

HERRAMIENTAS DE BIOTECNOLOGIA APLICADAS A SUMAR COMPETITIVIDAD Y SUSTENTABILIDAD A LA CADENA DE TRIGO

*Subproyecto Stress Biótico
Proyecto N2 PICT IFFIVE- INTA*

DESARROLLO DE TÉCNICAS MOLECULARES Y BIOLÓGICAS PARA
LA EVALUACIÓN DE RESISTENCIA AL *WHEAT STREAK MOSAIC
VIRUS (WSMV)* Y SU VECTOR EN PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO



Por Dra. Graciela Truol
IFFIVE-INTA

DESARROLLO DE TÉCNICAS MOLECULARES Y BIOLÓGICAS PARA LA EVALUACIÓN DE RESISTENCIA AL *WHEAT STREAK MOSAIC VIRUS* (WSMV) Y SU VECTOR EN PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO

- **Investigador Responsable**
- *Dra. Graciela Ana María Truol*

- **Grupo de Investigadores Responsables:**
- *Dra. Paola Lopez Lambertini*
- *Ing. Agr. Msc. Carlos Bainotti*

- **Colaboradores**
- *Ing. Mónica Sagadín*
- *Ayud. Lab Mónica Rodríguez*



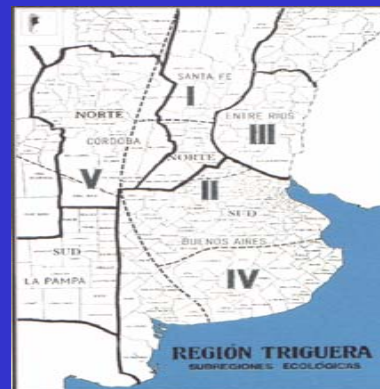
Relevancia del Problema

Objetivos Generales

Objetivos específicos,

Metodología y tiempos de trabajo

Presupuesto



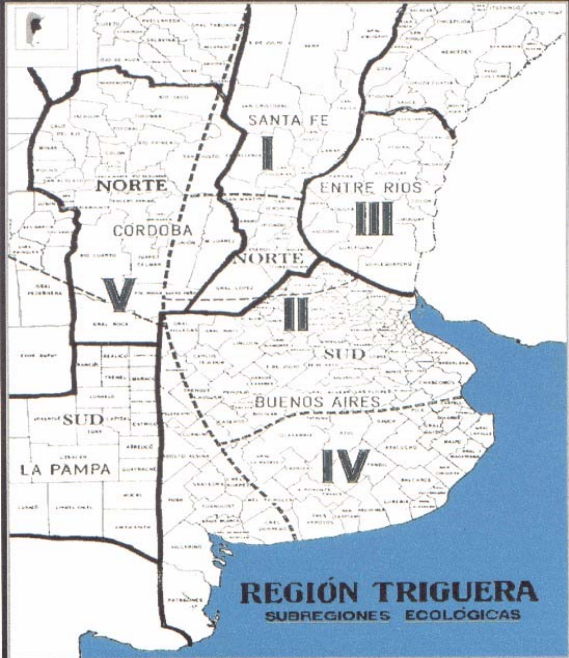
DESARROLLO DE TÉCNICAS MOLECULARES Y BIOLÓGICAS PARA LA EVALUACIÓN DE RESISTENCIA AL *WHEAT STREAK MOSAIC VIRUS* (WSMV) Y SU VECTOR EN PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO

- *Barley yellow dwarf virus* BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-MAV, BYDV-RMV.
- *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV-RPV)
- *Wheat streak mosaic virus* (WSMV)
- *Barley stripe mosaic virus* (BSMV)
- *Mal de Río Cuarto Virus* (MRCV)
- *Soil borne wheat mosaic virus* (SBMV)
- *Cereal Rhabdovirus* (2006/07)
- 7 enfermedades 3 razas o variantes de un virus.

DESARROLLO DE TÉCNICAS MOLECULARES Y BIOLÓGICAS PARA LA EVALUACIÓN DE RESISTENCIA AL *WHEAT STREAK MOSAIC VIRUS* (WSMV) Y SU VECTOR EN PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO

RELEVANCIA DEL PROBLEMA

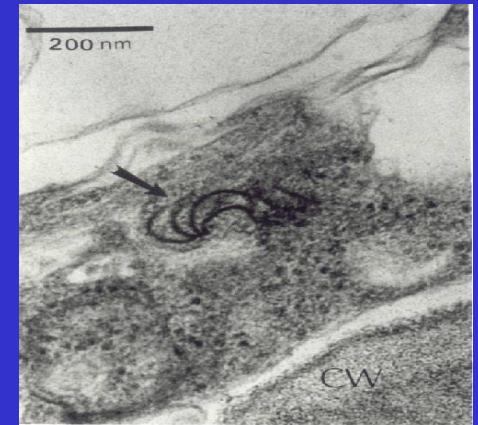
La enfermedad se detectó por primera vez en las localidades de J. María y Marcos Juárez (Cba, 2002) presentándose desde entonces con mayor o menor incidencia y en infecciones simples y/o mixtas dependiendo de factores ambientales, momento de infección, presencia del vector y cultivares afectados



Características de la enfermedad



Daño: hasta un 100%
Epifitias regionales

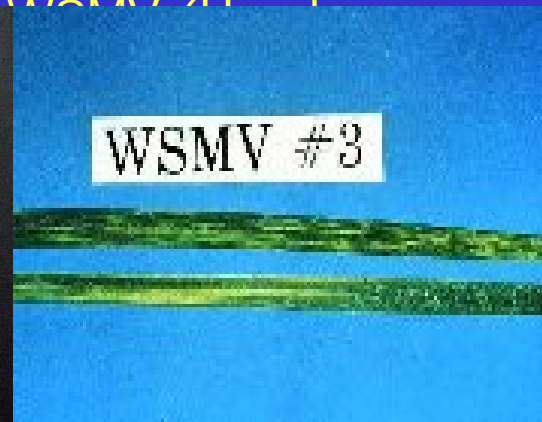


Campaña 2007 Zona Mar y Sierras (SE.Bs.As.) Epifitias



Mosaico estriado del trigo o *Wheat streak mosaic virus* (WSMV): Importancia, distribución

- En Argentina se ha confirmado su presencia hasta el momento en Bs. As., S. Fe, Salta, Tucumán, Sgo del Estero, La Pampa, E. Ríos y Córdoba.
- Las pérdidas pueden ser de hasta un 100 % en infecciones tempranas.
- En Kansas (EE.UU) en 1988 se reportó una epifitía que ocasionó pérdidas de USD 130 m/año. En Montana se estimaron pérdidas por 12,7 millones en una epifitía del año 1993 (Bayley *et al*, 2001).
- En el año 2000 hubo otra epifitía importante en la que hubo un 10 % de las superficies sembradas de trigo afectadas por WSMV (Uzun *et al*, 2000).



Mosaico estriado del trigo o Wheat streak mosaic virus (WSMV):

Importancia



-En Argentina se registra su presencia desde el año 2002, en la zona central de la Pcia. de Cba, pero se ha evidenciado una rápida expansión de la enfermedad en el 2004-2007.

En noviembre del año 2003 se declara (SENASA) plaga "no cuarentenaria reglamentada"

-Es una de las enfermedades más importantes del trigo en USA, Canadá, Jordania, Rumania, Alemania, Bulgaria Hungría. En Méjico fue recientemente reportada en el estado de Nuevo León .

-WSMV es el causal de grandes pérdidas económicas en Colorado, Idaho, Dakota, Montana, Texas, Oklahoma y Washington en USA debido a epifitias regionales (Argentina, 2007 Mar y Sierras). En Australia se menciona una severa epifitia en el año 2003

Wheat streak mosaic virus (WSMV): síntomas

Potyviridae: Tritimovirus,

Aceria tosichella (Acarina: Eriophyidae), semipersistente

Afecta, trigo, avena, cebada, triticale, maíz y en las *Poáceas* numerosas pasturas

Mosaico estriado, en infecciones tardías solo afecta una porción de la hoja, variado grado de necrosis, muerte de macollos, cuando ataca después del macollaje se forman espigas pero estériles con reducido número de semillas y con marchitamiento de los granos.



SÍNTOMA DE LA PRESENCIA DEL ÁCARO



Mosaico estriado del trigo o Wheat streak mosaic virus (WSMV): Forma de Transmisión

-Se menciona transmisión por semilla en maíz de 0,03 % y en trigo de 0,01 %. En Argentina se detectó el valor **máximo en Tres Arroyos 1,58 %**

-*Aceria tosichella* (Acarina: Eriophyidae), semipersistente

-Recientemente (2004) se detectó e identificó en Argentina la presencia del vector.

-El vector es llevado por el viento grandes distancias y dispersa la enfermedad



RESERVORIOS DEL MITE Y DEL VIRUS

- El trigo es el alimento preferido del WCM y un excelente huésped para la multiplicación del virus.
- También se alimenta y reproduce en varias otras especies tales como maíz (*Zea mays*), cebada (*Hordeum vulgare*), avena (*Avena sativa*).
- Las pasturas y el trigo son los reservorios primarios dónde sobreviven el virus y el mite durante largo tiempo.
- Se ha mencionado a *Bromus secalinus* como la especie de pastura reservorio del virus en Dakota del Norte (Mc Mullen, 2002) y *Corynephorus canescens* (L), *Avenula pratensis* (L), *Bromus inermis* Leiss en Polonia (Skarocka and Kuczynski, 2006; Keifer, 1938; Keifer, 1969; Nalepa, 1891; Kozlowski , 2001).
- Los trigos voluntarios son el reservorio del virus y del mite para el ataque del trigo en invierno y actúan de puentes verdes, por lo que deberían ser tratados con herbicidas.

Malezas reservorios del WSMV en la zona Mar y Sierras (Bs.As.)

- *Digitaria sanguinalis*,
Echinochloa crusgalli y
Setaria sp.
- Se detectó en Avena de
crecimiento espontáneo,
trigos guachos y maíz
(Cba.).



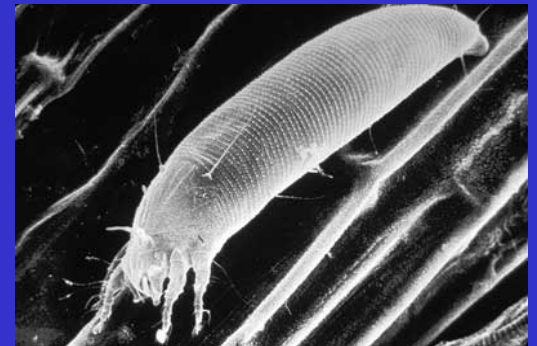
Mosaico estriado del trigo o Wheat streak mosaic virus (WSMV): Forma de Transmisión

- El vector adquiere el virus después de alimentarse unos pocos minutos de una planta enferma y es infectivo durante toda su vida (entre 6-8 días). SEMIPERSISTENTE, no se transmite a la descendencia

- En invierno sobrevive como huevo, ninfa o adulto en pasturas perennes ó trigo

- Otoños cálidos

- En verano los trigos espontáneos son los puentes verdes entre el trigo y el maíz



Mosaico estriado del trigo o Wheat streak mosaic virus (WSMV): transmisión por semilla

El máximo porcentaje de transmisión por semilla en infecciones naturales obtenidos hasta el momento ha sido del 1, 55 % en semillas provenientes de Tres Arroyos (Bs.As)



Mosaico estriado del trigo: Presencia en la campaña 2006

Puntos de detección en la Pcia de Córdoba

Localidades:

1 - Arias : WSMV 10 %

2 - Corral de Bustos : WSMV 10 %

3- Rio Cuarto (Norte) WSMV 7 %,

4-Jesús María: WSMV 10 %, WSMV 60 %



Otras Provincias

-Bs.As.: Azul, Cañada de los Huesos, Tandil, Balcarce y Loberías

-En infecciones mixtas BYDV-SGV + WSMV, Loberías Bs. As

En Cañada de los Huesos (Bs.As) disminución en el rendimiento fue de entre un 30 % a un 50 %

Prospección de BYDV 2007 en Cba.

Localidad	Cultivar	% de Incidencia de WSMV	% de Incidencia de HPV	Nº de ácaros en 4 ml
Jesús María	Klein Capricornio	3 %	0 %	0
	ACA 304	10 %	10 %	0
Marcos Juárez	Biointa 1003	7 %	3 %	0
	Biointa 1002	3 %	3 %	0
	Baguette P.13	27 %	13.3 %	4
Corral de Bustos	Biointa 1002	10 %	7 %	0
	Biointa 3004	3 %	0 %	0
Escalante	s/c	0 %	0 %	0
Villa de los Patos	s/c	0 %	0 %	0
Belle Ville	Baguette P.11	0 %	0 %	0
Cintra	Biointa 3000	0 %	0 %	0
Totoral	Onix	0 %	0 %	0
Río Primero	s/c	5 %	5 %	0
Sanabria	Baguette 19	0 %	0 %	0
La Carlota	Tijetera	0 %	0 %.	0
	Klein Capricornio	0 %	0 %	0
	ACA 303	0 %	0 %	0
Manfredi	Klein Capricornio	13 %	0 %	0
San Francisco	Baguette 19	0 %	0 %	1
	Baguette 11	0 %	0 %	0
	Biointa 1002	3 %	3 %	0
Freire	Baguette P.13	0 %	0 %	0
Río Cuarto	s/c	23 %	13.3 %	0
Las Acequias	s/c	5 %	5 %	0
Tío Pujio	Onix	0 %	0 %	0

WSMV en vivero de verano (EEA-INTA-Balcarce, 100 % de incidencia(2008)



Objetivos Generales

Caracterizar molecularmente el WSMV y su vector, y desarrollar técnicas moleculares y biológicas para evaluar la susceptibilidad de diferentes cultivares utilizadas en la Argentina.



Objetivos Específicos

metodología, cronograma

- **1- Caracterización del WSMV y optimización de diferentes técnicas moleculares para la detección de la enfermedad**
- **1-a-Aislar y multiplicar variantes del WSMV de diferentes regiones geográficas.** Transmisión mecánica, de aislamientos de diferentes orígenes, identidad se corroborará por ELISA

Permanente (todos los meses del año 1, desde(20/10/08))

- **1-b- Secuenciar y analizar el extremo 3' de los aislamientos de WSMV de diferentes áreas de Argentina.**
- Clonado y secuenciado del extremo 3', como molde RNA total de planta para RT PCR, como iniciadores se usará RCF1, e iniciadores degenerados Poty 4 y Poty 4 1 que amplifica un fragmento de 2kb del extremo 3' del virus, estos hibridan dentro de una región conservada de la secuencia codificante de la NIb (iniciadores universales de Potyvirus). Los productos de PCR se clonarán (kiy TOPO TA, Invitrogen) Las secuencias de la proteína de la cápside y región de la NIb se compararán con la de otros Tritimovirus

Noviembre 2008 a Octubre 2009

- **1-c- Optimizar diferentes técnicas moleculares para la detección del WSMV**
- El DNA se marcará por el método de *Random primed (con dioxigenina, Kit Dig labelling and detection, Roche)*, se evaluará la eficiencia de la sonda comparándola con una sonda de concentración conocida provista por el kit
- **Agosto 2008 a Diciembre 2009**

Objetivos Específicos metodología, cronograma

- **2- Ajuste de técnicas de cría y manejo del vector para la evaluación de resistencia al WSMV**
- 2-a- Críar diferentes poblaciones de *Aceria tosichella*. A partir de huevos, 25 C + 3 C, fotoperíodo de 16 Hs. de luz en trigo, control de plantas por ELISA

Permanente (todos los meses del año 1, desde(20/10/08))

- **2-b- Evaluar la interacción WSMV-hospedante-vector determinando los tiempos óptimos de transmisión.**
- Adquisición del WSMV en plantas enfermas durante 15 minutos y /o 16 hs, e infección durante 3 días en plantas sanas 10 plantas de trigo en 3 repeticiones luego se evaluará el porcentaje de transmisión del WSMV

Permanente (todos los meses del año 1, desde(20/10/08))

Objetivos Específicos

metodología, cronograma

- **3-Adaptación de técnicas moleculares para la caracterización del ácaro-vector**
 - 3-a- Caracterizar molecularmente poblaciones de mites (WCM) de diferentes orígenes de Argentina.
 - Por secuenciación de dos regiones genómicas (16 SmtDNA) y una reg. *Interna Transcribed Spacer* (ITS) de r DNA según Navia *et al*, 2005. Extracción de DNA con el Kit de extracción " Quiagen DNeasy" según instrucciones del fabricante, la amplificación por PCR, de la región ITS, será realizada utilizando los primers 5' AGA GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG 3' y 5' ATA TGC TTA AAT TCA GGG GG 3'. El fragmento 16S será amplificado utilizando los *primers* PCR LR-J 12887 (5' CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T 3') y LR-N 13398 (5' CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT 3'). Las secuencias serán alineadas utilizando el programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994), aplicando los parámetros padrones del programa y enseguida manualmente editado utilizando el programa BioEdit (Hall, 1999).
- **Julio 2009 a Noviembre 2009**
 - 3-b- Determinar la eficiencia de transmisión de poblaciones de mites (WCM) previamente caracterizados
 - Obtenidos los tiempos óptimo de transmisión (ya ajustados y probados en el ensayo anterior, objetivo 2 b) se procederá a la transmisión por WCM con cada una de las poblaciones de diferentes orígenes geográficos que estén bajo cría, para determinar la eficiencia de transmisión de las mismas. Se elegirá un aislamiento de WSMV y una de las poblaciones bajo cría, se emplearán 8 plantas de un cv de trigo susceptible y 2 sanas como control con tres repeticiones se colocarán 20 ácaros por planta, se determinará el número de plantas enfermas para cada población empleada evaluando la eficiencia de transmisión de las poblaciones bajo estudio empleando la técnica serológica de DAS ELISA.
- **Junio , Julio Agosto 2009**

Objetivos Específicos metodología, cronograma

- **4- Evaluación de la susceptibilidad al WSMV y al mite (WMV) de diferentes cv de trigo**
- 4-a- Transmitir el WSMV por vectores a diferentes cv de trigo. (que incluirán los solicitados por las Compañías participantes en el proyecto).
- Mites provenientes de huevos serán alimentados en dos grupos de 5 plantas cada una, no infectadas e infectadas (mediante transmisión mecánica). Con cada uno de los aislamientos en estudio, después de dos semanas alimentándose de dichas plantas se colocarán 20 mites por planta en un total de 40 plantas, permaneciendo 7 días en las mismas y luego serán eliminados. Los síntomas se evaluarán después de 15 días y se controlarán mediante la prueba serológica de ELISA indirecto (Sánchez et al, 2001) y /o sonda de hibridación.
- **Junio a Noviembre 2009**
- 4-b- Evaluar la susceptibilidad al WSMV en transmisiones mecánicas de diferentes cv de trigo de interés comercial en la Argentina (que incluirán los solicitados por las Compañías participantes en el proyecto).
- En cada ensayo participarán diferentes cultivares de trigo. El diseño a utilizar será en BCA con 3 repeticiones, en parcelas de 7 surcos de 3m, con 20 cm entre surcos, sembradas a chorrillo y a una distancia entre parcela de 40cm.
- La densidad de siembra será calculada para cada material a evaluar. Estas parcelas recién germinadas, serán inoculadas mediante infección artificial (Truol *et al*, 2004). Los cultivares serán evaluadas mediante una escala de severidad de síntomas del 1 al 5 y mediante la prueba serológica de ELISA se determinará la concentración relativa a través de los valores de absorbancia a 405nm y sonda.

Junio a Noviembre 2009

PRESUPUESTO

Primer año

PICT- PAE

Participantes	Graciela Truol	Carlos Bainotti	Paola López Lambertini
Insumos	\$5.335,87	\$ 2.200	\$6.333
Servicios a terceros	\$ 1.867	\$800	\$ 2.000
Viáticos	\$ 2000	\$ 700	\$ 1300

Se saco proporcionalmente a cada uno de los integrantes para pagar gastos de administración del subsidio

Total solicitado 1 año: \$23.333

Gastos de administración:\$897,43



Grupo de Trabajo de virosis de cereales

Dra Paola López Lambertini

Ing. Carlos Bainotti

Ing. Agr. Mónica Sagadín

Ayudante de Laboratorio

Mónica Rodríguez

Responsable Dra. Graciela Truol

Investigadora de virosis de cereales

gtruol@correo.inta.gov.ar

