

Estudio del virus asociado a la enfermedad azul del algodón (*Cotton leafroll dwarf virus*, CLRDV)



Dra. Ana Julia Distéfano



Instituto de Biotecnología-INTA-Castelar



CONICET

Enfermedad azul del algodón

Es una importante enfermedad presente en cultivos de algodón en varias regiones de África, Asia y América (Cauquil, 1977)

En la Argentina puede señalarse como antecedente lo que durante la campaña agrícola 1982/83 se denominó "mal de Misiones" y afectó en la provincia de Misiones a cultivos de la variedad La Banda 56 INTA y en menor proporción a SP Toba II INTA.

Es una enfermedad de incidencia económica en nuestro país, que produce pérdidas importantes en cultivos susceptibles y en ataques tempranos.

En la actualidad se implementan medidas de control, consistentes en la siembra de cultivares tolerantes a la enfermedad. Sin embargo, la tolerancia puede ser sobrepasada cuando la carga viral es alta en el campo, en años de ataque severo de la enfermedad.

Síntomas de la enfermedad



- ✓ Enanismo, entrenudos cortos y tallos en zig-zag.
- ✓ Enrollamiento de las hojas hacia su cara inferior
- ✓ Hojas con textura coriácea con coloración verde oscura–azulada

Vector: *Aphid gossypii* Glover o pulgón del algodón



Phylum: Arthropoda
Clase: Hexapoda
Orden: Hemiptera
Familia: *Aphididae*
Genero: *Aphidoidea*

El virus es transmitido por el vector *Aphis gossypii* Glover en forma persistente, circulativa y no-propagativa

No se transmite en forma mecánica

En el año 1994 el Dr. Lenardón (IFFIVE-INTA, Córdoba) mediante ensayos serológicos de DAS-ELISA, sobre plantas infectadas de la zona central de Chaco y utilizando antisueros contra *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) variedad RPV y PAV y *Beet western yellow virus* (BWYV), virus bien caracterizados de la familia *Luteoviridae*, determinó la existencia de una relación serológica.

En 2006, Correa *et al*, secuenciaron una región de 1405 nt del virus asociado a la enfermedad azul de algodón presente en Brasil, correspondiente a una parte del ORF de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y al ORF completo de la proteína mayoritaria de la cápside y determinaron que el virus pertenece al género *Polerovirus*, de la familia *Luteoviridae*

Cotton leafroll dwarf virus (CLRVD)

En la Estación Experimental Agropecuaria de Roque Sáenz Peña-INTA Chaco se desarrolla el Programa Nacional de mejoramiento genético de algodón.

Se realiza la inscripción y difusión de los nuevos cultivares mejorados.

- ⇒ Cacique, Chaco 530, Guazuncho 3, La Banda 300 y Oro Blanco 2 .
Son resistentes al virus que produce la enfermedad azul.
- ⇒ La evaluación de la resistencia a la infección por el CLRDV de los cultivares nuevos de algodón se realiza con el método de infección por el áfido transmisor, en condiciones controladas, que fue desarrollado en la estación experimental (Ing. Agr. Bonacic Kresic)



OBJETIVOS ESPECIFICOS

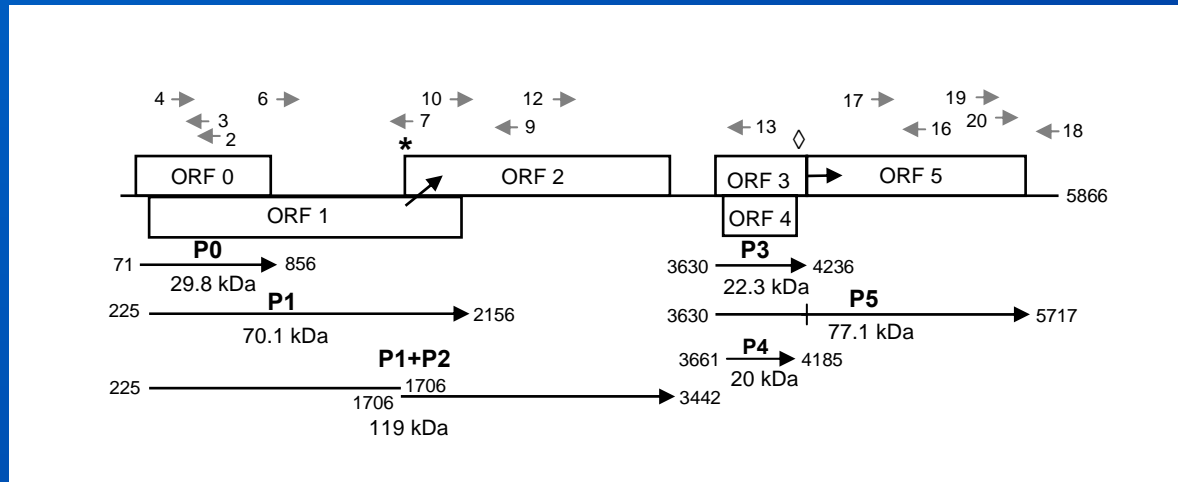
- ✓ Secuenciación del genoma del CLRDV-ARG, estudio de su organización genómica y estudios filogenéticos, para profundizar los conocimientos básicos que se tienen sobre el virus
- ✓ Desarrollo de métodos de diagnóstico moleculares e inmunológicos
- ✓ Desarrollo de una estrategia alternativa de infección mediante la construcción de un clon infectivo del virus, para la caracterización y selección de germoplasma resistente en los programas de mejoramiento de algodón de la EEA INTA Sáenz Peña, Chaco
- ✓ Diseño de una estrategia de control de la enfermedad por ingeniería genética. Construcción de vectores capaces de desencadenar silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) contra genes esenciales del *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV)

Secuenciación del genoma

En la EEA Saenz Peña del Chaco, se obtuvieron plantas infectadas con el virus presente en la zona en condiciones controladas de invernáculo.



El CLRDV-Arg posee un genoma de ARN simple cadena de 5866 nt y posee los seis marcos abiertos de lectura (ORFs) típicos de los *Polerovirus*

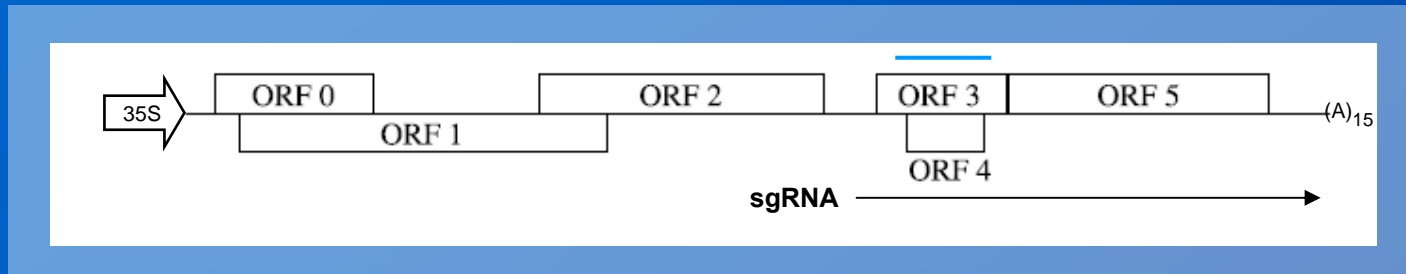


Los resultados de identidad obtenidos y el análisis filogenético realizados, confirman la presencia de un virus perteneciente a la familia *Luteoviridae*, género *Polerovirus*

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Secuenciación del genoma del CLRDV-ARG, estudio de su organización genómica y estudios filogenéticos, para profundizar los conocimientos básicos que se tienen sobre el virus
- ✓ Desarrollo de métodos de diagnóstico moleculares e inmunológicos
- ✓ Desarrollo de una estrategia alternativa de infección mediante la construcción de un clon infectivo del virus, para la caracterización y selección de germoplasma resistente en los programas de mejoramiento de algodón de la EEA INTA Sáenz Peña, Chaco
- ✓ Diseño de una estrategia de control de la enfermedad por ingeniería genética. Construcción de vectores capaces de desencadenar silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) contra genes esenciales del *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV)

Desarrollo y caracterización de un clon infectivo del virus

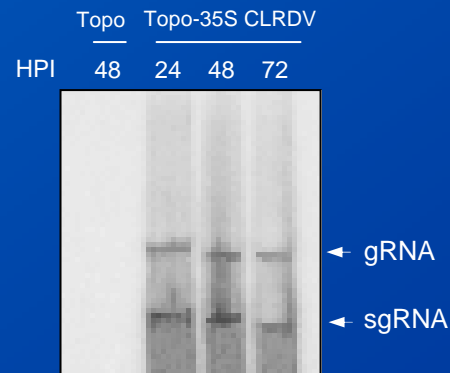


Electroporación de protoplastos de tabaco BY2 con 35S-CLRVDV



Northern blot

Estos resultados son alentadores porque demuestran que el clon infectivo puede transcribirse a partir del promotor 35S y que se genera el RNA subgenómico a partir de la expresión de las proteínas virales.



Infección *Gossypium hirsutum* var Banda 56 con el clon infectivo mediante *Agrobacterium tumefaciens*



—> Estudio del uso potencial del clon infectivo para la evaluación de la resistencia al CLRVD en programas de mejoramiento genético

Evaluar variedades de algodón en las cuales se conoce su respuesta ante la infección por el virus (variedades susceptibles y resistentes al CLRVD) que se infectaran con el áfido y con el clon infectivo para comparar ambos sistemas de infección.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Secuenciación del genoma del CLRDV-ARG, estudio de su organización genómica y estudios filogenéticos, para profundizar los conocimientos básicos que se tienen sobre el virus
- ✓ Desarrollo de métodos de diagnóstico moleculares e inmunológicos
- ✓ Desarrollo de una estrategia alternativa de infección mediante la construcción de un clon infectivo del virus, para la caracterización y selección de germoplasma resistente en los programas de mejoramiento de algodón de la EEA INTA Sáenz Peña, Chaco
- ✓ Diseño de una estrategia de control de la enfermedad por ingeniería genética. Construcción de vectores capaces de desencadenar silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) contra genes esenciales del *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV)

El silenciamiento es un mecanismo inducible y específico de degradación de ARN que evolucionó como un mecanismo de defensa antiviral en plantas. Se puede desencadenar por la expresión en una planta transgénica de secuencias del genoma del virus

Todo ARN con alta identidad a la secuencia al transgén será degradado por un complejo de proteínas celulares → Se obtendrá resistencia al virus

1- Selección de secuencias del virus causal de la enfermedad azul del algodón involucradas en la replicación o patogenia viral.

2- Construcción de vectores adecuados para desencadenar silenciamiento genico postranscripcional (PTGS) contra las secuencias seleccionadas del virus de la enfermedad azul.

Instituto de Biotecnología

Ana Julia Distéfano
Esteban Hopp

EEA Roque Saenz Peña

Ing. Agr. Ivan Bonacic Kresic
Ing. Agr. María Florencia Casse
Ing. Agr. Mauricio Tchat

IBMP Strasbourg-France

Veronique Ziegler-Graff

Financiación



INTA



ANPCyT, PICT 2006 N°60



CONICET



EMBO



IBMP

