

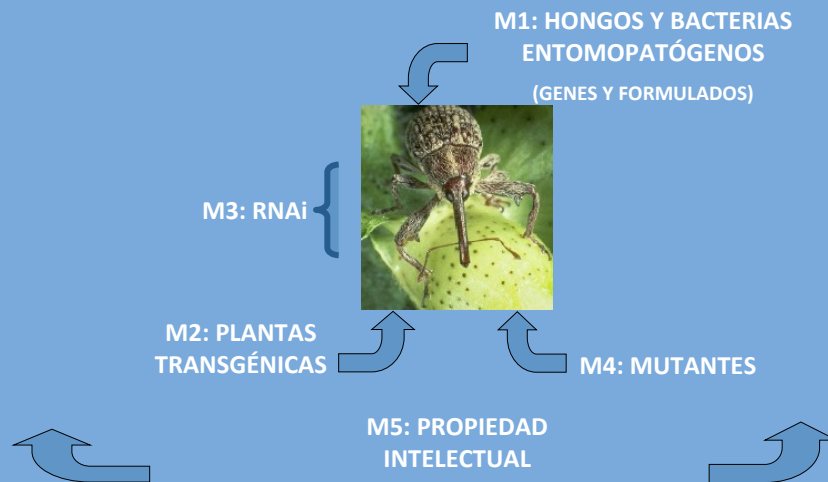
Convenio de Vinculación Tecnológica Nº 3110
INTA-Provincias

“Generación de Conocimientos y Tecnologías para
el Control del Picudo del Algodonero”

Dalia M. Lewi
Reunión ALIDA, Cartagena, 3 de octubre de 2013



Estrategia general del CVT
5 MÓDULOS



MÓDULO 1



Parte 1: Hongos Entomopatógenos



- 1- Se estableció la cría masiva del picudo del algodón.
- 2- Obtención de los parámetros poblacionales y biológicos de la cría de picudo de algodón mediante la confección de tablas de vida.
- 3- Aislamiento de nuevas cepas de hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*
- 4- Evaluación de la patogenicidad y virulencia de diferentes aislamientos de Bb y Ma:
Se lograron preseleccionar cepas de ambas especies fúngicas.

MÓDULO 1. Parte 1 Hongos entomopatógenos



- 5- Efecto de la infección fúngica sobre la alimentación y oviposición de adultos de picudo
- 6- Compatibilidad entre las cepas preseleccionadas y los agroquímicos más comúnmente utilizados en cultivos de algodón
- 7- Preferencia en alimentación y oviposición del picudo del algodón en los diferentes genotipos de algodón. (frego, hoja okra y planta roja)
- 8- Ensayos preliminares en el campo con una formulación experimental de micoinsecticida (cepa Bb23). Los primeros resultados en jaulas mostraron mortalidades próximas al 50% y , en parcelas, comparado con un químico, con resultados promisorios. Estos ensayos permitieron hacer ajustes de dosis, momento y cepas a utilizar en el futuro.



MÓDULO 1. Parte 2 Bacterias entomopatógenas

1. Se obtuvieron nuevos aislamientos de cepas de *B thuringiensis* formadores de cristales parasporales (15).
2. Evaluación del potencial patogénico de los aislamientos
3. Caracterización de las cepas preseleccionadas y factores activos
4. Detección de β exotoxina



Larva del picudo alimentándose dentro del botón floral

MÓDULO 1. Bacterias entomopatógenas



Ensayo biológico

5. Detección de otros factores tóxicos específicos (proteínas Vip1-Vip2; Cry1I)
6. Secuenciación de los genes codificantes de factores de virulencia
7. Confirmación de la presencia de *cry1Ia*: sería responsable de mortalidad larval de hasta el 50% y las diferencias encontradas entre cepas, deberse a distintos niveles de expresión de la proteína o a otros factores inespecíficos.
8. Desarrollo de bioinsecticida / Utilización de genes para la transformación del algodón
9. Los genes de interés encontrados en las cepas nativas son idénticos a otros ya reportados a nivel internacional.
Debería analizarse la factibilidad (según protección de patentes) para su uso en el proceso de transformación de algún cultivar de algodón, a ser empleado dentro de los límites del territorio nacional.

larva sana

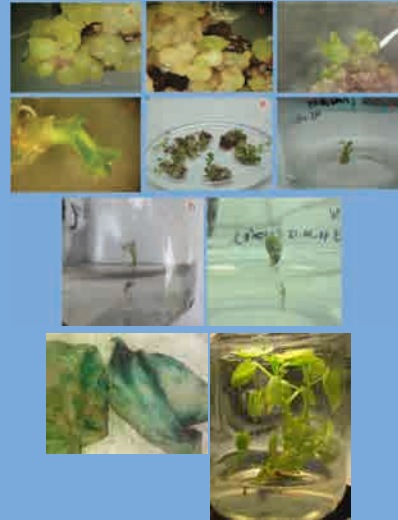


larva afectada

MÓDULO 2

Desarrollo de metodología para la transformación genética del algodón

1. Se han establecido las condiciones de cultivo *in vitro* y transformación.
2. Se han logrado tasas de transformación en callos similares a las reportadas en la bibliografía.
3. Para mejorar la tasa de embriogénesis somática se han realizado variaciones sobre el protocolo original



MÓDULO 2

PRINCIPALES LOGROS

5. Se analizó la respuesta al cultivo *in vitro* de genotipos de INTA: 3 variedades (Guazuncho 3, Oro Blanco 2 y Porá Ité) y 1 línea de algodón (SP 48114), evidenciando la respuesta diferencial de estas líneas, destacándose la Línea SP 48114 y el cultivar Oro Blanco 2 (con ambos protocolos estudiados).
6. obtención de callos transformados para realizar desafíos en picudos.



MÓDULO 3

Evaluación de una estrategia para el control del picudo del algodón, basada en la ingestión oral de dsRNA que induzcan silenciamiento génico.

1. Análisis del transcriptoma de células del intestino medio de larvas de *A. grandis* y selección de genes a silenciar mediante ARN interferente.
2. Clonado de genes seleccionados y síntesis *in vitro* de ARN de doble cadena (ARNdc) para su evaluación mediante bioensayos en larvas y adultos de *A. grandis*.



MÓDULO 3



3. Transformación genética de "plantas modelos" para evaluar la expresión de ARNds de genes seleccionados y su efecto mediante ingestión, en larvas y adultos de *A. grandis*.



4. Transformación genética de callos de algodón que expresen ARNdc del gen seleccionado.

MODULO 4

Evaluación de mutantes de algodón para incremento de la resistencia a plagas

Obtener genotipos de *Gossypium hirsutum* L. que presenten, mediante la incorporación de alelos mutantes, resistencia incrementada a insectos plaga, principalmente a picudo del algodón *Anthonomus grandis* Bho.

Fuentes de tolerancia a insectos: apilamiento



MÓDULO 4



El proceso de crianza permitió

- obtener líneas con 2 características mutantes (High glanding –bráctea frego) y (High glanding –nectariless)
- generar conocimientos sobre herencia de nuevos genotipos



Las progenies obtenidas permitirán obtener variedades de algodón que minimicen el daño del picudo

Se evaluó línea SP 47304 fr en comparación con variedades de brácteas normales, observando una reducción significativa en las poblaciones de picudo.



MÓDULO 5

Análisis de la situación de la Propiedad Intelectual relacionado con la transformación genética del algodón.

Objetivo General

Conocimiento de la situación de Propiedad Intelectual en Argentina sobre transgénicos en algodón.

Objetivos específicos

Análisis de la documentación referida a solicitudes y patentes alojadas en el INPI.

Estudio caso por caso de la Propiedad Intelectual de las metodologías e insumos (germoplasma, genes o sus partes, etc.) a ser utilizados en este proyecto.

CONCLUSIONES GENERALES

- Se han cumplido TODOS los objetivos planteados en cada módulo de trabajo.
- Se cuenta con tecnologías específicas para el abordaje del control del picudo, desarrolladas, adoptadas y probadas en INTA.
- Estamos en condiciones de plantear una segunda etapa en donde se podrán utilizar las herramientas y conocimientos desarrollados con el fin de la obtención de un producto con resistencia al picudo.
- Se han abierto otras posibilidades de aplicación de estas tecnologías para resolver otros problemas del algodón (enfermedad azul, lepidópteros, etc).

Gracias por su atención

Convenio de Vinculación Tecnológica Nº 3110
INTA-Provincias

“Generación de Conocimientos y Tecnologías para el
Control del Picudo del Algodonero”

Propuestas para CVT Algodón-Picudo II





| | Tema propuesto | Objetivo principal | Resultado esperado |
|-----|----------------------|--|---|
| 1.1 | Atrayentes y trampas | Evaluar la respuesta de los insectos hacia atrayentes y trampas de fabricación nacional y explorar otras fuentes de compuestos activos | Utilizar un atrayente específico de picudo fabricado en el país permitirá contar con un producto de menor costo y evitar discontinuidades en la provisión por importaciones. Fomentará el sector agroindustrial relacionado con el control no contaminante de plagas. |

| | Tema propuesto | Objetivo principal | Resultado esperado |
|-----|-----------------------------|---|--|
| 1.2 | RNA de interferencia (RNAi) | Evaluar la eficiencia del silenciamiento específico de diferentes genes del insecto mediante la ingestión oral de RNA doble cadena sintetizado in vitro o mediante su expresión en plantas. | Los datos de mortalidad obtenidos de los ensayos realizados durante el CVT demuestran que es posible controlar a larvas y adultos de picudo mediante el uso de RNAi. Para aplicar este conocimiento se evaluará el efecto del silenciamiento de genes de picudo en forma individual o combinada en plantas modelo genéticamente modificadas capaces de producir niveles de ARN doble cadena letales para picudo. |

| | Tema propuesto | Objetivo principal | Resultado esperado |
|-----|------------------------------------|--|---|
| 1.3 | Obtención de eventos con RNAi y Bt | Desarrollar y obtener eventos transgénicos de algodón con las secuencias derivadas de los estudios de RNAi para picudo y de secuencias de Bt | Se aplicará el protocolo de transformación de algodón ajustado durante el CVT en la obtención de plantas transgénicas con secuencias del picudo (RNAi) de eficacia probada (módulo 1.2) y/o con secuencias de genes de bacterias Bt evaluados (módulo 1.4). |

| | Tema propuesto | Objetivo principal | Resultado esperado |
|-----|------------------------|---|---|
| 1.4 | Hongos entomopatógenos | Desarrollar un microinsecticida o formulado experimental utilizando una cepa nativa de hongos entomopatógenos para emplearlo como control microbiano. | Se podrá contar con un esquema de control microbiano dentro de una estrategia de Manejo Integrado de Plagas, que puede adaptarse a diferentes tipos de producción (tradicional, orgánica o combinada con transgénicos). |

| | Tema propuesto | Objetivo principal | Resultado esperado |
|-----|-----------------------|--|---|
| 1.5 | Proteínas bacterianas | Selección de factores de virulencia específicos para larvas del picudo a partir de cepas nativas de Bt | Se estudiarán las proteínas detectadas en las cepas de Bt seleccionadas; se explorará la utilización de las proteínas solas o combinadas para encontrar la combinación más eficiente para el control de la plaga para prevenir posibles mecanismos de resistencia a una proteína insecticida única. |

| | Tema propuesto | Objetivo principal | Resultado esperado |
|-----|--|--|--|
| 1.6 | Evaluación y combinación de mutantes a campo | Obtener líneas genéticas de algodón con mayor tolerancia a picudo, seleccionando líneas genéticas F3 con buen comportamiento agronómico y bractea frego. | Variedades Guazuncho 3 INTA y Pora lte INTA con los genes de bractea frego transferidos. Caracterización del comportamiento de éstas ante los ataques de picudo. |

| | Tema propuesto | Objetivo principal | Resultado esperado |
|-----|-----------------------|--|---|
| 1.7 | Propiedad intelectual | Identificar y analizar los derechos intelectuales involucrados en el desarrollo del CVT. | Conocimiento del status legal de las tecnologías a utilizar para impedir obstrucciones en el uso de las mismas; gestionar el licenciamiento o transferencia de conocimiento para acelerar los tiempos de desarrollo de los productos a obtener. |