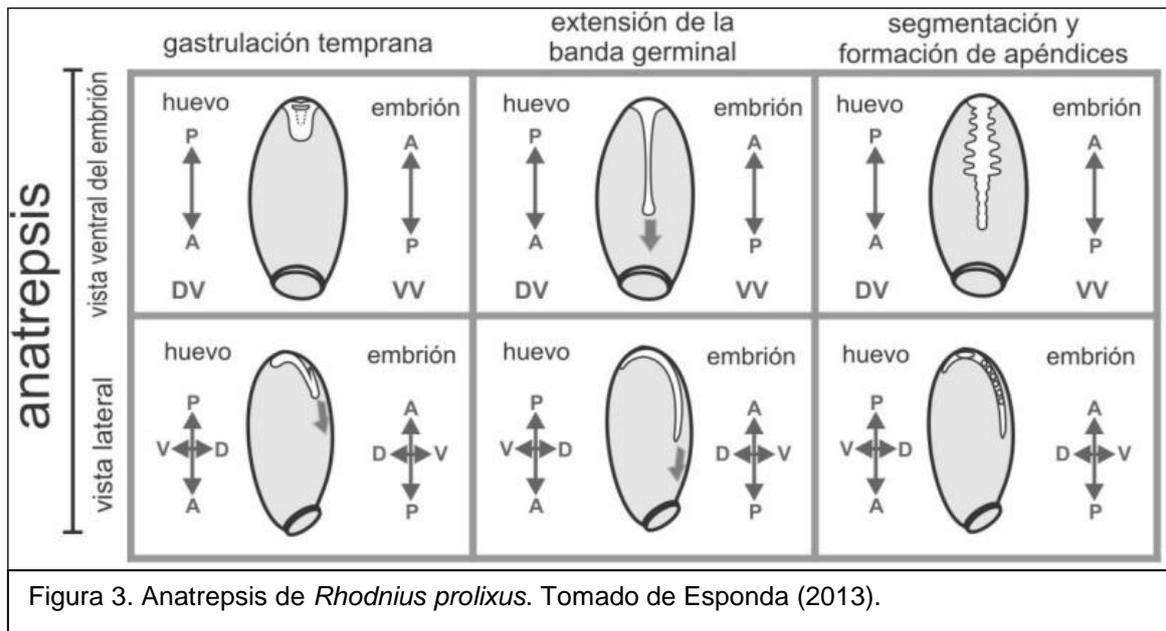
Paradójicamente, los procesos de desarrollo, incluida la segmentación, han sido mayormente estudiados en organismos de BG larga, donde los segmentos del embrión al especificarse en un entorno sincitial permiten una rápida y fácil difusión de los distintos factores, estableciéndose gradientes que determinan la identidad de cada región en el embrión (Rivera-Pomar *et al.*, 1996). En los insectos de BG corta, la especificación se da por las interacciones de los factores con proteínas ancladas en la membrana, activando distintas vías de señalización. De esta forma, como producto de la expresión génica diferencial en cada segmento en formación, cada uno obtiene una identidad corporal determinada (Davis y Patel, 2002).



2.3. Embriología de Hemipteros

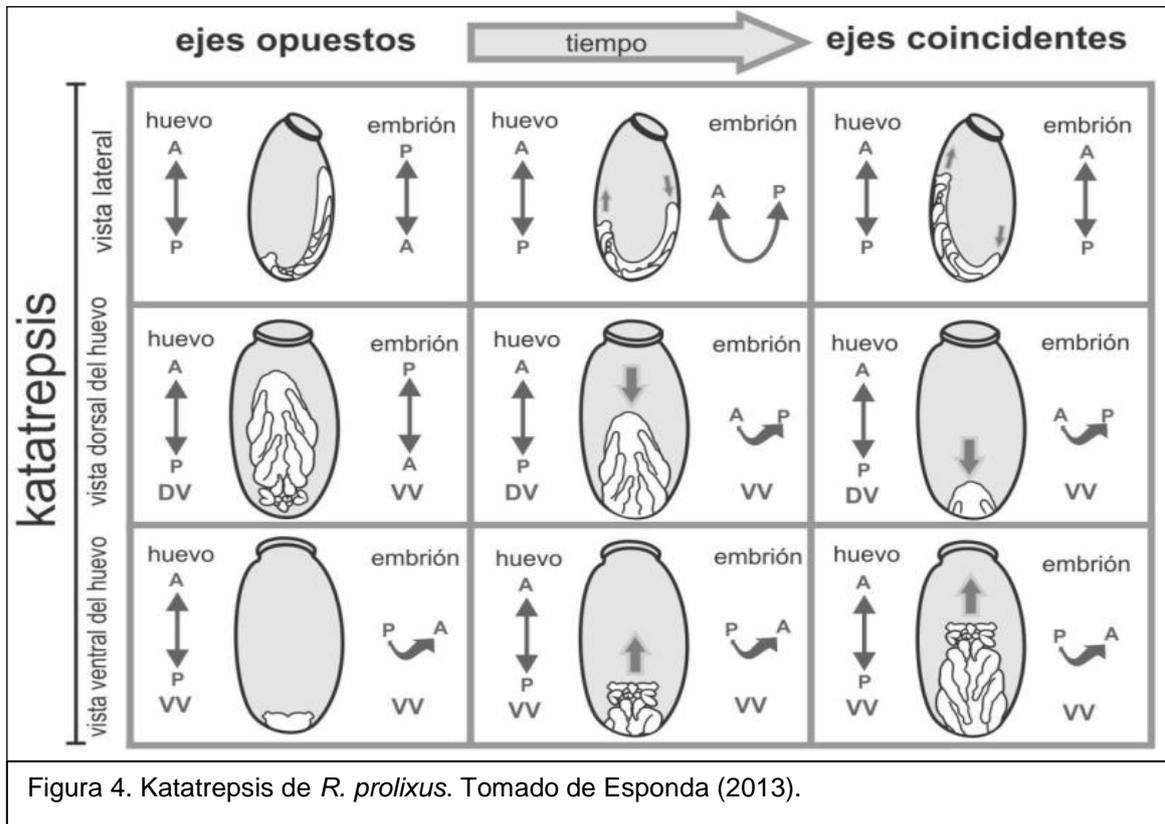
Especies pertenecientes al orden Hemiptera, como *Euscelis plebejus* (Sander, 1959), *Oncopeltus fasciatus* (Panfilio *et al.*, 2006; Panfilio, 2008) y *Rhodnius prolixus* (Mellanby, 1934; Pagola, 2012; Esponda, 2013), muestran un desarrollo de BG corta. En el cual, luego de establecerse el blastodermo celular, algunas células migran hacia el polo posterior del huevo para formar el rudimento embrionario, mientras que las restantes originan las membranas extraembrionarias.

A medida que se genera el rudimento embrionario, las células se invaginan en el polo posterior del huevo, desplazándose desde la cara ventral hacia la cara dorsal del mismo, dando inicio a la gastrulación. En simultáneo, se produce la elongación de la BG desde su extremo posterior, en dirección al polo anterior del huevo, y tiene lugar la primera fase blastocinética, llamada anatrepis, en donde los ejes del huevo y el embrión no son coincidentes (Fig. 3).



Cuando la elongación de la BG se completa, ocurre la segunda fase blastocinética o katatrepis (Fig. 4). El embrión avanza por su extremo anterior, en dirección al polo anterior del huevo, estableciéndose la orientación definitiva y coincidente de ejes embrionarios y del huevo. Visto lateralmente, el recorrido

del embrión tiene forma de “U” (Mellanby, 1935; Johannsen y Butt, 1941; Kelly y Huebner, 1989; Heming, 2003; Panfilio *et al.*, 2006).



Cabe mencionar que en ciertos hemípteros, tales como *Euscelis plebejus*, se ha observado la presencia de organismos endosimbiontes a través del desarrollo embrionario (Sander, 1976). Los *leafhoppers*, específicamente, establecen simbiosis obligadas con bacterias que les proveen de aminoácidos esenciales y/o vitaminas (Buchner, 1965; McCutcheon y Moran, 2007; McCutcheon *et al.*, 2009). Éstos se alojan en el citoplasma de células especializadas denominadas “bacteriocitos”, organizadas en “órganos simbiotes” o bacteriomas, ubicados hacia ambos lados del abdomen del insecto (Buchner, 1965; Baumann, 2005).

2.4. Ciclo de vida *in vitro* de los insectos

Carter (1927) fue el primero en establecer la alimentación *in vitro* de *leafhoppers* en experimentos de adquisición de virus. Los insectos eran

confinados en un recipiente e inyectaban sus estiletes en una membrana muy delgada para acceder al alimento. Desde entonces, se ha intentado explotar los beneficios subyacentes a esta técnica, desarrollando una amplia variedad de jaulas de cría, a partir de membranas compuestas de distintos componentes, entre ellos, mesenterio de pescado (Carter, 1927; Severin y Swezy, 1928; Fulton y Chamberlin, 1934), intestino bovino ("*Capping Skins*", *Baudruche*) (Carter, 1928; Storey, 1932; Severin y Freitag, 1933; Bennett, 1935), parafina (Fife, 1932; Herford, 1935), plástico ("*Plas-B Loon*", *Lausdale Distributors Pty, Ltd.*) (Day y KcKinnon, 1951), y más recientemente, papel *parafilm* ("*Parafilm M*", *American Can Company*) (Mitsuhashi y Koyama, 1971).

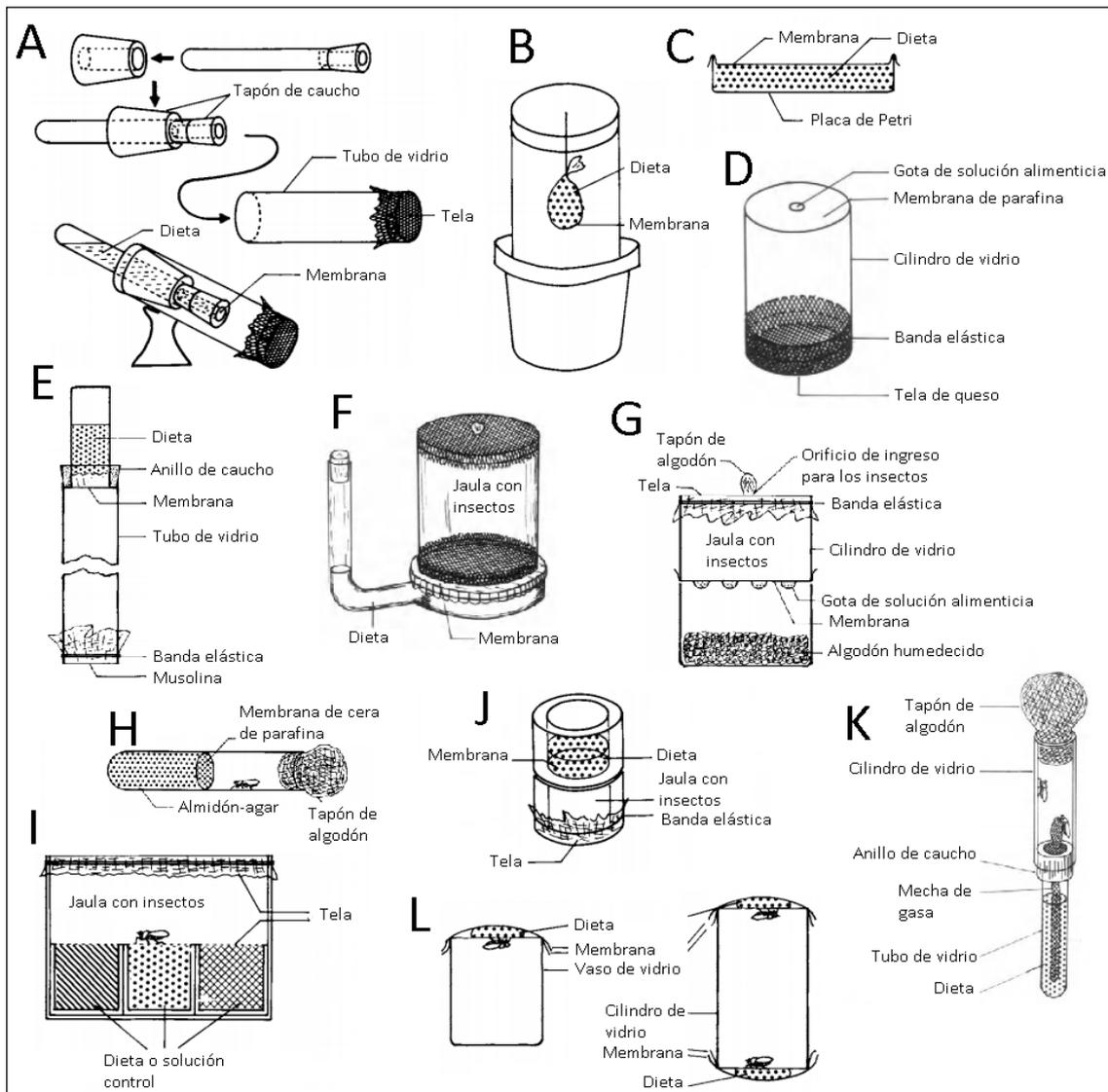
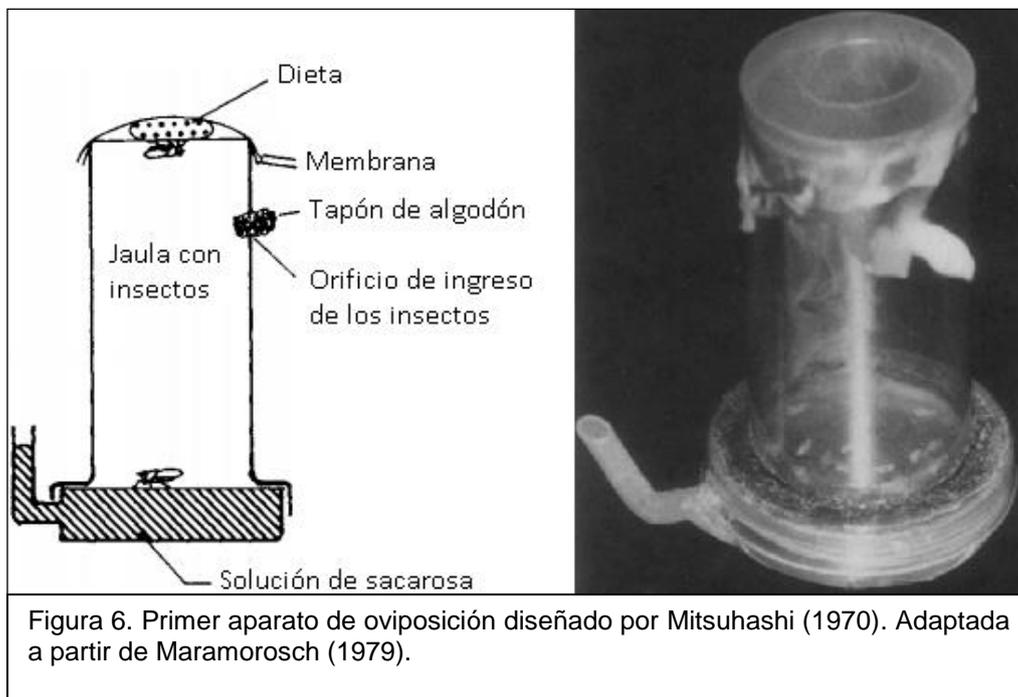


Figura 5. Recipientes de alimentación artificial para *leafhoppers*. (A) Carter (1927). (B) y (C) Carter (1928a). (D) Fife (1932). (E) Storey (1932). (F) Fulton y Chamberlin (1934). (G) Bennett (1935). (H) Herford (1935). (I) Day y McKinnon (1951). (J) Nuorteva (1951). (K) Mitsuhashi y Maramorosch (1963). (L) Mitsuhashi y Koyama (1971). Adaptada a partir de Maramorosch (1979).

Además de la jaula de cría, hay que considerar la dieta a administrar. Las dietas de los *leafhoppers* suelen ser líquidas y han sido elaboradas en base a las dietas formuladas originalmente para áfidos (Ehrhardt, 1968; Mittler y Dadd, 1962). Para el mantenimiento de las colonias durante un período muy breve, las soluciones con azúcares o agua han demostrado ser suficientes (Carter, 1927; Auclair, 1967; Mitsuhashi y Koyama, 1969; Koyama, 1971). Sin embargo, la cría a largo plazo o continua, exige dietas ricas en nutrientes, tales como sales inorgánicas, aminoácidos, azúcares, vitaminas y oligoelementos.

Finalmente, para completar el ciclo de vida *in vitro*, las hembras deben depositar sus huevos en medios artificiales. Algunas especies de *leafhoppers* pueden depositar sus huevos en la dieta administrada, mientras que otras, requieren dispositivos especiales para la oviposición (Fig. 6) (Mitsuhashi, 1970).



La eficacia de *D. maidis* en la transmisión del patógeno radica principalmente en su gran densidad poblacional (Ramírez *et al.*, 1975; Nault, 1990), por lo que abordar estudios genéticos a fin de identificar genes relacionados al desarrollo embrionario permitiría, en el futuro, generar medidas de control específicas y eficientes para esta plaga. Para ello, es necesario conocer en detalle la embriología de esta especie para luego enfocarse en cuestiones genómicas.

Por lo antes expuesto, en el presente trabajo se propuso estudiar los cambios morfológicos que sufre el embrión de *D. maidis* durante el proceso de desarrollo, y en paralelo, establecer una metodología para la *cría in vitro* de estos insectos, a fin de contar con el método más apropiado y eficaz para realizar estudios moleculares.

Hipótesis y objetivos

3. HIPÓTESIS

Dalbulus maidis presenta un desarrollo embrionario de banda germinal corta y es capaz de completar su ciclo de vida *in vitro*.

4. OBJETIVOS

- Estudiar el desarrollo embrionario de *D. maidis*.
- Establecer metodologías de cría *in vitro* de *D. maidis*.

Materiales y métodos

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Mantenimiento de la colonia de *D. maidis*

Los ejemplares de *D. maidis* fueron obtenidos a partir de la colonia existente en el bioterio del Centro de Bioinvestigaciones (CeBio). Los mismos se encuentran en condiciones controladas (temperatura 24-28°C, 70-80% de humedad relativa y 16 horas de luz artificial), en jaulas de varillas de aluminio cubiertas con tela de malla fina, para permitir una buena aireación. Se alimentan de plantas de maíz cultivadas en recipientes de plástico, cuyo recambio se hace aproximadamente una vez por semana o según se lo considere necesario.

5.2. Recolección de huevos

Con el propósito de analizar los distintos estadios embrionarios que *D. maidis* atraviesa durante el proceso de desarrollo, se colectaron huevos de 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 *horas post ovipuesta (hpo)*, así como también, a partir de la disección de los ovarios de varias hembras. Para ello, se depositaron hembras en jaulas individuales, construidas a partir de dos cilindros de plástico unidos entre sí por un broche metálico y cubiertos en uno de sus lados con tela de malla fina. Cada jaula se sujetó a una hoja de maíz y se sostuvo por medio de un tutor para no quebrarla (Fig. 7). Puesto que la oviposición aumenta con el incremento de la temperatura (Davis, 1966; Madden *et al.*, 1984, 1986), antes de dar inicio a un ensayo, las hembras se mantuvieron en un lugar oscuro y fresco por 30 minutos, y luego se ubicaron bajo una lámpara incandescente que emitía calor. Previamente, se estimó la duración que debía tener cada ensayo, en base al tiempo que necesitaron las hembras para acostumbrarse a su nuevo entorno y comenzar a depositar los huevos. Este periodo era de 1 hora.



Figura 7. Jaulas para la colecta de huevos. En rojo: hembra de *D. maidis*.

Al finalizar, las plantas se conservaron en el bioterio, a una temperatura constante (para no alterar la duración de la embriogénesis entre los diferentes ensayos) y aisladas en jaulas, con el fin de evitar que otros insectos tuvieran contacto con las mismas y pudiesen producirse posturas inespecíficas.

La extracción de los huevos tanto desde las hojas como de los ovarios se efectuó de forma manual, por medio de agujas entomológicas, bajo lupa binocular estereoscópica *Leica MZFLIII*. Se almacenaron en tubos *ependorf* en freezer a -20°C , en seco, hasta el momento de su procesamiento con el objeto de detener el desarrollo en el estadio deseado (es imprescindible mantenerlos a bajas temperaturas, de otro modo, una vez fuera de la hoja, los huevos se deshidratan rápidamente).

5.3. Disección y fijación de embriones

Dado que no existe en la bibliografía un método específico para el procesamiento de huevos de *D. maidis*, se probaron los protocolos desarrollados para *Rhodnius prolixus* (Nazar, comunicación personal), *Oncopeltus fasciatus* (Liu y Kaufman, 2009) y *Drosophila melanogaster* (Tautz y Pfeiffle, 1989); para ello se colectaron huevos de todos los estadios, de modo

de corroborar la eficacia de los tres procedimientos tanto en embriones tempranos como en aquellos más avanzados. Dado que ninguno de ellos resultó efectivo, se prosiguió a establecer un nuevo protocolo específico para especies que presentan oviposiciones endofíticas como es el caso de *D. maidis*, el cual se detalla en el ANEXO I.

5.4. Captura de imágenes

Se emplearon marcadores específicos para el ADN, tales como el 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) y el Hoechst en los huevos con embriones tempranos debido a que la presencia de vitelo dificultaba la visualización del embrión. En cambio, en los embriones de estadios avanzados (5 días en adelante), no fue necesario usar colorantes, ya que las estructuras de interés estaban lo suficientemente desarrolladas para su observación directa en el microscopio.

La captura de imágenes se hizo con una cámara *AxioCam ERc5s* (Zeiss) acoplada a un microscopio *Primo Star* (Zeiss) y con un microscopio de escaneo láser *Zeiss 710 confocal* (Zeiss). La digitalización y edición se llevó a cabo utilizando el software *ZEN 2012 blue edition* (Zeiss) y el programa *Combine ZP*.

5.5. Cría *in vitro* de *D. maidis*

Con el objetivo de establecer las condiciones de cría *in vitro* de *D. maidis*, se realizaron modificaciones sobre los recipientes de alimentación de Fife (1932) y Mitsuhashi y Koyama (1971) y sobre la dieta de Alivizatos (1982).

Resultados

6. RESULTADOS

Las hembras de *Dalbulus maidis* realizaron sus oviposiciones de tres maneras distintas; dentro de la nervadura media, en la lámina y en la vaina de la hoja de maíz. En el primer caso, las posturas se encontraron preferentemente en la cara adaxial, en grupos de dos o más huevos, ubicándose de forma oblicua, con su extremo anterior proyectándose sobre la ranura que dejó la hembra luego de la oviposición y con su extremo posterior hacia el interior de la nervadura (Fig. 8). Para el segundo caso, los huevos no mostraron ningún tipo de arreglo definido y se situaron paralelos a la superficie de la hoja. Por último, se halló un número considerable de oviposiciones dentro de la vaina, con una disposición similar a las posturas efectuadas en la lámina, lugar donde nunca se habían reportado posturas hasta la fecha (Fig. 8).



Figura 8. Hoja de maíz. Izquierda: huevos depositados en la nervadura media. Derecha: huevos depositados en la vaina.

6.1. Desarrollo embrionario de *D. maidis*

El análisis de los estadios embrionarios comenzó a partir de huevos obtenidos de la disección de ovarios, en los cuales se observó únicamente una estructura en forma de “copa”, situada en el polo posterior, que se mantiene hasta aproximadamente las 12 *horas post-ovipuesta* (*hpo*) (Fig. 9-a).

A las 12 *hpo*, además de esta estructura, se advirtió la presencia de núcleos celulares localizados en la superficie del huevo, rodeando el vitelo, lo que se correspondería con el estadio de blastodermo (Fig. 9-b).

A las 18 *hpo* comenzaron a diferenciarse dos tipos nucleares: por un lado, se hallaron núcleos pequeños y esféricos en la superficie posterior y ventrolateral del huevo, y por el otro, núcleos grandes y planos, aunque menos numerosos, cubriendo la mayor parte del vitelo (Fig. 9-c).

Entre las 18 y las 24 *hpo*, se registró que el número de núcleos era mayor y que se encontraban más próximos entre sí, principalmente hacía el polo posterior del huevo (Fig. 9-d).

A las 24 *hpo*, el área del huevo cubierta por las células embrionarias se redujo, ya que las células que se hallaban en los laterales se contrajeron marcadamente hacia la línea media y adquirieron una disposición más bien columnar. Asimismo, se advirtió la presencia de dos prominencias en el margen anterior, las cuales se tratarían de los lóbulos cefálicos (Fig. 9-e). A medida que avanzó el tiempo (48 *hpo*), y con éste, el desarrollo, esta agrupación de células continuó disminuyendo su tamaño y comenzó a extenderse por su extremo posterior. Conjuntamente, se observó que las prominencias descritas con anterioridad, se encontraban más definidas (Fig. 9-f).

Entre las 48 y las 72 *hpo*, se registró que el eje longitudinal (AP) del embrión se hallaba invertido respecto al eje del huevo (Fig. 9-g).

A las 72 *hpo*, se empezó a distinguir con más detalle al embrión, ya que pudieron definirse sus tres tagmas (cabeza, tórax y abdomen), con sus respectivos apéndices. Específicamente la región abdominal, mostró una curvatura caudal que ubicaba a sus segmentos posteriores adyacentes a los anteriores (Fig. 9-h). Por otra parte, tal como se aprecia en la Fig. 9-i, en este estadio el dorso del embrión aún no se cerró, encontrándose en contacto con el vitelo.

A las 96 *hpo*, el embrión se volvió visible desde la superficie del huevo, puesto que prácticamente no quedaba más vitelo, a excepción de una pequeña porción en el polo anterior del mismo. También se volvieron visibles los ojos rojos, como dos puntos tenues en los lóbulos cefálicos (a causa del procesamiento al que se sometieron los embriones, éstos pierden intensidad y no fue posible capturarlos en las imágenes). La curvatura en la región abdominal desapareció y el embrión se dispuso en línea recta. En relación a los apéndices, todos mostraron un aumento en su tamaño; las patas, por ejemplo,

alcanzaron una longitud tal, que se doblaban hacia el dorso del embrión (Fig. 9-j).

A las 120 *hpo*, se advirtió que los ejes AP y DV tanto del embrión como del huevo eran coincidentes. Además, los apéndices se hallaban mucho más desarrollados y organizados sobre la línea media, en dirección al extremo posterior. Asimismo, las estructuras del aparato bucal, tales como el labro, las mandíbulas y las maxilas ya se encontraban definidas, aunque no se pudieron apreciar plenamente por estar ubicadas detrás de las antenas (Fig.9-k).

A las 144 *hpo*, ya se completó el cierre dorsal y no se produjeron más cambios morfológicos externos, lo cual sugiere que estaría teniendo lugar la organogénesis, dando inicio a los procesos de embriogénesis tardíos. Los ojos exhibieron un tamaño mayor y una coloración roja más intensa. La diferencia que se encontró entre estos embriones y los embriones de 168 *hpo* (o pre-ninfas) fue su menor tamaño, pero ambos mostraron las mismas características morfológicas que una ninfa I (Fig. 10-a).

La eclosión se produjo a las 168 *hpo*, a una temperatura de 24-28°C, la ninfa I emergió a través de una “sutura” o “cicatriz” en la cara dorsal del polo anterior del huevo. Fue frecuente detectar la presencia de un cúmulo de filamentos blanquecinos sobre esta estructura, aunque se desconoce si se debieron a secreciones de la hembra o a una reacción de la planta (Fig. 10-b).

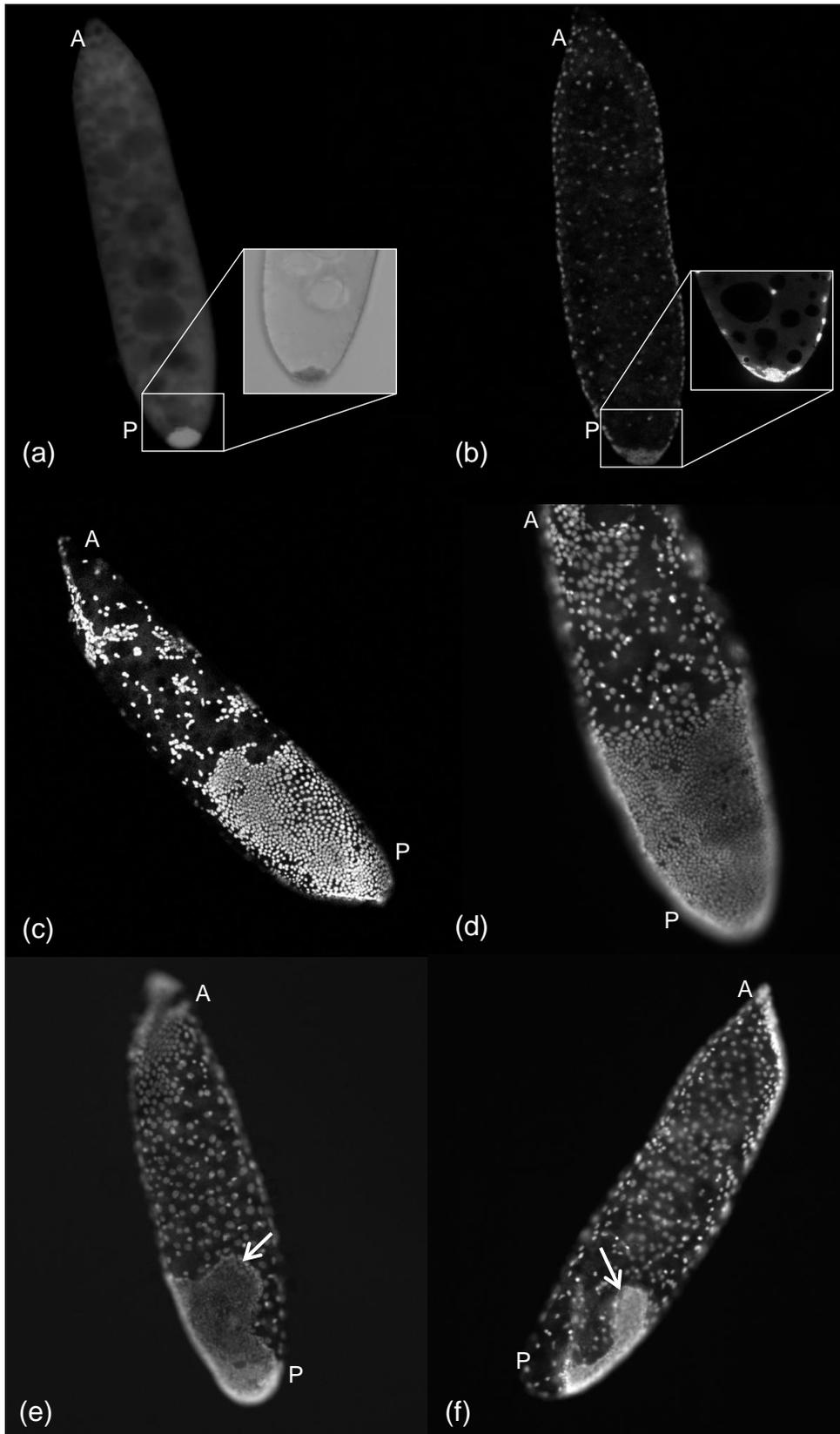
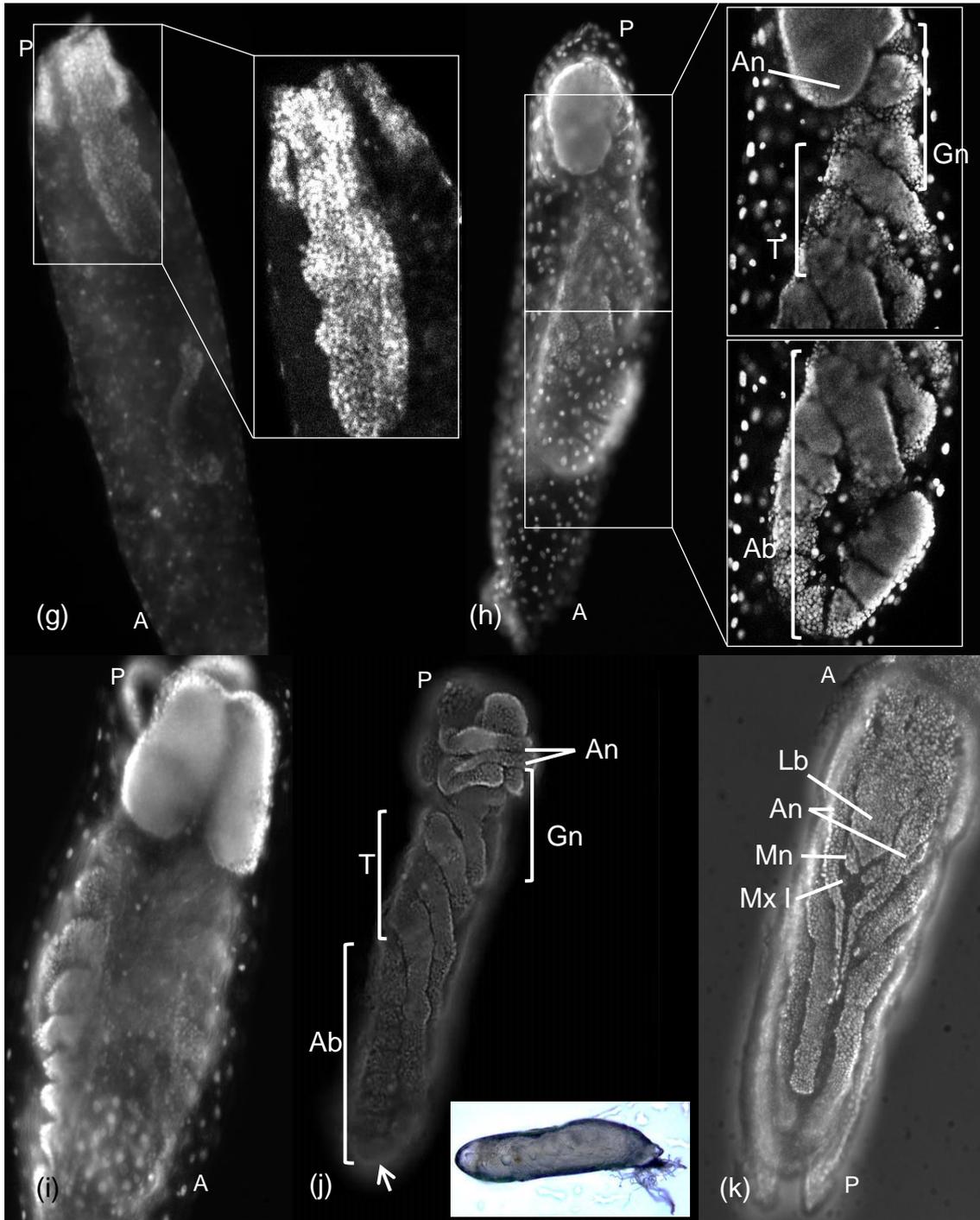
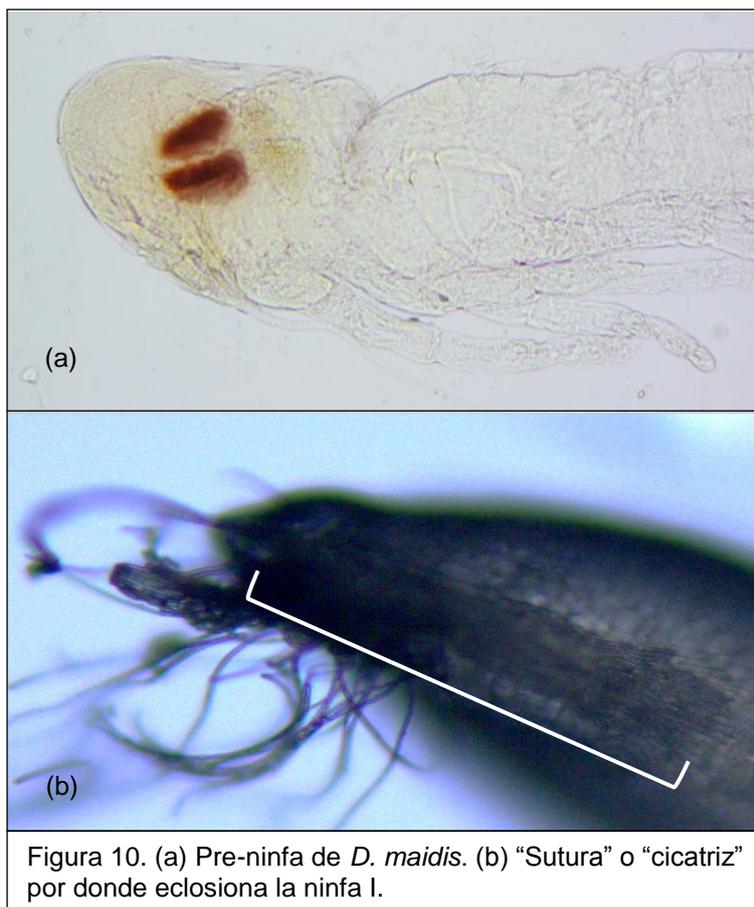


Figura 9. Desarrollo embrionario de *D. maidis*. (a) Ovario - 6 hpo. (b) 12 hpo. (c) 18 hpo. (d) 18-24 hpo. (e) 24 hpo. (f) 48 hpo. Las flechas indican las estructuras que se corresponderían con los lóbulos cefálicos.



Continuación figura 9. (g) 48-72 *hpo*. (h) 72 *hpo*, vista lateral. (i) 72 *hpo*, vista dorsal. (j) 96 *hpo*. (k) 120 *hpo*. (An) antenas. (Gn) segmentos gnatales. (T) segmentos torácicos. (Ab) segmentos abdominales. (Lb) labro. (Mn) mandíbula. (Mx I) maxila I. La flecha muestra la disposición de las patas, que se curvan hacia el dorso.



6.2. Cría *in vitro* de *D. maidis*

6.2.1. Dieta artificial

Se elaboró una dieta para llevar a cabo la alimentación artificial de *Dalbulus maidis* modificada de Alvizatos (1982), la misma se detalla a continuación:

Sacarosa	10 % m/v
Fructosa	0,2 % m/v
Agua destilada	c/n

TABLA 1. Dieta artificial para *D. maidis*. Modificada a partir del protocolo de Alvizatos (1982).

La solución se colocó en un tubo *Falcon*, se mezcló por agitación manual hasta que no se visualizó ningún cúmulo de azúcar. En los casos donde no se

consiguió una mezcla homogénea, se le aplicó calor por medio del mechero o estufa, hasta que se logró una dilución total. Se conservó en la heladera a 4°C.

6.2.2. Recipiente de alimentación artificial

Se construyó una jaula de alimentación a con un recipiente de plástico abierto por ambos extremos, similar a la diseñada por Fife (1932) y Mitsuhashi y Koyama (1971).

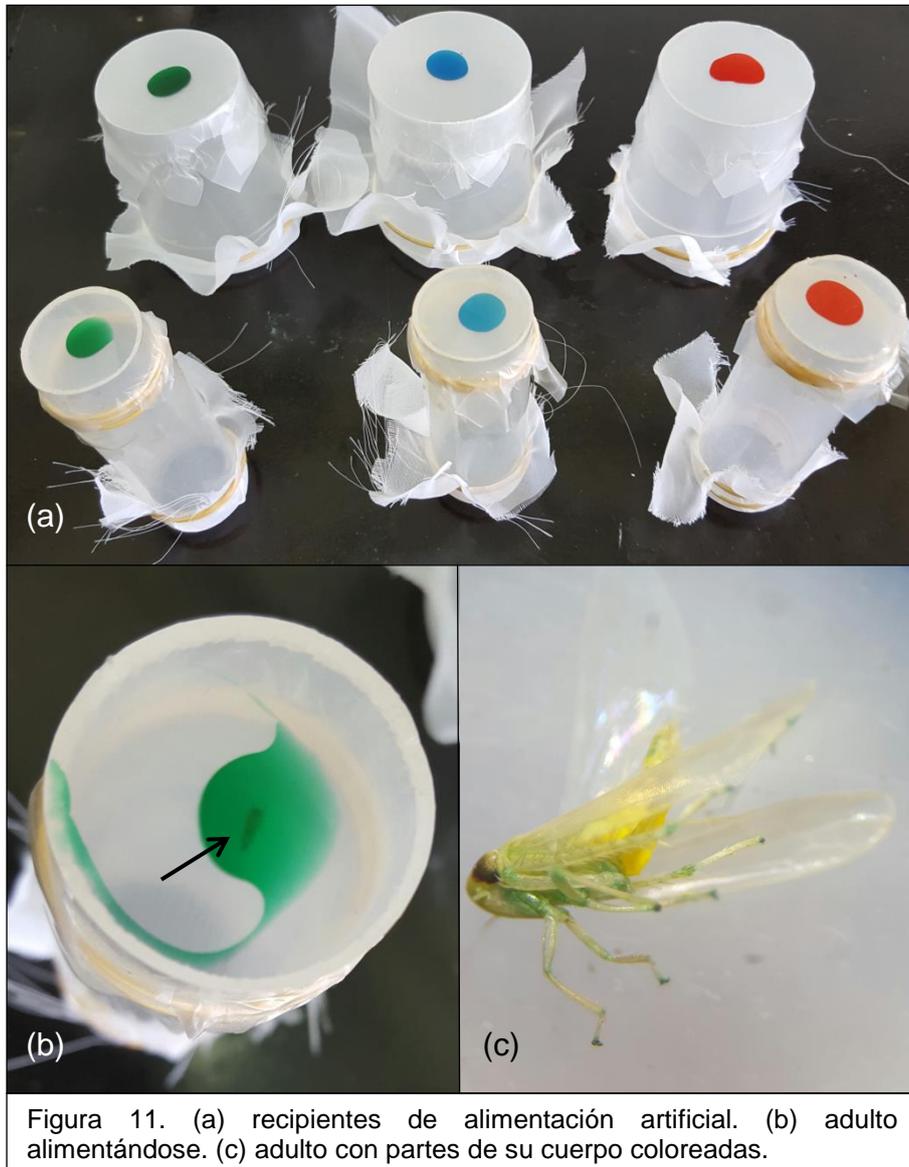
Se probaron tres membranas compuestas por materiales diferentes, a fin de evaluar su utilidad para proveerles la dieta a los insectos (papel *film* de cocina, látex y papel *parafilm*). El papel *film* de cocina no funcionó, por lo que se descartó del ensayo. En cuanto a las otras dos opciones, ambas arrojaron resultados positivos, siendo que los insectos clavaron sus estiletes en busca de alimento y lograron sobrevivir durante varios días, sin embargo, se optó por usar papel *parafilm*, en vista de que es más fácil de manipular que el látex.

Posteriormente, se procedió al armado del aparato. En una de las aberturas del recipiente se situaron dos secciones de papel *parafilm* completamente tensadas, con el fin de simular el espesor de la epidermis de la hoja y de conservar el alimento aislado y libre de contaminantes. Como regla general, la sección se cortaba de modo tal que tuviese una dimensión igual a $\frac{1}{4}$ de la superficie total a cubrir. En el otro extremo, se colocó una malla fina (tela “voilé”) para lograr una buena aireación, y se sostuvo con una banda elástica. Además, se realizaron dos orificios sobre el recipiente, enfrentados entre sí, cubiertos con la misma tela de malla fina, con el objetivo de generar una corriente de aire y evitar la formación de hongos.

Además de la observación directa de la inyección de los estiletes sobre la superficie del papel *parafilm*, se realizaron distintos ensayos para corroborar que los insectos realmente ingerían el alimento. En primer lugar, se le añadió tinta china, con el fin de observar algún cambio de coloración en su sistema digestivo. Este colorante teñía los estiletes, pero provocaba la muerte de los insectos al poco tiempo. Por este motivo, decidió emplearse colorantes naturales de uso corriente en pastelería (Fig. 11-a,b). Esto permitió que los insectos sobrevivieran durante más días y consumieran mayor cantidad de

alimento, lo que provocó que se colorearan distintas partes de su cuerpo (abdomen, patas) y que depositen materia fecal del color correspondiente (Fig. 11-c).

Los ejemplares que se alimentaron exclusivamente con la dieta artificial de la Tabla 1, administrada en las jaulas de alimentación de la figura 11 lograron sobrevivir por más de 4 semanas.



6.2.3. Recipientes de oviposición *in vitro*

Para completar el ciclo de vida *in vitro*, el siguiente paso fue buscar un medio donde las hembras pudieran ovipositar. Éste debía reunir ciertas

características, entre ellas, ser lo suficientemente blando como para que inyectaran sus aparatos oviposidores, conservar los huevos hidratados, no ser tóxico y ser estable a 24-28°C, rango de temperatura a la que se mantiene la cría en el bioterio.

Se probaron dos alternativas: gelatina sin sabor y agar, ambos preparados en distintas concentraciones (Tabla 2). El recipiente empleado es el mismo que se describió anteriormente; siendo así, la hembra se alimentaba en la parte superior, donde se hallaba el alimento y debía depositar los huevos en la parte inferior, donde se encontraba el medio para la oviposición. Para atraerla hacía el fondo del aparato, se colocaron cartulinas de color verde, simulando el color de la hoja de maíz (Fig. 12-a).

Gelatina sin sabor	2 % m/v *	No gelifica a T ⁰ _{amb}	Descartado
	4,5 % m/v	No gelifica a T ⁰ _{amb}	Descartado
	6 % m/v	Gelifica	No hubo posturas
Agar	0,1 % m/v	No gelifica a T ⁰ _{amb}	Descartado
	0,2 % m/v	No gelifica a T ⁰ _{amb}	Descartado
	1 % m/v	Gelifica	1 huevo deshidratado
	2 % m/v	Gelifica	1 huevo deshidratado

TABLA 2. Ensayo de oviposición *in vitro*. Se hicieron 3 repeticiones para cada una de las concentraciones. * Concentración original de la gelatina sin sabor. Aclaración: la concentración empleada frecuentemente para preparar el agar es 3 % m/v, no obstante se decidió no probarla porque se consideró que su consistencia era demasiado dura.

En las pruebas donde las concentraciones fueron las correctas y el medio no se licuó a temperatura ambiente, el número de huevos depositados fue muy bajo y ninguno de ellos logró completar el desarrollo y eclosionar, puesto que se deshidrataron rápidamente. En consecuencia, ambos medios fueron descartados.

Luego se observó que las hembras eran capaces de oviponer entre las dos secciones de papel *parafilm*. Al estar rodeados por el alimento líquido, los huevos no se desecaban y se desarrollaban normalmente (Fig. 12-b). Los

embriones que permanecieron en el dispositivo hasta completar la embriogénesis, llegaron a eclosionar y a desplazarse. Sin embargo, las ninfas no consiguieron romper el papel *parafilm* y murieron asfixiadas (Fig. 12-c).

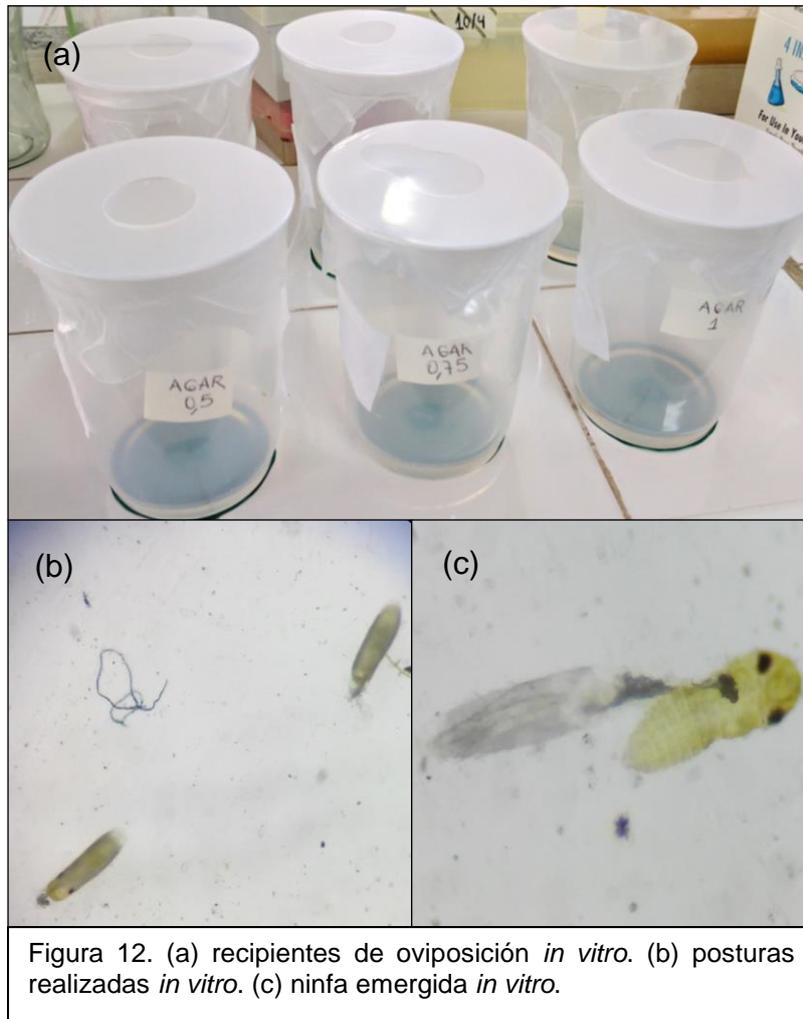
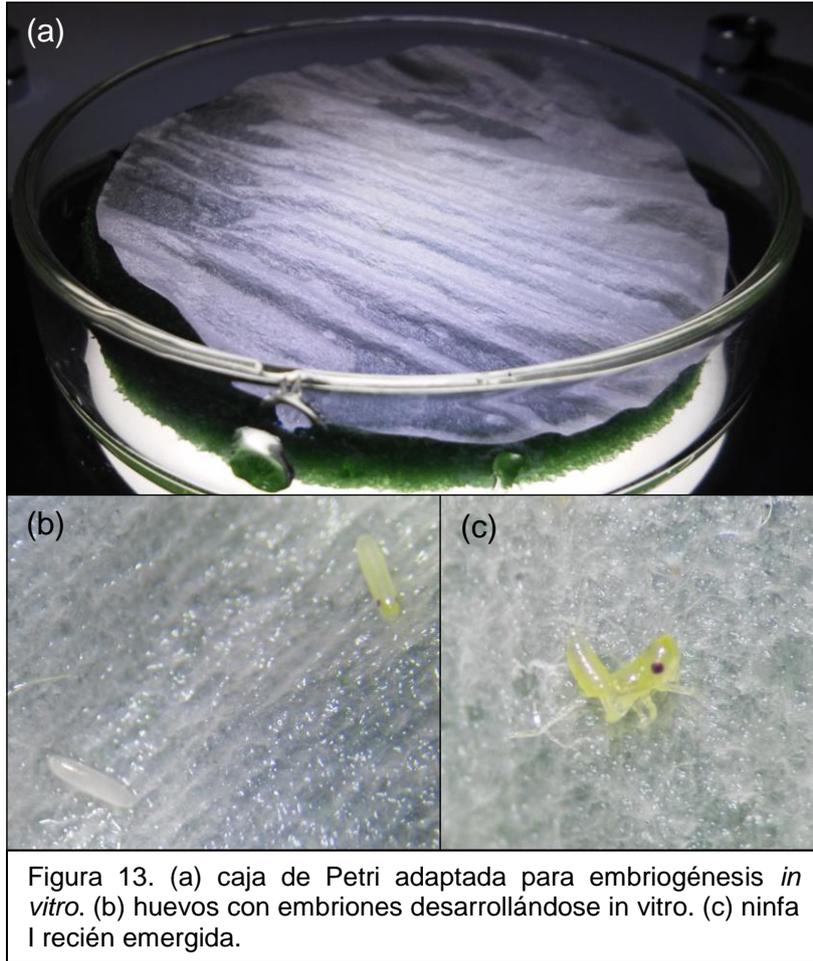


Figura 12. (a) recipientes de oviposición *in vitro*. (b) posturas realizadas *in vitro*. (c) ninfa emergida *in vitro*.

Para superar este inconveniente, se fabricó otro aparato con una placa de Petri, una esponja vegetal y papel *tissue*. Esta esponja tiene la capacidad de retener grandes cantidades de agua por un tiempo prolongado, lo que evitó los huevos de *D. maidis* se deshidraten. Asimismo, fue necesario colocar un papel *tissue* por encima de ella, para que los huevos no se pierdan dentro de sus poros. El agua se renovó periódicamente o cuando se lo consideró necesario (Fig. 13-a).

Esta cápsula no sólo permitió la supervivencia de los embriones *in vitro*, sino que también se implementó para los huevos colectados a partir de plantas de la colonia (Fig. 13-b,c).



Discusión

7. DISCUSIÓN

7.1. Desarrollo embrionario de *D. maidis*

En el presente trabajo se llevó a cabo la primera descripción morfológica de los distintos estadios embrionarios que atraviesa *Dalbulus maidis* durante su desarrollo embrionario. Pudo comprobarse que, al igual que otros hemípteros, tales como *Euscelis plebejus* (Sander, 1959), *Rhodnius prolixus* (Mellanby, 1934; Pagola, 2012; Esponda, 2013) y *Oncopeltus fasciatus* (Panfilio *et al.*, 2006; Panfilio, 2008), *D. maidis* presenta un desarrollo de BG corta, aunque difiere de la mayoría de ellos en el tiempo que le lleva completar la embriogénesis, siendo de 7 u 8 días para *D. maidis* (24-28°C), 17 días para *E. plebejus* (22-23°C) y 12-13 días para *R. prolixus* (27°C). Las imágenes obtenidas, por su parte, muestran un gran parecido con los diagramas elaborados por Sander (1959) en la descripción del desarrollo embrionario de *E. plebejus*; lo que resulta razonable, siendo que ambas especies pertenecen a la familia Cicadellidae.

Es importante destacar que los huevos de 0-12 hpo presentan un cúmulo de células en el polo posterior del mismo. En un principio, se planteó la posibilidad de que esta estructura fuese el rudimento embrionario y que los procesos más tempranos de la embriogénesis se estuviesen produciendo en el interior de la hembra. Por este motivo, se disectaron ovarios de varias hembras, para sacar los huevos de su interior, y al procesarlos se observó un cúmulo de células con las mismas características que las presentes en los huevos de 0-12 hpo. Al revisar la bibliografía, se encontró que Sander (1959) y Korner (1972) hacen referencia a una “masa de simbiontes” situada en el polo posterior de huevo de *E. plebejus* y describen los cambios morfológicos y espaciales que ésta experimenta durante la embriogénesis, en paralelo con el embrión. Asimismo, Brentassi *et al.* (2016) informaron la presencia de dos bacteriomas situados en el primer y segundo segmento abdominal de ejemplares adultos de *D. maidis*. Estos microorganismos se hallan ampliamente distribuidos entre los *leafhoppers* (Buchner, 1965; McCutcheon y Moran, 2007; McCutcheon *et al.*, 2009) y son transmitidos durante la ovogénesis en un proceso conocido como “transmisión transovárica” o “vertical”

(Buchner, 1965; Houk y Griffiths, 1980). Una conjetura plausible, entonces, es que este grupo de células se trate, efectivamente, de organismos endosimbiontes, por lo que sería interesante en una segunda etapa de este trabajo, abordar experimentos específicos para el estudio de bacterias.

Otros eventos considerados relevantes durante la embriogénesis de *D. maidis* fueron: a las 12 *hpo*, además de la estructura a la que se hace mención en el párrafo anterior, se advirtió la presencia de núcleos celulares localizados en la superficie del huevo, rodeando el vitelo, lo que suponemos que se correspondería con el estadio de blastodermo, según lo descrito para otros hemípteros. Horas más tarde (24 *hpo*), se observó una agrupación de células embrionarias en la superficie posterior y ventrolateral del huevo, la cual presentaba dos prominencias en su margen anterior; inferimos que se trataba del rudimento embrionario y que dichas prominencias eran, en realidad, los lóbulos cefálicos. A medida que avanzó el tiempo (48 *hpo*), y con éste, el desarrollo, esta agrupación de células continuó disminuyendo su tamaño y comenzó a extenderse por su extremo posterior, lo que haría referencia a los procesos de elongación de la BG, de gastrulación y a la primera fase de la blastocinesis, los cuales en los insectos de BG corta, ocurren simultáneamente y de forma temprana (Johannsen y Butt, 1941; Heming, 2003; Panfilio *et al.*, 2006). En concordancia con este hecho, entre las 48 y las 72 *hpo* se registró que el eje longitudinal (AP) del embrión se halla invertido respecto al eje del huevo; lo que se debería a que, en efecto, habría tenido lugar la anatrepis. Finalmente, a las 120 *hpo* se observó que los ejes AP y DV tanto del embrión como del huevo eran coincidentes; este cambio respecto al estadio anterior sería una consecuencia de la segunda fase blastocinética, o katatrepis.

Cabe remarcar que existen eventos importantes de la embriogénesis que no pudieron ser documentados, tales como la gastrulación, la anatrepis y la katatrepis; no obstante, se obtuvieron imágenes de los estadios previos y posteriores, que sirven como evidencia de que éstos habían ocurrido. Por otra parte, se observó que las diferencias entre algunos estadios contiguos son muy marcadas, por ejemplo entre los embriones de 24 y 48 *hpo*, motivo por el cual, hacer un análisis minucioso de los estadios intermedios, serviría para obtener una versión más completa y continua de lo que está ocurriendo.

7.2. Cría *in vitro*

7.2.1 Alimentación artificial

Durante este trabajo se consiguió elaborar una dieta artificial específica para *D. maidis* realizando una serie de modificaciones a la dieta de Alivizatos (1982) y al recipiente de alimentación de Fife (1932) y Mitsuhashi y Koyama (1971).

En relación al alimento, las diferencias respecto a la dieta de Alivizatos (1982) se deben a que se prescindieron de ciertos ingredientes, como sales y suero fetal bovino que, en realidad, eran utilizados para el mantenimiento del espiroplasma y no de los insectos.

En cuanto al recipiente de alimentación, su conformación es muy similar a los aparatos de Fife (1932) y de Mitsuhashi y Koyama (1971), excepto que se usaron materiales más prácticos para su construcción, por ejemplo, se reemplazó el vidrio por el plástico para los recipientes, la gasa de quesería por la tela *voilé* para conseguir una buena aireación y la parafina por el papel *parafilm* a modo de membrana.

En un comienzo, la aplicación de las técnicas de alimentación artificial en *leafhoppers* estaba limitada al estudio de las relaciones vector-patógeno y a la propagación de virus (Brooks, 1985). Sin embargo, los beneficios subyacentes a esta metodología son mucho más amplios. En consecuencia, el propósito final de esta investigación es la puesta a punto de técnicas de silenciamiento génico, particularmente, por ARN interferente (ARNi).

En la última década, el control de insectos plagas, basado en ARNi se ha desarrollado como un método seguro para el medio ambiente, dada su especificidad y la biodegradabilidad de los compuestos que provocan el efecto insecticida. Pese a esto, requiere que los insectos tengan una absorción regular y autónoma del ARN doble cadena (ARNdc) (Hakim *et al.*, 2010), lo que convierte a la alimentación artificial en una opción viable.

7.2.2. Oviposición y embriogénesis *in vitro*

Ciertas especies que son capaces de sobrevivir alimentándose con dietas artificiales, muestran una disminución en su fecundidad o no logran oviponer cuando se las mantiene aisladas de sus plantas hospedadoras naturales (Maramorosch, 1979). En el caso de que consigan depositar sus huevos, algunas chicharritas, tales como *Laodelphax striatellus*, sólo oviponen en medios especiales, por lo general, producidos a partir de sacarosa (Koyama y Mitsuhashi, 1975). Contrariamente, *D. maidis* no sólo demostró ser capaz de subsistir con el alimento elaborado por más de cuatro semanas, sino que las hembras adultas también realizaron sus oviposiciones sobre el mismo.

Mitsuhashi (1970) fue el primero en desarrollar un recipiente de oviposición, basándose en la jaula de alimentación de Fulton y Chamberlin (1934); colectaba los huevos desde una solución de sacarosa y los mantenía en agua hasta un día antes de la eclosión, momento en el que los transfería a un papel de filtro humedecido. A diferencia de éste, para *D. maidis* se usó el mismo recipiente que para la alimentación artificial (por las razones antes expuestas), y luego los huevos se traspasaron con ayuda de un pincel a una esponja vegetal cubierta con papel *tissue*, donde completaron su desarrollo y eclosionaron normalmente.

La ventaja de este método, es que permite realizar estudios moleculares que no serían posibles si los huevos se encuentran dentro de la hoja o que requieren de un seguimiento minucioso del embrión a través de su desarrollo.

Conclusiones

8. CONCLUSIONES FINALES

- En este trabajo se realizó la primera descripción de la embriogénesis de *Dalbulus maidis*, que sienta las bases para futuros estudios relacionados con la genética del desarrollo.
- Se desarrolló un protocolo de disección y de fijación de embriones específico para *D. maidis*, que posibilita la eliminación química de las membranas extraembrionarias.
- Se elaboró una dieta artificial que permite alimentar a los insectos fuera de la planta y constituye una vía alternativa para el *delivery* de ARNdc en experimentos de silenciamiento génico.
- Se construyó un recipiente de alimentación artificial, en el cual las hembras son capaces tanto de alimentarse como de depositar sus huevos, lo que permite prescindir de la utilización de plantas como fuente de alimentación y oviposición y, al mismo tiempo, brinda la posibilidad de realizar ensayos que no son posibles *in situ*.

Bibliografía

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alivizatos, S. A. (1982). Feeding behavior of the spiroplasma vectors *Dalbulus maidis* and *Euscelidius variegatus* *in vivo* and *in vitro*. *Chronika Benaki Phytopathological Institutu* 13: 128-144.
- Auclair, J. L. (1967). Effects of pH and sucrose on rearing the cotton aphid, *Aphis gossypii*, on a germ-free and holidic diet. *Journal of Insect Physiology* 13(3): 431-446.
- Baumann, P. (2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology* 59: 155-189.
- Bennett, C. W. (1935). Studies on properties of the curly top virus. *Journal of Agricultural Research* 50(3): 211-241.
- Brentassi, M. E.; Franco, E.; Balatti, P.; Medina, R.; Bernabei, F. y de Remes Lenicov, A. M. M. (2017). Bacteriomes of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Insecta, Hemiptera, Cicadellidae: Deltocephalinae) harbor *Sulcia* symbiont: molecular characterization, ultrastructure, and transovarial transmission. *Protoplasma* 254(3): 1421-1429.
- Brooks, M. A. (1985). Nutrition, cell culture and symbiosis of leafhoppers and planthoppers. Pp. 195-216. En: *The leafhoppers and planthoppers*. Nault, L. R. y Rodriguez, J. G. (eds.). Wiley, New York.
- Buchner, P. (1965). *Endosymbiosis of animals with plant microorganism*. 909 pp. Wiley, New York.
- Carter, W. (1927). A technique for use with homopterous vectors of plant disease, with special reference to the sugar-beet leafhopper, *Eutettix tenellus* (Baker). *Journal of Agricultural* 34: 449-451.
- Carter, W. (1928). An improvement in the technique for feeding homopterous insects. *Phytopathology* 18: 246-247.
- Carter, W. (1928). Transmission of the virus of curly-top of sugar beets through different solutions. *Phytopathology* 18: 675-679.
- Davis, R. (1966). Biology of the leafhopper *Dalbulus maidis* at selected temperatures. *Journal of Economic Entomology* 59: 766
- Davis, G. K. y Patel, N. H. (2002). Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. *Annual review of entomology* 47(1): 669-699.

- Day, M. F. y McKinnon, A. N. N. E. (1951). A study of some aspects of the feeding of the jassid *Orosius*. Australian Journal of Biological Sciences 4(2): 125-135.
- Ehrhardt, P. (1968). Demonstration of sterol synthesis by symbiotic microorganisms in artificially nourished aphids (Homoptera, Rhyncota, Insecta). Experientia 24(1): 82.
- Esponda Behrens, N. I. (2013). Estudios funcionales comparados de la evolución de la segmentación en insectos. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de La Plata. 269 pp.
- Fife, J. M. (1932). A method of artificially feeding the sugar-beet leafhopper. Science 75(1948): 465-466.
- Fulton, R. A. y Chamberlin, J. C. (1934). An improved technique for the artificial feeding of the beet leafhopper with notes on its ability to synthesize glycerides. Science 79(2050): 346-348.
- Giménez Pecci, M.; Oliveira, E.; Resende, R.; Laguna, I.; Conci, L.; Avila, A.; Herrera, P.; Galdeano, E.; Virla, E. y Nome, C. (2002). Occurrence of corn stunt disease and maize viruses in the Provinces of Tucumán and Córdoba in Argentina. Fitopatología Brasileira 27 (4): 403-407.
- Hakim, R. S.; Baldwin, K. y Smagghe, G. (2010). Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. Annual review of entomology 55: 593-608.
- Heady, S. E.; Madden, L. V. y Nault, L. R. (1985). Oviposition behavior of *Dalbulus* leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae). Annals of the Entomological Society of America 78(6), 723-727.
- Heming, B. S. (2003). Insect Development and evolution. Cornell University Press. 444 pp.
- Herford, G. V. B. (1935). Studies on the secretion of diastase and invertase by *Empoasca solana* DeLong (Rhynchota, Homoptera, Jassidae). Annals of Applied Biology 22(2): 301-306.
- Houk, E. J. y Griffiths, G. W. (1980). Intracellular symbiotes of the Homoptera. Annual review of entomology 25(1): 161-187.
- Johannsen, O. y Butt, F. (1941). Embryology of insects and myriapods (the development history of insects, centipedes and millepedes from egg disposition to hatching). Ed. McGraw-Hill Book Company, Inc., N.Y. and London. 462 pp.
- Kelly, G. y Huebner, E. (1989). Embryonic development of the hemipteran insect *Rhodnius prolixus*, Journal of Morphology 199: 175–196.

- Körner, H. K. (1972). Elektronenmikroskopische Untersuchungen am embryonalen Mycetom der Kleinzikade *Euscelis plebejus* Fall. (Homoptera, Cicadina). Zeitschrift für Parasitenkunde 40(3): 203-226.
- Koyama, K. (1971). Selectivity of *Inazuma dorsal* to the color of artificial feeding. Japanese Society of Applied Entomology and Zoology 15: 269.
- Krause, G. (1939). Die Eitypen der Insekten. Biologisches Zentralblatt 59:495–536
- Latreille, P. A. 1825. Seconde section. Homoptères. Homoptera. 426–432. In. Familles naturelles du règne animal, exposées succinctement et dans un ordre analytique, avec l'indication de leurs genres. J.-B. Baillièrre, Libraire. Paris. 570 pp.
- Liu, P. Z. y Kaufman, T. C. (2005). Short and long germ segmentation: unanswered questions in the evolution of a developmental mode. Evolution & Development 7(6): 629-646.
- Liu, P. Z. y Kaufman, T. C. (2009). Dissection and fixation of large milkweed bug (*Oncopeltus*) embryos. Cold Spring Harbor Protocol doi:10.1101/pdb.prot5261.
- Madden, L. V.; Nault, L. R.; Heady, S.E. y Styer, W. (1984). Effect of maize stunting mollicutes on survival and fecundity of *Dalbulus* leafhoppers vectors. Annals of Applied Biology 105: 431–441.
- Madden, L. V.; Nault, L. R.; Heady, S.E. y Styer, W. (1986). Effect of temperature on the population dynamics of three *Dalbulus* leafhopper species. Annals of Applied Biology 108: 475–485.
- Maramorosch, K. (1979). Leafhopper tissue culture. En: Maramorosch K, Harris KF (eds). Leafhopper Vectors and Plant Disease Agents. Academic Press, New York: 485-511.
- McCutcheon, J. P. y Moran, N. A. (2007). Parallel genomic evolution and metabolic interdependence in an ancient symbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(49): 19392-19397.
- McCutcheon, J. P.; McDonald, B. R. y Moran, N. A. (2009). Convergent evolution of metabolic roles in bacterial co-symbionts of insects. Proceedings of the National Academy of Sciences 106(36): 15394-15399.
- Mellanby, H. (1934). The Early Embryonic Development of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Heteroptera). The Quarterly Journal of Microscopical Science 78: 71-90.

- Mito, T.; Nakamura, T. y Noji, S. (2010). Evolution of insect development: to the hemimetabolous paradigm. *Current opinion in genetics & development* 20(4): 355-361.
- Mitsuhashi, J. (1970). A device for collecting planthopper and leafhopper eggs (Hemiptera: Delphacidae and Deltocephalidae). *Applied entomology and zoology* 5(1): 47-49.
- Mitsuhashi, J. y Koyama, K. (1969). Survival of Smaller Brown Planthopper, *Laodelphax striatellus* FALLEN, on Carbohydrate Solutions: Hemiptera: Delphacidae. *Applied entomology and zoology* 4(4): 185-193.
- Mitsuhashi, J. y Koyama, K. (1971). Rearing of planthoppers on a holidic diet. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 14(1): 93-98.
- Mitsuhashi, J. y Maramorosch, K. (1963). Aseptic cultivation of four virus transmitting species of leafhoppers (Cicadellidae). *Contributions from Boyce Thompson Institute* 22: 165-173.
- Mittler, T. E. y Dadd, R. H. (1962). Artificial feeding and rearing of the aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), on a completely defined synthetic diet. *Nature* 195(4839): 404.
- Nault, L.R. (1990). Evolution of insect pest: maize and leafhopper, a case study. *Maydica* 35: 165-175.
- Nuorteva, P. (1951). Beobachtungen über das gegenseitige Zahlenverhältnis der Geschlechter bei einigen Zikadenarten. *Annales Entomologici Fennici* 17: 113-115.
- Oman, P. W. (1948). Distribution of *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott) (Homoptera, Cicadellidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 50(2): 34.
- Pagola, L. (2012). Análisis genómico y molecular de la embriología de *Rhodnius prolixus* (Stål, 1859) (Hemiptera, Reduviidae) – Implicancias morfológico-evolutivas en insectos. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de La Plata. 121 pp.
- Panfilio, K. A.; Liu, P.; Akam, M. y Kaufman, T. (2006). *Oncopeltus fasciatus* zen is essential for serosal tissue function in katatrepsis. *Developmental Biology* 292(1): 226-243.
- Panfilio, K.A. (2008). Extraembryonic development in insects and the acrobatics of blastokinesis. *Developmental Biology* 313(2): 471-491

- Paradell, S.; Virla, E. y Toledo, A. (2001). Leafhoppers species richness and abundance on crops in Argentina (Insecta-Hemíptera-Cicadellidae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 27 (4): 465-475.
- Pitre, H. N. (1967). Greenhouse studies of the host range of *Dalbulus maidis*, a vector of the corn stunt virus. *Journal of Economic Entomology* 60(2): 417-421.
- Ramírez, C.J.L.; de León, G. C.; García, M. C. y Granados, R.G. (1975). *Dalbulus guevarai* (DeL.) nuevo vector del achaparramiento del maíz en México: Incidencia de la enfermedad y su relación con el vector *Dalbulus maidis* (DeL. and W.) en Muna, Yucatán. *Agrociencia* 22: 39-49
- Rivera Pomar, R. y Jackle, H. (1996). From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling in the gaps. *Trends Genet* 12: 478-483
- Sander, K. (1959). Analyse des ooplasmatischen Reaktionssystems von *Euscelis plebejus* Fall. (Cicadina) durch Isolieren und Kombinieren von Keimteilen. I. Die differenzierungsleistungen nach verlagern von hinterpolmaterial vorderer und hinterer eiteile. *Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik*, Bd. 151: 430—497.
- Sander, K. (1976). Specification of the Basic Body Pattern in Insect Embryogenesis. In *Advances in Insect Physiology*. Academic Press 12: 125-238
- Sander, K. (1981). Pattern generation and pattern conservation in insect ontogenesis-problems, data and models. *Fortschritte der Zoologie*- 26: 101.
- Severin, H. H. P. y Swezy, O. (1928). Filtration experiments on curly top of sugar beets. *Phytopathology* 18: 681.
- Severin, H. y Freitag, J. (1933). Some properties of the curly-top virus. *Hilgardia* 8(1): 1-48.
- Storey, H. H. (1932). The filtration of the virus of streak disease of maize. *Annals of Applied Biology* 19(1): 1-5.
- Tautz, D. y Pfeiffle, C. (1989). A non-radioactive *in situ* hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* 98: 81–85.
- Triplehorn, B. W. y Nault, L. R. (1985). Phylogenetic classification of the genus *Dalbulus* (Homoptera: Cicadellidae), and notes on the phylogeny of the Macrostelini. *Annals of the Entomological Society of America* 78(3): 291-315.
- Virla, E. (1990). Biología de los Homópteros argentinos: I. Datos bionómicos preliminares de *Exitianus obscurinervis* (Stål, 1859) (Insecta-Cicadellidae). *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral* 21 (2): 129-137.

- Virla, E.; Diaz, C.; Carpane, P.; Laguna, I.; Ramallo, J.; Gerónimo Gómez, L. y Giménez Pecci, M. (2004). Evaluación preliminar de la disminución en la producción de maíz causada por el “Corn Stunt Spiroplasma” (CSS) en Tucumán, Argentina. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 30: 403-413.
- Virla, E.; Luft Albarracín, E. B. y Ordano, M.(2017). The oviposition pattern of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae): why Argentinian populations differ from Mexican populations? 15th International Auchenorrhyncha Congress and 10th International Workshop on Leafhoppers and Planthoppers of Economic Importance. July 9th-15th. Mendes, Brazil: 105-106.
- Yang, A. S. (2001). Modularity, evolvability, and adaptive radiations: a comparison of the hemi-and holometabolous insects. *Evolution & Development* 3(2): 59-72.

Anexo

10. ANEXO I

10.1. Protocolo de disección y fijación de embriones de *D. maidis*

Reactivos

- Buffer fosfato salino (PBS) 1x.
- Heptano.
- PBT.
- Metanol absoluto (MetOH 100%).
- Nitrógeno líquido (-196°C).
- Hielo.

Equipamiento

- *Shaker*.
- Lupa binocular.
- Pinzas de disección N°5.
- Mechero.
- Tubos *ependorf* con tapa a rosca.
- Recipiente de vidrio termoestable.

Método

Antes de comenzar, poner a calentar agua hasta que rompa hervor.

1. Colocar los huevos en nitrógeno líquido (-196°C) durante 5 minutos en tubos *ependorf* con tapa a rosca.
2. Ponerlos inmediatamente en hielo y agregar buffer fosfato salino (PBS) 1x. Asegurarse que todos los huevos se hallen sumergidos, en caso contrario, centrifugar brevemente.
3. Hervir los huevos durante 1 minuto.
4. Transferir al hielo hasta que se enfríen.

5. Descartar el PBS 1x y hacer dos lavados con 300µl de heptano, de 5 minutos cada uno, en movimiento.
6. Eliminar el heptano y añadir 300µl de PBS 1x.
7. Retirar los restos de corion y de membrana vitelina con ayuda de agujas entomológicas o pinzas de disección, bajo lupa binocular.
8. Los embriones limpios se almacenan a 4°C, en PBT.

En el caso de que el corion no se rompa, se incorpora metanol al PBS 1x y se procede a la limpieza como se indica en el punto 7. En cuanto a la membrana vitelina, en ciertas ocasiones, requiere de la adición de metanol absoluto (MetOH 100%) y de la exposición a bajas temperaturas (4°C) por varias horas u *overnight*.