



Universidad Nacional de Nordeste



Facultad de Ciencias Agrarias

Estudio del uso potencial de un clon infectivo del *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV) como método alternativo al sistema tradicional de infección con áfidos para la transmisión de la enfermedad azul del algodónero

Tesista: Ing. Agr. María Florencia Casse

Directora: Dra. Ana Julia Distéfano

Co-Director: Ing. Agr. (Esp. P.V.) Iván Bonacic Kresic

Este trabajo de tesis ha sido presentado para obtener el grado de Magíster en
Producción Vegetal

2017

*Esta tesis está dedicada a José, mis padres,
mi hermana Virginia y
muy especialmente a mi hijo Nicolás*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi especial agradecimiento a mis directores de tesis, la Dra. Ana Julia Distéfano y el Ingeniero Agrónomo Iván Bonacic Kresic, gracias por su paciencia, consejos y por el ejemplo a seguir que ambos representan para mí, como profesionales y más aún como personas.

GRACIAS a todos mis compañeros de laboratorio, Dany, Alicia, Diana, y a "*los muchachos*": Omar, Jorgito y Coro.

GRACIAS a todo el grupo de Mejoramiento Genético y el Laboratorio de Biotecnología de INTA Sáenz Peña, por su colaboración, brindando su tiempo y espacio de trabajo, especialmente a Lorena, Ariela, Fernando, Mónica y Mauricio.

GRACIAS a Vero y Yami, por todo el apoyo y buen recibimiento en mis viajes al Instituto de Biotecnología de INTA Castelar, y a todas la personas que allí tuve la oportunidad de conocer.

GRACIAS a dos grandes amigas y compañeras de Maestría, *Marita* y *Marce*, por los hermosos e inolvidables momentos compartidos, y porque hicieron que todo fuera más fácil.

Y a todos los que de alguna manera u otra contribuyeron a la realización de ésta Tesis
¡MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
LISTA DE TABLAS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	V
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
ABREVIATURAS.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Importancia del cultivo de algodón.....	1
1.2 Principales enfermedades que afectan al cultivo de algodón en la Argentina.....	3
1.3 Importancia de la enfermedad azul del algodnero.....	4
1.4 Identificación del agente causal de la enfermedad azul: <i>Cotton leafroll dwarf virus</i> (CLRDV).....	7
1.5 Modo de transmisión del CLRDV.....	9
1.6 Mejoramiento Genético de algodón para enfermedades.....	12
1.6.1 Transmisión secuencial con el insecto vector.....	14
1.6.2 Desarrollo de métodos alternativos de infección a través de clones infectivos.....	16
2. HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 Material biológico.....	18
3.2 Metodología de cría y multiplicación del insecto vector en invernáculo.....	18
3.3 Inoculaciones con áfidos virulíferos en invernáculo.....	19
3.4 Ensayos de agroinfección.....	20
3.5 Ensayos de transmisión con áfidos desde plantas agroinfectadas.....	21
3.6 Extracción de ARN de áfidos.....	22
3.7 Extracción de ARN de plantas de algodón.....	22

3.8 Detección del genoma del CLRDV por RT-PCR.....	23
3.9 Visualización de los productos de amplificación	24
3.10 Clonado y secuenciación del ORF 3.....	24
3.11 Análisis estadísticos	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Resultados previos al inicio de la Tesis	26
4.2 Cría y multiplicación de <i>Aphis gossypii</i> virulífero	26
4.3 Establecimiento del sistema de transmisión no natural del CLRDV con el insecto vector	27
4.4 Análisis del aislamiento de CLRDV presente en áfidos virulíferos	28
4.5 Establecimiento del método de agroinfección con el clon infectivo del CLRDV .	30
4.6 Ensayos de transmisión del CLRDV con áfidos a partir de plantas agroinfiltradas	32
4.7 Estudio del uso potencial del clon infectivo para la evaluación de la resistencia al CLRDV.....	32
4.8 Evaluación de la resistencia a CLRDV de líneas mejoradas de algodón utilizando el método de agroinfección	35
5. DISCUSIÓN.....	39
5.1 Restablecimiento del sistema de transmisión del CLRDV con el insecto vector	40
5.2 Establecimiento del método de agroinfección con el clon infectivo del (CLRDV) en la EEA Sáenz Peña	43
5.3 Ensayos de transmisión con áfidos desde plantas agroinfiltradas	44
5.4 Estudio del uso potencial del clon infectivo para la evaluación de la resistencia al CLRDV.....	45
5.5 Evaluación de la resistencia a CLRDV de líneas mejoradas de algodón utilizando el método de agroinfección	48
5.6 Perspectivas futuras	50
6. CONCLUSIONES	52
7. BIBLIOGRAFÍA.....	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Superficie sembrada con algodón por provincia desde la campaña 2010/11 hasta la campaña 2014/15. (Sistema Integrado de Información Agropecuaria, 2016)...	2
Tabla 2. Principales enfermedades que afectan al cultivo del algodón en Argentina. ...	4
Tabla 3. Pérdidas de rendimiento en el cultivo algodón por efecto de la enfermedad azul.....	7
Tabla 4. Mezcla de reacción de la PCR (<i>Premix</i>)	24
Tabla 5. Resultados de las transmisiones secuenciales con el insecto vector del CLRDV en una variedad susceptible (NC33B) y otra resistente (Guazuncho 2 INTA) de algodón en condiciones controladas en invernáculo.	28
Tabla 6. Resultados de los ensayos de infección, con el método tradicional de inoculación no natural, con el vector virulífero y agroinfecciones con el clon infectivo pBin19/35S-CLRDV.....	34
Tabla 7. Análisis estadístico de los resultados de las infecciones, en las variedades susceptibles inoculadas con el método tradicional del vector virulífero y agroinfecciones, con el clon infectivo pBin19/35S-CLRDV.....	35
Tabla 8. Resultados de los ensayos de infección con el método de agroinfección, con el clon infectivo pBin19/35S-CLRDV, en líneas avanzadas de algodón del Programa Nacional de mejoramiento genético. Se utilizaron como testigos la variedad resistente (Guazuncho 2 INTA) y la variedad susceptible (NC33B).....	36
Tabla 9. Resultados de infección con el método de agroinfección, con el clon infectivo pBin19/35S-CLRDV, en progenies de algodón del Programa Nacional de mejoramiento genético. Se utilizaron como testigos la variedad resistente (Guazuncho 2 INTA) y la variedad susceptible (NC33B).	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Subregiones productoras de algodón en la Argentina. Adaptado de Arturi 1984. 2
- Figura 2.** Síntomas típicos de la enfermedad azul del algodnero en infecciones naturales a campo en variedades altamente susceptibles (epifitia 1993/94). (A) Plantas de algodón con crecimiento rastrero, debido a la infección con el virus, en etapas iniciales del ciclo del cultivo. (B) Planta de algodón con síntomas de acortamiento de entrenudo y plantas adyacentes con crecimiento normal. (C) Hoja con síntomas de amarillamiento en las nervaduras. (D) Campo de algodón con alta incidencia de plantas enfermas con el virus del CLRDV. (Fotos A, B y D Iván Bonacic)..... 6
- Figura 3.** Esquema de la organización del genoma del CLRDV. ORF 0, proteína supresora del silenciamiento; ORF 1 + ORF 2, ARN polimerasa dependiente de ARN; ORF3a, proteína de movimiento sistémica; ORF 3, proteína mayoritaria de cápside; ORF 4, proteína de movimiento de célula a célula; ORF 3 + ORF 5, dominio *readthrough* de la proteína de cápside. gRNA, RNA genómico viral y sgRNA ARN subgenómico viral a partir del cual se traducen los genes de la zona 3' del genoma.... 9
- Figura 4.** Insecto vector del CLRDV, *Aphis gossypii*. (A) Ninfa. (B) Formas adultas del insecto vector áptera y (C) alada. 10
- Figura 5.** Esquema de la ruta circulativa de un *luteovirus* a través de un áfido. El virus ingerido se mueve por el canal de alimentación (FC) del insecto, mediante el intestino anterior (FG) y se acumula en el intestino medio (MG) o posterior (HG). Luego el virus es liberado dentro del hemocele (HC). Los virus también se acumulan en el hemocele y permanecen viables por varias semanas. Los virus aptos para ser transmitidos (hexágonos negros) son transportados dentro de la glándula salival accesoria (AG). Los viriones son inyectados en las plantas a través del conducto salivar (SD) cuando los áfidos se alimentan (Gray & Gildow 2003)..... 12
- Figura 6.** Técnica de inoculación con el insecto vector *A. gossypii* en invernáculo. (A) Cría artificial del vector en jaulas cubiertas por telas antiáfidos, cuya trama no permite el paso de insectos, y luces del tipo "luz día" como complemento de la luz solar. (B) Inoculación con áfidos virulíferos en plantas de algodón en estadio de una hoja emergida no totalmente expandida. 20
- Figura 7.** Técnica de agroinfiltración con el vector pBin19/35S-CLRDV en cotiledones de plantas de algodón. Punciones con una aguja en la parte inferior de los cotiledones para facilitar la infiltración (A). Extracción con jeringa de la suspensión de *A.*

tumefaciens que porta el vector recombinante pBin19/35S-CLRDV (B). Agroinfiltración en los cotiledones de las plantas de algodón con una jeringa de 1 ml sin aguja (C). ...21

Figura 8. Esquema de la organización del genoma del CLRDV. Los rectángulos indican los marcos abiertos de lectura (ORFs) del CLRDV. Se indican los *primers* (flechas grises) utilizados para la amplificación mediante la técnica de PCR del ORF3 del CLRDV. Se indica el fragmento amplificado de 606 pb. 23

Figura 9. Esquema de la construcción pBin19/35S-CLRDV utilizada para la agroinfección de plantas con el clon infectivo. p35S: promotor 35S del virus del mosaico del coliflor. A₍₁₅₎: secuencia final de polyA₍₁₅₎. LB: *left border*, RB: *right border*. 26

Figura 10. Inoculación de plantas de algodón con áfidos virulíferos. (A) Planta NC33B con síntomas de enfermedad azul transmitida a través de áfidos (30 días posteriores a la inoculación). (B) Plantas de la variedad NC33B con síntomas de enfermedad azul donde se realizó la cría de los vectores. (C) Detalle de una colonia de áfidos virulíferos que se trasladaron a plantas de algodón sanas de la variedad NC33B o Guazuncho2 INTA. (D) Jaulas cubiertas con telas antiáfidos donde se realizaron las inoculaciones. 27

Figura 11. Análisis por RT-PCR del aislamiento del CLRDV presente en los áfidos virulíferos. Se amplificó la región correspondiente al ORF3 (606 pb). Calles 2 y 3 pool de áfidos virulíferos. Calle 4: pool de áfidos no virulíferos. Calle 5: control positivo, clon infectivo pBin19/35S-CLRDV. Calle 6: Control negativo: reactivos de la PCR sin ADN.. 29

Figura 12. Comparación de la secuencia del ORF 3 del CLRDV-ARG con el aislamiento del CLRDV obtenido de áfidos de campo en 2011 (Claf) utilizando el programa Blast. (A) Comparación de la secuencia de nucleótidos (identidad del 98% (593/606)). (B) Comparación de la secuencia de aminoácidos (identidad del 98% (197/201) y similitud del 99% (200/201)). 30

Figura 13. Agroinfección de plantas de algodón NC33B con el clon infectivo pBin19/35S-CLRDV. (A) Síntomas observados a los 30 días posteriores a la agroinfección. (B) Planta testigo (izquierda) y planta agroinfectada a los 80 días postinfección. (C) Detalle de planta agroinfiltrada con síntomas típicos de la enfermedad azul a los 80 días postinfección 31

Figura 14. Análisis por RT-PCR de las hojas superiores (no inoculadas) a los 45 días postagroinfección. Amplificación del ORF3 (606 pb) en 5 plantas con síntomas de infección (pl 1-5) y una planta agroinfiltrada con el vector pBin19. Control positivo: construcción pBin19/35S-CLRDV. Control negativo: reactivos de la PCR sin ADNc. Marcador de peso molecular 1Kb. 32

Figura 15. Análisis por RT-PCR de plantas de algodón agroinfectadas con el clon infectivo del CLRDV. (A) Se analizaron las hojas superiores (no inoculadas) a los 45 días postinfección de plantas del cultivar susceptible NC33B con síntomas de CLRDV (plantas 1-4) y sin síntomas (plantas 5-8) y (B) plantas del cultivar resistente Guazuncho2 INTA sin síntomas de enfermedad (plantas 1-8). Control positivo (c+): planta naturalmente infectada con el CLRDV. Control negativo: reactivos de la PCR sin ADN. En A y B se amplificó la región correspondiente al ORF3 del CLRDV (606 pb) (gel superior) y una región del mensajero de Ubi (500 pb) (gel inferior). Marcador de peso molecular 1Kb. 33

Figura 16. Agroinfección de plantas de algodón de líneas mejoradas con el clon infectivo pBin19/35S-CLRDV. (A) Síntomas observados a los 30 días posteriores a la agroinfección. (B) Plantas a los 80 días posteriores a la agroinfección, con síntomas del CLRDV y (C) sin síntomas. 38

RESUMEN

La enfermedad de origen viral más importante en el cultivo de algodón en Sudamérica es la enfermedad azul, y es producida por el *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV). El CLRDV es transmitido por el pulgón del algodón *Aphis gossypii*, no siendo posible su transmisión mecánica. En los programas de mejoramiento de algodón la evaluación de la resistencia a CLRDV en las líneas mejoradas se realiza mediante la inoculación con áfidos virulíferos. Esta metodología es compleja y limita la cantidad de germoplasma a evaluar. Nuestro grupo desarrolló un sistema alternativo de infección mediante la agroinoculación de un clon infectivo del CLRDV en plantas de algodón. El objetivo del trabajo fue comparar el sistema de agroinfección con el sistema de infección con áfidos virulíferos en variedades susceptibles (S) (NC33B y Stoneville474) y resistentes (R) (Guazuncho2 INTA y NuOpal) al CLRDV. A partir de los 30-40 días post-inoculación se registró la presencia/ausencia de síntomas típicos del CLRDV y la infección se confirmó en las hojas sistémicas a los 60 días post-inoculación por RT-PCR. Las plantas de las variedades R no presentaron síntomas de la enfermedad y no se detectó ARN viral con ninguno de los dos métodos de infección utilizados. El porcentaje de infección para las variedades susceptibles fue del 46-60% en las plantas agroinfiltradas con el clon infectivo y del 19-54% en las infectadas con el insecto vector. Los resultados mostraron que no hay diferencias en la respuesta de las variedades estudiadas frente a la infección con CLRDV utilizando ambos sistemas. En las variedades susceptibles se observó un mayor porcentaje de infección cuando se utilizó el clon infectivo debido a una mayor eficiencia del método. Los resultados demuestran que el clon infectivo del CLRDV puede utilizarse como sistema de infección de rutina en los programas de mejoramiento de algodón, siendo un método más sencillo que el sistema tradicional.

Palabras clave: enfermedad azul del algodonoero, *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV), clon infectivo, *Aphis gossypii*, resistencia.

ABSTRACT

Cotton blue disease is the most important viral disease of cotton in South America. *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV) is the causal agent, it is transmitted by the *Aphis gossypii* and any attempt to perform mechanical inoculations of the virus into its host has failed. Breeding of cotton resistant varieties against CLRDV are evaluated by the inoculation with viruliferous aphids. The methodology is complex and limits the amount of germplasm that can be evaluated. Our group developed an alternative infection method by using an agrobacterium-mediated inoculation system for the cDNA infectious clone of CLRDV. The objective of this work was to compare the CLRDV-agroinfection method with the viruliferous aphid inoculation in CLRDV-susceptible (NC33B and Stoneville474) and CLRDV-resistant (Guazuncho2 INTA and NuOpal) *Gossypium hirsutum* plants. The development of typical symptoms was scored 30-40 days post-inoculation and the infection was confirmed by the detection of viral RNA in the systemic leaves by RT-PCR 60 days post-inoculation. In resistant cultivars no symptoms were observed and no viral RNA was detected with either infection methods used. In susceptible cultivars, 46-60% of the agroinoculated plants became infected and 19-54% in plants inoculated with the insect vector. The results showed no difference in the response of the varieties studied against infection with CLRDV using both systems. A higher percentage of infection was observed in susceptible varieties when the infectious clone was used due to increased efficiency of the method. These results highlight the potential use of CLRDV-agroinfection instead of aphid transmission, which is the current method for CLRDV inoculation in cotton breeding program

Key word: cotton blue disease, *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV), infectious clone, *Aphis gossypii*, resistance

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ARN: Ácido ribonucleico

°C: grado Celsius

CP: cápside viral

DAS-ELISA: "*Double Antibody Sandwich-Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*"

Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas de tipo "sandwich" o doble

dNTPs : desoxiribonucleósidos trifosfato

DO: densidad óptica

EEA: Estación Experimental Agropecuaria

EDTA: ácido Etildiaminotetracético

g: aceleración de la gravedad

hs: horas

kb: kilo base

LB: medio de Luria-Delbrück

MES: *2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid*

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

mg: miligramos

min: minutos

ml: mililitros

mM: milimolar

ng: nanogramos

nm: nanómetros

ORF: marco abierto de lectura

pb: pares de bases

PCR: "*polymerase chain reaction*", reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR: "*reverse transcription and PCR*", transcripción reversa y PCR

TAE: Tris Acetato EDTA

µg: microgramos

µm: micrómetro

µl: microlitros

UV: luz ultra violeta

vol: volúmenes

V/cm: Volúmen sobre centímetro

Vs: verus

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del cultivo de algodón

El cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum* L) produce la fibra vegetal textil más importante a nivel mundial por producción y por volumen de comercialización. Por otra parte, la semilla puede emplearse en la elaboración de aceites comestibles e industriales y el residuo de extracción puede utilizarse en la alimentación de animales por su alto contenido de proteínas (36 a 40%) (Mondino, 2006).

La producción mundial actual es de 22,19 millones de toneladas de algodón, y se cultiva en 31,2 millones de hectáreas en todo el mundo. Estados Unidos, China e India son los principales productores de algodón del mundo y representan casi el 60% de la producción global. Se cultiva en más de 100 países y constituye el 40% del mercado mundial de fibra (Comité Consultivo Internacional del Algodón, 2016).

El algodón es un cultivo regional clave en el Norte Argentino. Se cultiva en una amplia zona agroecológica entre los 25° y 31° de latitud sur y comprende las provincias de Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa; Salta, Santa Fe y Santiago del Estero (Mondino, 2006) (Figura 1). Chaco es la principal provincia algodonera, con una participación del 48,2% de la superficie total sembrada en el país (Tabla 1, Sistema Integrado de Información Agropecuaria, 2016). Dentro de la zona algodonera se presenta una gran diversidad ambiental, con regiones climáticas que van desde la húmeda en el extremo noreste (más de 1.000 mm anuales) hasta la semiárida del noroeste (menos de 500 mm anuales). La producción en secano corresponde al 90% de la superficie sembrada y en el 10% restante se recurre al uso de riego en forma complementaria (Mondino, 2006). Desde el punto de vista térmico, por ser una planta sensible al frío, tiene un requerimiento de período libre de heladas no menor a 180 días. La planta de algodón puede crecer en distintos tipos de suelos pero requiere que sean profundos para lograr un buen desarrollo radicular.

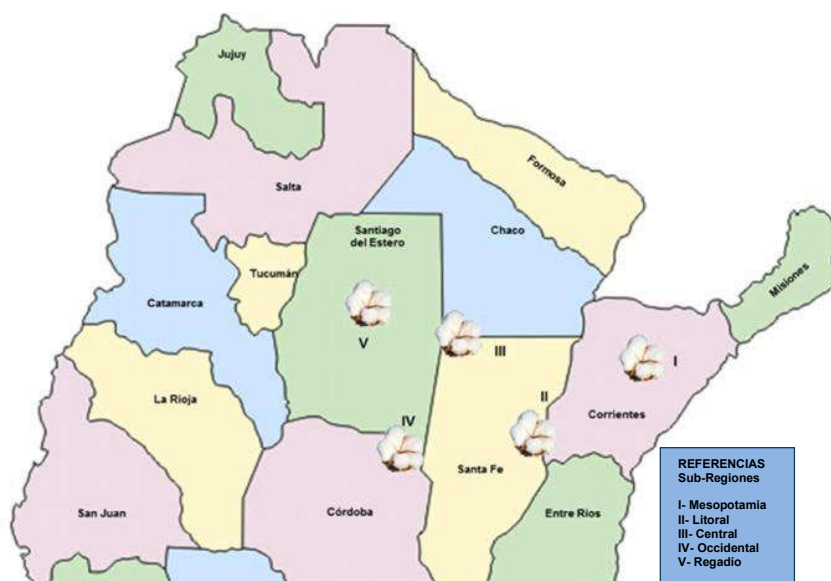


Figura 1. Subregiones productoras de algodón en la Argentina. Adaptado de Arturi 1984.

Tabla 1. Superficie sembrada con algodón por provincia desde la campaña 2010/11 hasta la campaña 2014/15. (Sistema Integrado de Información Agropecuaria, 2016)

Provincia	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15
	has	has	has	has	has
Catamarca	500	60	-	-	-
Córdoba	100	100	70	91	350
Corrientes	1.290	900	455	480	530
Chaco	403.600	260.470	147.200	297.600	252.300
Entre Ríos	250	780	850	1.050	1.100
Formosa	20.000	26.500	19.000	12.500	18.000
Salta	9.280	10.336	3.000	9.000	9.800
San Luis	700	3.000	2.800	2.800	2.800
Santa Fe	88.300	143.500	112.000	113.100	108.300
Sgo. del Estero	116.745	176.500	125.275	115.625	130.500
Total país	640.765	622.146	410.650	552.246	523.680

El algodón es una especie dicotiledónea de la familia de las *Malváceas* (Arturi, 1984). El género *Gossypium* al cual pertenece el algodón consta de 45 especies (Fryxell, 1992). Los diversos germoplasmas del género pueden agruparse según el número de cromosomas en diploides y tetraploides. Las especies tetraploides

cultivadas representan los algodones más importantes desde el punto de vista de la producción de fibra ya que ocupan el 96% de la superficie destinada al cultivo en el mundo. La especie *G. hirsutum*, también conocida como algodón “upland” o de fibra corta, tiene su centro de origen en América Central y es responsable del 90% de la producción debido a su amplia distribución en todos los países productores del mundo (Mondino, 2006).

1.2 Principales enfermedades que afectan al cultivo de algodón en la Argentina

Las enfermedades forman parte del conjunto de factores responsables de importantes pérdidas en el rendimiento de los cultivos. La planta de algodón posee características de prolongada vegetación y fructificación, por lo tanto el cultivo está expuesto y es afectado por enfermedades, malezas y plagas en distintos momentos de su ciclo, siendo necesaria la generación de estrategias de manejo integrado de las mismas durante las diferentes etapas del cultivo. Las condiciones ambientales de las regiones productoras, que incluyen precipitaciones que varían entre más de 1.000 mm a menos de 500 mm anuales y temperaturas medias de 21 a 23 °C, favorecen el desarrollo y prevalencia de diversas enfermedades. Las pérdidas estimadas por enfermedades son de un 12%, por malezas de 15% y por plagas del 25% (Brown, 1992).

Hasta el momento fueron descritas al menos 20 virosis que afectan el cultivo de algodón. Su ocurrencia esta reportada en zonas tropicales como África, Caribe, América del Sur, Asia, América Central y regiones subtropicales como México y Estados Unidos (Brown, 1992). En Brasil, se confirmó la presencia de 5 de ellas: el mosaico común causado por el *Abutilon mosaic virus* (AbMV), el mosaico tardío causado por *Tobacco streak virus* (TSV), el mosaico de las nervaduras y el mosaico de las nervaduras F. Riberão Bonito, siendo ambos asociados al *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV) y el enrojecimiento causado por *Cotton anthocyanosis virus* (Takimoto, 2003). En Argentina, existen numerosas enfermedades que afectan al cultivo de algodón, sin embargo sólo algunas resultan de importancia económica por su prevalencia y daños ocasionados (Bonacic Kresic, 2006). En la Tabla 2 se detallan las principales enfermedades que afectan al cultivo de algodón en Argentina y los microorganismos causales.

Tabla 2. Principales enfermedades que afectan al cultivo del algodón en Argentina.

Agente causal	Nombre común de la enfermedad	
Hongos	<i>Rhizoctonia solani</i>	Damping-off
	<i>Phythium ultimum</i>	Damping-off
	<i>Fusarium oxysporum f. sp. p. vasinfectum</i>	Marchitamiento
	<i>Alternaria macrospora</i>	Mancha foliar
	<i>Ramularia areola</i>	Ramulariosis o Falso mildiu
	<i>Colletotrichum gossypii var. cephalosporioides</i>	Ramulosis o superbrotamiento
Bacterias	<i>Xanthomonas citri pv malvacearum</i>	Mancha angular
Virus	<i>Cotton leafroll dwarf virus</i> (CLRDV)	Enfermedad azul típica
	<i>Cotton leafroll bushy virus</i> (CLRBV)	Enfermedad azul atípica
	<i>Abutilon mosaic virus</i> (AbMV)	Mosaico común

*nuevo virus recientemente secuenciado (Agrofoglio, com. pers.)

El uso de variedades resistentes a las enfermedades es la forma de control más económica, accesible, segura y de mayor eficiencia en cultivos en los cuales se dispone de estos materiales.

1.3 Importancia de la enfermedad azul del algodón

La enfermedad de origen viral más importante en el cultivo de algodón en Sudamérica es la enfermedad azul (Fang, 2010), causando importantes pérdidas en el cultivo, si no se implementan medidas adecuadas de control, consistentes en la siembra de cultivares tolerantes/resistentes a la enfermedad y en el control del insecto vector, mediante la aplicación de insecticidas.

La enfermedad azul del algodón fue reportada por primera vez sobre cultivos de algodón en la República Centroafricana en el año 1949 y a partir de ese momento se reportó en varias regiones de África, Asia y América (Cauquil & Follin, 1983). En Brasil, la enfermedad azul fue denominada “mosaico de las nervaduras” y descrita por primera vez en 1962 (Miranda, 2008).

En la década del 80' en Brasil se registró el ingreso de variedades de algodón extranjeras, especialmente de Estados Unidos y Australia, que reemplazaron el material genético, a pesar de ser altamente susceptibles a la enfermedad azul del algodón. En las campañas 1994/1995 ocurrió una epifita en el estado de San Pablo y en la campaña 1997/1998 en Goias, causando importantes pérdidas de producción, especialmente en las variedades Deltapine Acala 90 y CNPA ITA 90 (Miranda, 2008).

En Argentina, se reportó por primera vez en la provincia de Misiones en 1983, se denominó inicialmente como “mal de Misiones” y afectó a variedades de algodón producidas por INTA (Campagnac, 1986). Las variedades de INTA afectadas fueron La Banda 56 INTA (Deltapine x Stoneville) y SP Toba II INTA (Fox x SP 85), las cuales fueron retiradas del mercado. En la misma campaña en ensayos comparativos regionales de variedades, de la Estación Experimental Agropecuaria de Misiones, los nuevos cultivares de INTA: Chaco 510 (G 181-5-H.748 x SP 5425), Guazuncho (Chaco 510 x Reba B 50), Pora (Chaco 510 INTA x Reba P 279), Quebracho (Chaco 510 x Reba P 279), Mataco (SP 3313 x BTK 12) x SP Toba II y Reba P 279 (introducida desde Paraguay) no fueron afectados por la enfermedad azul.

En la campaña agrícola 1993/94 se presentó de forma generalizada, afectando las principales zonas aldoneras de la Argentina (Bonacic Kresic, 1997). En ensayos comparativos de cultivares (nacionales y extranjeros) y de líneas en desarrollo se detectaron plantas con síntomas de la enfermedad azul en variedades de origen americano y australiano, no se detectaron en variedades producidas por INTA. (Bonacic Kresic, 2000). No existen antecedentes de la interacción de la enfermedad azul del aldonero con factores ambientales o estreses abióticos. No obstante, la campaña aldonera 1993/94 se caracterizó por una prolongada sequía durante el mes de enero y altas temperaturas, como así también por ataques tempranos de áfidos y dificultades para el control de la plaga, debido a la baja eficiencia de los insecticidas sistémicos en plantas afectadas por el estrés hídrico. (Bonacic Kresic, com. pers.) Por lo tanto, todas estas condiciones fueron predisponentes para la expresión de la enfermedad en las principales áreas aldoneras.

Los síntomas de la enfermedad azul del algodón son enrollamiento de hojas hacia abajo, textura coriácea, coloración verde oscura con tonalidades azuladas en las hojas, amarillamiento en las nervaduras y enanismo debido al acortamiento de los entrenudos (Figura 2) (Cauquil & Vaissayre, 1971; Cauquil, 1977). Los síntomas son más severos cuando las plantas son infectadas en estadios tempranos de crecimiento (Cauquil & Vaissayre, 1971). Se demostró que esta enfermedad es producida por un virus, *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV) perteneciente a la familia *Luteoviridae* (Correa y col., 2005; Distéfano y col., 2010). El virus es transmitido únicamente por el pulgón del aldonero *Aphis gossypii* y no es posible su transmisión mecánica en plantas de algodón (Cauquil, 1977). A su vez, no existe evidencia de transmisión por semillas de esta virosis (Cauquil & Vaissayre, 1971; Cauquil & Follin, 1983; Bonacic Kresic, 2006). La colonización inicial de los áfidos puede ocurrir en una planta aún muy joven, generando los síntomas más graves de la enfermedad (síntomas típicos precoces). Cuando el ciclo de vida de los áfidos se completa, los adultos alados

provenientes de esa progenie dejan la planta inicial y colonizan las plantas próximas, las cuales se encuentran en un estadio de crecimiento más avanzado y luego de la infección presentan síntomas menos severos (síntomas típicos tardíos). Por lo tanto, existe un patrón decreciente en la severidad de los síntomas típicos, conforme la distancia al foco inicial de la enfermedad aumenta, presentando las plantas una secuencia de escalera (Silva, 2007).

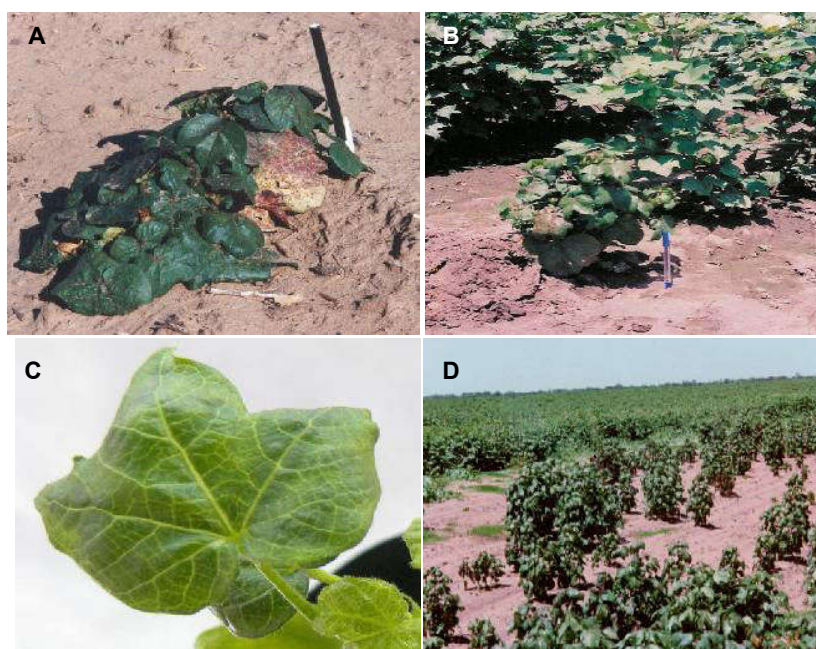


Figura 2. Síntomas típicos de la enfermedad azul del algodón en infecciones naturales a campo en variedades altamente susceptibles (epifitia 1993/94). **(A)** Plantas de algodón con crecimiento rastrero, debido a la infección con el virus en etapas iniciales del ciclo del cultivo. **(B)** Planta de algodón con síntomas de acortamiento de entrenudo y plantas adyacentes con crecimiento normal. **(C)** Hoja con síntomas de amarillamiento en las nervaduras. **(D)** Campo de algodón con alta incidencia de plantas enfermas con el virus del CLRDV. (Fotos A, B y D Iván Bonacic Kresic)

Si el pulgón del algodón no es controlado en las etapas iniciales de crecimiento del cultivo, las pérdidas observadas en la producción de variedades susceptibles son superiores al 80% (Bonacic Kresic, 1997; Silva, 2008). Las plantas infectadas tempranamente por el virus se vuelven completamente estériles y aun cuando las plantas son afectadas durante el período de floración las pérdidas son significativas (Michelotto & Busoli, 2006). En el caso de que la infección ocurra posterior a los 100 días de la emergencia de las plántulas, se observan pérdidas del 15-20% (Brown, 1992). En las plantas infectadas que logran producir cápsulas se

observa disminución en la calidad de las semillas y de la fibra (Campagnac, 1986), la cual no cumple con los estándares exigidos por el mercado. En infecciones severas se registra una disminución del número de órganos florales, pudiendo en algunos casos ser abortados y la planta quedar completamente estéril (Santos, 1999). En estudios de transmisión secuencial, en diferentes momentos del ciclo del cultivo (20, 27, 34, 41, 48 y 55 días posteriores a la emergencia), todos los parámetros evaluados (altura de planta, número de cápsulas por planta, diámetro medio de las cápsulas y la producción de algodón en bruto), son afectados significativamente por el momento de inoculación, siendo la más temprana la que provoca las mayores pérdidas (Michelotto & Busoli, 2006). En la EEA Sáenz Peña-INTA se realizaron estudios experimentales con inoculaciones a campo y se evaluaron las pérdidas de producción de algodón en bruto (Tabla 3). Las mayores pérdidas por efecto de la enfermedad se pueden observar para las inoculaciones tempranas (20-30 días desde la siembra), en tanto que los rendimientos para el testigo sano fueron superiores al resto. Los porcentajes de pérdidas de producción decrecieron significativamente con el aumento de la altura de plantas y el mayor número de nudos, observados en aquellas inoculaciones más tardías y en las plantas sanas (Bonacic Kresic, inédito).

Tabla 3. Pérdidas de rendimiento en el cultivo algodón por efecto de la enfermedad azul.

Momento de inoculación (días desde la siembra)	Producción en Bruto (Kg/ha)	Pérdidas (%)
T1 20-30	214,0	90,74
T2 50-60	1106,2	52,13
T3 80-90	1780,7*	22,94
T4 Sin inoculación	2310,7*	0
Coefficiente de variación	8,98	--
p valor	<0,0001	--

*Diferencia significativa ($p \leq 0,05$)

1.4 Identificación del agente causal de la enfermedad azul: *Cotton leafroll dwarf virus* (CLR DV)

Desde la descripción por primera vez en el año 1949 hasta hace pocos años se desconocía cuál era el agente etiológico causal de la enfermedad azul. En el año 1994 mediante ensayos serológicos de DAS-ELISA, con antisueros contra *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) variedad RPV y PAV, y *Beet western yellow virus* (BWYV), sobre plantas infectadas de la zona central de la provincia de Chaco, se determinó la existencia de una relación serológica entre el virus causal de la enfermedad azul del

algodón y estos tres virus bien caracterizados de la familia *Luteoviridae* (Lenardón, com. pers.). Todos los miembros de la familia *Luteoviridae* poseen un genoma pequeño, de ARN de simple cadena (ARNsc) positiva de entre 5 a 6 kb. Los viriones son icosaédricos, de aproximadamente 25 nm de diámetro, limitados al floema de sus plantas hospedantes y transmitidos en forma circulativa y no propagativa por áfidos (Gildow, 1999; Gray & Gildow, 2003).

Los virus de la familia *Luteoviridae* se agrupan en tres géneros, en base a su organización genómica, sus estrategias de replicación y sus mecanismos de expresión: *Luteovirus*, *Polerovirus* y *Enamovirus* (D'Arcy y col., 2000).

Correa y col. (2005) publicaron la secuencia de un segmento de 1400 pb del genoma del virus asociado a la enfermedad azul del algodón de Brasil. Mediante el análisis filogenético de la secuencia de la cápside y una secuencia parcial de la ARN polimerasa (RdRp) viral determinaron que el virus pertenecía al género *Polerovirus*, familia *Luteoviridae*, y propusieron denominarlo *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV). En el año 2010, Distéfano y col. (2010) obtuvieron por primera vez la secuencia completa del genoma del virus asociado a la enfermedad azul del algodón en Argentina (CLRDV-ARG, aislamiento de Chaco) confirmando que el virus CLRDV debe clasificarse dentro del género *Polerovirus* como una nueva especie. El análisis filogenético realizado a partir de la secuencia mostró que el aislamiento argentino del CLRDV y el aislamiento brasileño están muy relacionados entre sí, indicando que serían variantes geográficas de la misma especie viral (Distéfano y col., 2010).

El CLRDV-ARG posee un genoma de ARN de simple cadena positiva de 5.866 kb. Por ensayos de complementariedad de secuencias (hibridación mediante *Northern blot*), se detectó además del ARN genómico viral (ARNg), un ARN subgenómico (ARNsg) (Distéfano y col., 2010).

El genoma de los virus pertenecientes al género *Polerovirus* está formado por siete marcos abiertos de lectura (ORFs). Los ORFs 0, 1 y 2 se traducen a partir del ARN viral dando como producto las proteínas P0, P1 y la proteína P1-P2 a partir de un cambio de marco traduccional. La proteína P0 corresponde en algunos virus del género al supresor de silenciamiento génico, las proteínas P1 y P1-P2 serían componentes de la ARN polimerasa dependiente de ARN. Los ORFs 3, 3a, 4 y 5, se traducen a partir de un ARN subgenómico, dando lugar a las proteínas P3, P3a, P4 y P3-P5. La proteína P3 corresponde a la cápside viral, P3a corresponde a una proteína involucrada en el movimiento sistémico del virus, P4 correspondería a la proteína de movimiento viral de célula a célula y P3-P5 al dominio *readthrough* de la proteína de cápside y está implicada en la transmisión del virus por el insecto vector (Mayo y col., 1996,1999; Van der Wilk y col., 1997; Pfeffer y col., 2002). Los estudios

bioinformáticos (*in silico*) del genoma del CLRDV permitieron identificar en el CLRDV los siete ORFs descritos para los *Potterovirus* (Distéfano y col., 2010) (Figura 3). En estudios posteriores se demostró que la proteína P0 del CLRDV posee actividad supresora de silenciamiento génico postranscripcional (Delfosse y col., 2014). La proteína P3 que corresponde a la cápside viral (CP) es una proteína estructural mayoritaria y en general es una de las más conservadas dentro de la familia *Luteoviridae* y se la utiliza para analizar la filogenia del grupo y para la detección del virus en las plantas infectadas.

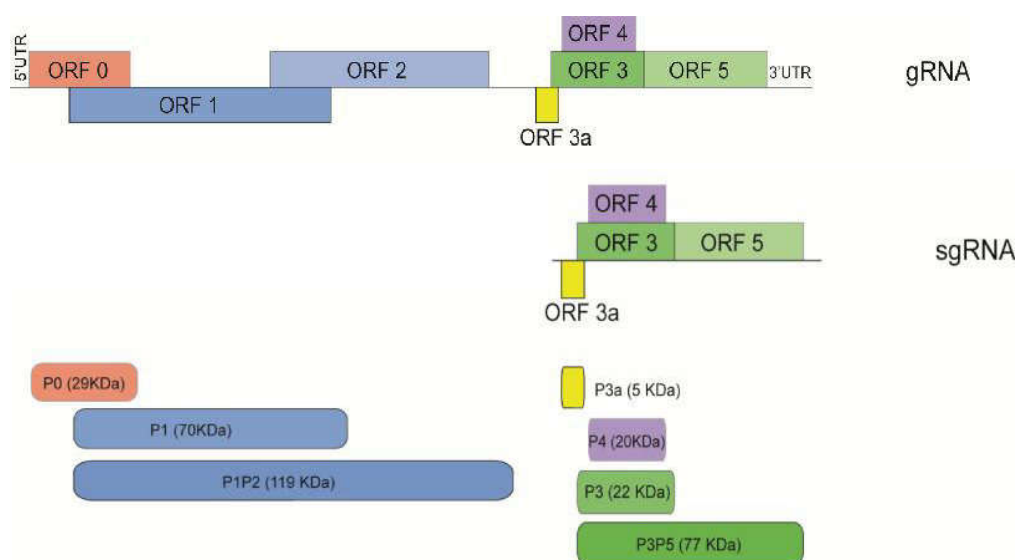


Figura 3. Esquema de la organización del genoma del CLRDV. ORF 0, proteína supresora del silenciamiento; ORF 1 + ORF 2, ARN polimerasa dependiente de ARN; ORF3a, proteína de movimiento sistémica; ORF 3, proteína mayoritaria de cápside; ORF 4, proteína de movimiento de célula a célula; ORF 3 + ORF 5, dominio *readthrough* de la proteína de cápside. gRNA, RNA genómico viral y sgRNA ARN subgenómico viral a partir del cual se traducen los genes de la zona 3' del genoma.

1.5 Modo de transmisión del CLRDV

El pulgón del algodón es la principal plaga del cultivo en todo el mundo (Rummel y col., 1995). *Aphis gossypii* (Orden:Hemíptera, Familia: *Aphididae*) es una especie cosmopolita y polífaga, tiene más de 80 especies de plantas hospederas y puede transmitir más de 50 virus fitopatógenos dentro de los cuales se encuentra el

CLRDV (Ebert & Cartwright, 1997; Miranda, 2008). Una de sus principales características es la estrecha asociación con sus plantas hospederas, su polimorfismo y habilidad para reproducirse tanto sexual como asexualmente.

Los áfidos presentan un ciclo de vida complejo debido a las diversas fases por las que atraviesan y a las formas que adoptan. Las ninfas son de color amarillo claro y se tornan color verdoso o ceniciento con el desarrollo. El adulto mide de 1 a 2 mm de longitud. Tiene sifones cortos y negros, con cauda y antenas cortas, del mismo color que el cuerpo (Saini, 2003). Las formas adultas pueden ser ápteras o aladas, siendo éstas últimas las encargadas de colonizar nuevos sitios. En cuanto a su forma de reproducción, se distinguen dos ciclos: uno cuando existe alternancia de fases de reproducción sexual y partenogenética (holociclo) y el otro cuando sólo se reproducen partenogenéticamente (anholociclo). Se reproducen por partenogénesis sólo en clima tropicales (King & Sanders, 1984).

Los áfidos viven en colonias localizadas en la cara abaxial de las hojas alimentándose del floema. Ninfas y adultos se alimentan succionando jugos vegetales lo que ocasiona un daño directo como el debilitamiento de las plantas y la detención del crecimiento. En ataques severos las plantas pueden secarse. Durante su alimentación *A. gossypii* secreta una sustancia azucarada conocida como melaza o *honey dew* que es depositada sobre la superficie de las hojas de las plantas y genera condiciones favorables para el desarrollo y crecimiento de hongos (ej. fumagina). Esto da lugar a una disminución de la actividad fotosintética de la planta ocasionando un daño indirecto en el cultivo (Karley y col., 2003).

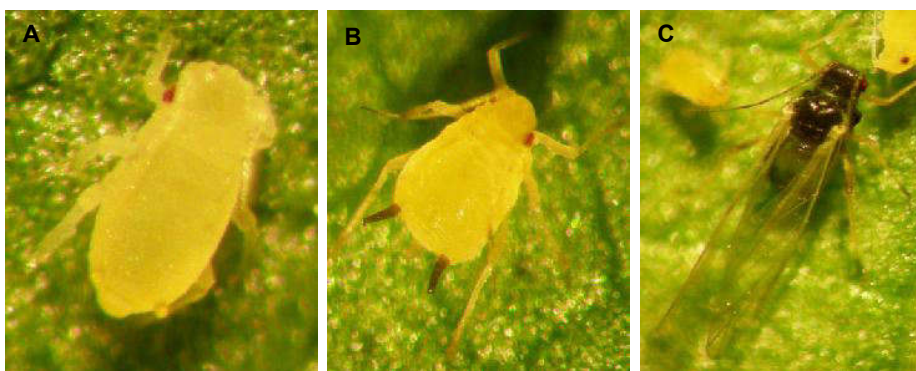


Figura 4. Insecto vector del CLRDV, *Aphis gossypii*. (A) Ninfa. (B) Formas adultas del insecto vector, áptera y (C) alada.

Las infestaciones de áfidos en cultivos de algodón se registran desde la emergencia de plántulas hasta el estadio final del ciclo del cultivo (Santos, 1999). La población de áfidos aumenta rápidamente provocando escasez de alimento y surgimiento de formas aladas que buscan colonizar otras plantas para reiniciar la colonia (Gallo y col., 1988). Los adultos alados migran desde áreas contaminadas con el CLRDV hacia nuevos lotes, donde se produce la inoculación de las plantas (Cauquil, 1977). Las demás etapas del ciclo del insecto transcurren en la planta infectada y desde esas colonias se infectan las plantas adyacentes (Miranda, 2008). El tipo de transmisión es circulativa, no propagativa (Cauquil, 1977). La característica no propagativa se refiere a la relación biológica entre el virus y vector, donde el virus solamente se replica en la planta hospedera. En este tipo de transmisión, el vector puede retener y transmitir el virus por varias semanas a plantas de algodón.

Los virus pertenecientes a la familia *Luteoviridae* presentan una estructura genómica relativamente simple, pero poseen funciones moleculares complejas que son requeridas para infectar, replicarse y distribuirse entre sus plantas hospedantes (Gray & Gildow, 2003). Este tipo de virus se caracteriza por tener un rango limitado de hospedantes e infectar primariamente el floema de las plantas. Solamente son transmitidos por un número limitado de especies de áfidos, mostrando un alto nivel de especificidad en la relación virus-vector. Durante la transmisión, los virus circulan a través del cuerpo del insecto vector, requiriendo un reconocimiento, penetración y transporte celular en el áfido. La ingestión de los *luteovirus* comienza cuando los áfidos inician su alimentación en el tejido floemático de las plantas a través de los estiletes. La ingestión de los virus por parte de los áfidos no es específica, y muchos virus que normalmente no son transmitidos por áfidos, pueden ser ingeridos dentro del intestino, pero luego son eliminados a través del excremento azucarado. La adquisición de los *luteovirus* ocurre cuando el virus es específicamente reconocido y transportado por el tejido epitelial del intestino del áfido y se libera dentro del hemocele. Una vez liberado, en la hemolinfa puede sobrevivir por varias semanas y luego es pasivamente transportado a la glándula salival donde completa la transmisión circulativa. Durante la alimentación y penetración de las células del hospedante también se liberan enzimas y otras sustancias que son secretadas a través del canal salival que se extiende a lo largo de los estiletes. Los virus, que se encuentran suspendidos en el material de secreción salival, se inoculan en las células de un hospedante susceptible durante la alimentación (Gray & Gildow, 2003) (Figura 5). Sólo aquellos virus que son capaces de penetrar en la glándula salival y entrar en los conductos salivares son transmisibles.

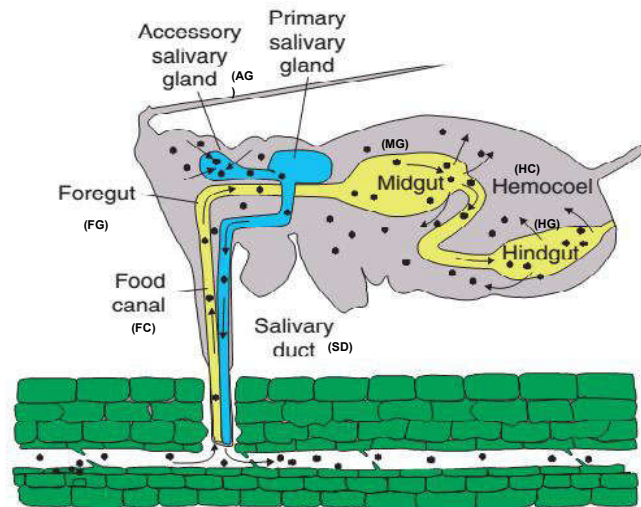


Figura 5. Esquema de la ruta circulativa de un *luteovirus* a través de un áfido. El virus ingerido se mueve por el canal de alimentación (FC) del insecto, mediante el intestino anterior (FG) y se acumula en el intestino medio (MG) o posterior (HG). Luego el virus es liberado dentro del hemocel (HC). Los virus también se acumulan en el hemocel y permanecen viables por varias semanas. Los virus aptos para ser transmitidos (hexágonos negros) son transportados dentro de la glándula salival accesoria (AG). Los viriones son inyectados en las plantas a través del conducto salivar (SD) cuando los áfidos se alimentan (Gray & Gildow, 2003).

1.6 Mejoramiento Genético de algodón para enfermedades

Una de las metodologías utilizadas para el manejo de las enfermedades virales se basa en el control de los insectos vectores con la aplicación de productos insecticidas (Cauquil, 1977; Bonacic Kresic, 1997; Santos, 1999). Los insecticidas resultan tóxicos para el ambiente, aumentan los costos de producción y no protegen al cultivo durante toda la estación de crecimiento (Fang, 2010). Por lo tanto, el estudio y caracterización a nivel molecular del patógeno y la búsqueda de resistencia genética son consideradas de alta prioridad en los Programas de Mejoramiento Genético. En 1923 se crea la Chacra Algodonera Oficial en Sáenz Peña, Chaco, por el Ministerio de Agricultura de la Nación (MAGN), recibiendo el nombre de Estación Experimental Algodonera, iniciando el Programa de Experimentación y Fomento del Cultivo en el año 1927. En esa época las actividades estaban centradas en la captación, selección y ensayos comparativos de variedades introducidas principalmente de los Estados Unidos, para determinar los genotipos de mejor adaptación al medio. Como consecuencia, a fines de la década de 1920 se cultivaba el algodón Tipo Chaco, que era una población derivada de cruzamientos naturales a campo y mezclas de semillas

de desmotadoras de distintas variedades introducidas. Los trabajos de mejoramiento iniciados a partir de 1924 se tradujeron en una mayor uniformidad de plantas, aumento de rendimientos y porcentaje de fibra en el desmote. A partir de 1956 con la creación del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), se intensificaron los esfuerzos en la investigación integral del cultivo y se consolidó el Programa Algodón del INTA que pone énfasis en el mejoramiento genético del algodón, etapa que llega hasta nuestros días.

El Programa de Mejoramiento de algodón se desarrolla en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del INTA Sáenz Peña, en el cual se continúa con el desarrollo de variedades locales que poseen características favorables para su uso en la región y presentan tolerancia y/o resistencia a las patologías locales como hongos, bacterias y virus. Cabe destacar que en la misma estación se originaron la gran mayoría de los cultivares nacionales que se utilizan en nuestro país. La variedad más difundida de origen local obtenida por INTA es Guazuncho 2 INTA y presenta resistencia a enfermedad azul (CLRDV). Por otra parte el INTA también cuenta con un Programa Nacional de Recursos Genéticos con la misión de conservar, caracterizar y evaluar la variabilidad genética de los principales cultivos de valor económico del país. La importancia de un Banco de Germoplasma radica en la disponibilidad de genes que ante situaciones de nuevas enfermedades, nuevas plagas, o nuevas demandas del mercado, se podrían incorporar a las variedades difundidas a través del mejoramiento convencional, cruzamiento interespecíficos o la biotecnología. La variabilidad genética del algodón se conserva en el Banco Activo de la EEA INTA Sáenz Peña y sobrepasa las 600 accesiones.

La especie silvestre *Gossypium arboreum* mostró resistencia contra la enfermedad azul y otras enfermedades virales como la producida por el *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) y bacteriosis (Nateshan y col., 1996). Con el objetivo de introgresar la fuente de resistencia en el algodón cultivado *G. hirsutum* se desarrolló un algodón híbrido derivado del cruzamiento entre tres especies, *G. hirsutum*, *G. arboreum* y *G. raimondii* (HAR) desarrollado por Kammacher en 1970s (Innes, 1983). Los materiales genéticos derivados de cruzamientos del híbrido trispecífico "HAR" manifiestan resistencia a la enfermedad azul del algodón (Bonacic Kresic, 1997). Las variedades producidas por el INTA llevan incorporado germoplasma HAR. En la década del 80 el germoplasma africano fue introducido en los países de Sudamérica, principalmente Brasil y Argentina, para combatir la enfermedad azul y bacteriosis (Royo y col., 2003). Royo y col. (2003) realizaron un relevamiento de 283 variedades de algodón, de diferentes países y origen genético, contra enfermedad azul, bajo condiciones de infección natural a campo. La incidencia de la enfermedad se midió

como porcentaje de plantas con síntomas y se evaluó en dos localidades (Sáenz Peña y Santiago del Estero) y en dos campañas (1993/94 y 2001/02). El 43% del germoplasma evaluado no presentó síntomas en ambas localidades y campañas; 26,5% presentó síntomas en al menos una de ellas y 30,5% desarrolló síntomas en ambas localidades. En el primer grupo el germoplasma provenía predominantemente de países africanos. En el grupo susceptible el material genético era predominantemente de origen americano. Debido a que las evaluaciones se llevaron a cabo bajo condiciones naturales de infestación, materiales que no presentaron síntomas de la enfermedad podría ser que no hayan sido expuestos al virus. Pupim Jr y col. (2008) realizaron el primer reporte sobre la herencia de la resistencia a enfermedad azul y determinaron que la resistencia en dos variedades de algodón, CD401 y Delta Opal, está controlada por un único gen dominante y lo denominaron *Rghv1* (*Resistance to Gossypium hirsutum Virus 1*); sin embargo, no pudieron determinar si es el mismo gen presente en ambas variedades o son genes diferentes. Dos años después, Fang y col. (2010) demostraron que la resistencia a enfermedad azul en la variedad Delta Opal está controlada por un único gen dominante denominado *Cbd* e identificaron dos marcadores SSR ligados al gen mediante *bulked segregant analysis* y el gen fue mapeado en la región telomérica del cromosoma 10.

En los programas de mejoramiento genético es importante contar con ensayos de evaluación eficiente y reproducible para testear los materiales seleccionados como resistentes a una determinada enfermedad. Al respecto, se han desarrollado numerosos métodos de evaluación de dicha resistencia, todos ellos incluyen condiciones básicas que a continuación se detallan: 1) inoculaciones eficientes y precisas de la planta con el patógeno, 2) monitoreo y control de las condiciones ambientales en que se mantienen las plantas inoculadas, 3) evaluación precisa de la incidencia (cantidad de plantas, hojas o frutos afectados), y de la severidad de la enfermedad (área total de tejido afectado) (Agrios, 1997).

Por todo lo expuesto anteriormente es necesario el desarrollo de técnicas de infección artificiales de las plantas de algodón que permitan reproducir los síntomas de enfermedad azul y permitan la evaluación en forma sencilla y eficiente de los materiales mejorados.

1.6.1 Transmisión secuencial con el insecto vector

Luego de las epifitias con CLRDV ocurridas en las campañas agrícolas 1993/1994, 1994/1995 y 1995/1996 la mayoría de los materiales genéticos

susceptibles fueron discontinuados comercialmente, lo que ocasionó una escasa presencia de la enfermedad azul a campo, especialmente en los ensayos de mejoramiento genético implantados para selección de germoplasma resistente (Bonacic Kresic, 2006). Por tal motivo, se debió desarrollar e implementar una técnica no natural de transmisión del CLRDV a campo que permita seleccionar materiales genéticos con resistencia a este virus.

A partir del año 2004/2005, la evaluación de germoplasma de algodón resistente a CLRDV, en el programa de mejoramiento, se realiza mediante la inoculación con áfidos virulíferos, criados y mantenidos en invernáculo bajo condiciones controladas durante todo el año, y luego liberados en el campo sobre las líneas en evaluación (Bonacic Kresic, 2006). Estudios experimentales de transmisión secuencial con áfidos infectivos demostraron que el CLRDV puede transmitirse eficientemente y reproducir los síntomas de la enfermedad (Costa & Carvalho, 1962; Vaissayre, 1970; Bonacic Kresic, 2006). Sin embargo, es una técnica compleja que limita la cantidad de material a evaluar, requiere de mucho tiempo y cuidado, y no garantizan el éxito del ensayo.

La cría de insectos es una metodología empleada para la multiplicación de los mismos que presenta dificultades al momento de establecer una población en invernáculo. Se debe optimizar la cría para reducir los costos y tener un sistema adecuado de multiplicación para mejorar las condiciones de supervivencia del áfido, evitar el ingreso de enemigos naturales y de otras especies de pulgones, reducir la influencia de factores abióticos y potenciar el uso de las plantas por un período más prolongado (Oliveira, 2010). Para realizar las evaluaciones del comportamiento de las líneas del programa de mejoramiento del cultivo de algodón es necesario contar con individuos vectores en cantidad y calidad durante todo el año. Diversos factores afectan la reproducción de los áfidos, tales como la calidad de planta hospedera, temperatura, humedad relativa y la ocurrencia de agentes de control natural.

En los ensayos a campo, para evaluar las líneas de mejoramiento avanzadas frente al CLRDV, se siembran en parcelas de 6 metros de largo y distanciadas a 0,40 metros entre sí, intercaladas con el testigo susceptible (NC33B) donde ya están establecidas las colonias del áfido vector y las plantas presentan síntomas de la enfermedad azul. En la proximidad de la fecha de siembra de los ensayos se incrementa la población de áfidos infectivos en invernáculo y la rustificación de los áfidos previa a su liberación a campo.

1.6.2 Desarrollo de métodos alternativos de infección a través de clones infectivos

La construcción de clones infectivos de ADNc constituye un paso esencial para desarrollar sistemas alternativos de infección no natural por el virus. Estos sistemas permiten independizarse de la transmisión por el insecto vector y constituyen una herramienta fundamental para el estudio de la expresión y función de los genes virales, de la replicación del virus, la interacción planta-virus-vector a nivel molecular y finalmente para la evaluación y selección de plantas tolerantes y/o resistentes al virus en los programas de mejoramiento genético del algodón. Uno de los métodos más eficientes de inoculación de los clones infectivos es la agroinoculación (también llamada agroinfección). La técnica de agroinfección es un proceso a través del cual se introduce el clon infectivo de un virus en el ADN-T (ADN transferente) presente en el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. Luego se realiza la transformación de una cepa específica de *Agrobacterium* con el vector binario y la inoculación en las hojas de la planta hospedante. La bacteria libera el ADN viral infectivo en la célula de la planta hospedante, donde se transfiere el ADN-T a la planta y se inicia la infección. La agroinfección ha sido ampliamente utilizada para la inoculación de clones infectivos de virus de ARN y es el principal método utilizado para iniciar la infección viral con virus de la familia *Luteoviridae* al cual pertenece el CLRDV (Leiser y col., 1992; Prüfer y col., 1995). En general, el ADNc viral se expresa a partir de un promotor constitutivo como puede ser el 35S del *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). Una vez que el ADNc viral es liberado a la célula por la bacteria, la Polimerasa ARN II del huésped utiliza dicho promotor para iniciar la síntesis del ARN infectivo. La agroinfección de ADNc infectivos es un método muy eficiente y barato, dado que evita la transcripción *in vitro*, siendo además un sistema muy conveniente que no requiere equipos de biobalística y a su vez se obtienen infecciones más permisivas en la hoja inoculada. En los últimos años se han desarrollado con éxito clones infectivos para varios *Poleovirus* como *Potato leafroll virus* (PLRV) (Sadowy y col., 1998; Franco-Lara y col., 1999), *Beet western yellows virus* (BWYV) (Leiser y col., 1992), *Beet mild yellow virus* (BMV) (Stevens & Viganó, 2007) y más recientemente *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) (Klein y col., 2014).

2. Hipótesis

El desarrollo de un sistema alternativo de infección, basado en un clon infectivo de ADNc del *Cotton leafroll dwarf virus*, asociado a un método eficiente de inoculación vía agroinfección, permitirá evaluar la resistencia de variedades de algodón a la enfermedad azul, independizándose de la transmisión por el insecto vector.

Objetivo general

Desarrollar un método sencillo, eficiente y robusto para la evaluación de la resistencia al *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV) en variedades de algodón provenientes del Programa Nacional de Mejoramiento.

Objetivos específicos

1. Restablecer el método de infección no natural del CLRDV, a través de la transmisión con áfidos virulíferos en la EEA-Sáenz Peña
2. Establecer el método de agroinfección con un clon infectivo de ADNc del CLRDV en variedades de algodón susceptibles a la enfermedad azul en la EEA-Sáenz Peña.
3. Analizar la progenie viral obtenida en las plantas infectadas con el clon infectivo del CLRDV, en cuanto a su transmisibilidad por el insecto vector de la enfermedad.
4. Comparar los métodos de infección no natural con áfidos virulíferos y de agroinoculación del clon infectivo en variedades de algodón susceptibles y resistentes al CLRDV para la selección de fuentes de resistencia en los programas de mejoramiento.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

Se emplearon cultivares de *G. hirsutum* desarrollados por el INTA y cultivares extranjeros que fueron caracterizados como susceptibles y resistentes a la enfermedad azul (Royo y col., 2003). Se utilizaron como variedades resistentes los cultivares Guazuncho 2 INTA y NuOpal y como variedades susceptibles los cultivares NC33B y Stoneville 474. Además, se utilizaron las líneas 45826, 6635 y 4172 obtenidas en el programa de mejoramiento de algodón de la EEA INTA Sáenz Peña.

Para los ensayos de agroinoculaciones se utilizó un clon infectivo del *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV) (pBin19/35S-CLRDV) (Delfosse y col., 2013) obtenido a partir de un aislamiento del virus del CLRDV del año 2006 (Distéfano y col., 2010).

En los ensayos de transmisión con el insecto vector se utilizaron áfidos de la especie *Aphis gossypii* (transmisora del CLRDV) mantenidos durante todo el año en invernáculos del Laboratorio de Fitopatología de la EEA Sáenz Peña.

3.2 Metodología de cría y multiplicación del insecto vector en invernáculo

La cría del insecto vector *A. gossypii* se realizó según el método descrito por Bonacic Kresic (2006) con modificaciones. Los áfidos infectivos fueron mantenidos durante todo el año en un invernáculo con temperaturas de 25-28°C y luces del tipo "luz día" como complemento de la luz solar (fotoperíodo de 14 hs), en instalaciones pertenecientes al Laboratorio de Fitopatología de la EEA Sáenz Peña.

El aislamiento del virus se obtuvo a partir de *A. gossypii* colectados de plantas de algodón con síntomas de enfermedad azul en la campaña 2010/11.

La cría artificial del vector se realizó en jaulas cubiertas por telas antiáfidos cuya trama no permite el paso de insectos. Las jaulas constaron de tres secciones: 1) destinada a la obtención de plantas sanas cultivadas y libres de áfidos; 2) destinadas al mantenimiento de la fuente de inóculo (vector - plantas infectadas) y 3) destinadas a la liberación del vector virulífero sobre plantas sanas. Los áfidos virulíferos recuperados de campo, sobre plantas de algodón con síntomas de enfermedad azul, se trasladaron a plantas de la variedad NC33B (susceptible al CLRDV) sembradas en invernáculo. El traslado se realizó con un pincel, de forma manual, sobre las plantas

en el estadio de una hoja emergida no totalmente expandida. Luego de 30-40 días posteriores a la inoculación con los áfidos recolectados de campo, se seleccionaron las plantas de algodón que desarrollaron síntomas del CLRDV y se eliminaron aquellas plantas que no tenían síntomas de la enfermedad. Los áfidos obtenidos de las plantas enfermas se recolectaron y se trasladaron sobre plantas del cultivar NC33B, crecidas en el invernáculo libres de áfidos, en el estadio de una hoja emergida no totalmente expandida, para una nueva transmisión de la enfermedad y lograr un aumento de la población de áfidos infectivos en el invernáculo.

La siembra de la variedad NC33B fue escalonada, con intervalos de 10 a 15 días, para el mantenimiento de la población de áfidos y de plantas en las fases fenológicas adecuadas para llevar a cabo los experimentos. Los áfidos no virulíferos o sanos fueron criados en variedades resistentes a CLRDV (Guazuncho 2 INTA o NuOpal). Las plantas se regaron por capilaridad colocando las macetas sobre bandejas metálicas con agua, para evitar mojar las hojas.

3.3 Inoculaciones con áfidos virulíferos en invernáculo

La puesta a punto de las inoculaciones con el insecto vector se realizó según el método descrito por Bonacic Kresic (2006). Se utilizaron plantas de algodón NC33B en el estadio de una hoja emergida no totalmente expandida. Se colocaron 4 áfidos virulíferos (obtenidos en el punto 3.2) por planta, con pinceles de cerdas suaves para evitar posibles daños en los mismos, y se cubrió cada maceta con una jaula con tela antiáfidos para permitir la inoculación (Figura 6). A las 8 hs se pulverizaron las plantas con el insecticida imidacloprid para eliminar los áfidos. Se registró la aparición de síntomas típicos de la infección (enrollamiento de las hojas, enanismo y color verde-azulado) entre los 30 y 40 días postinoculación y se analizó la infección mediante RT-PCR a los 60 días postinoculación (ver punto 3.8). Para los ensayos de inoculaciones de las distintas variedades de algodón se introdujeron las siguientes modificaciones al protocolo: Se colocaron 10 áfidos virulíferos por planta, se dejaron por un período de 14 días y luego se eliminaron con el insecticida. Se realizaron 3 ensayos independientes para analizar la respuesta de las variedades de algodón estudiadas frente a la infección con CLRDV con el método de infección con el insecto vector.

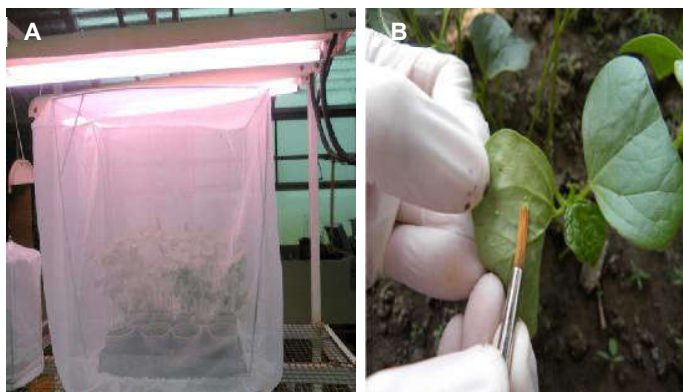


Figura 6. Técnica de inoculación con el insecto vector *A. gossypii* en invernáculo. **(A)** Cría artificial del vector en jaulas cubiertas por telas antiáfidos, cuya trama no permite el paso de insectos, y luces del tipo "luz día" como complemento de la luz solar. **(B)** Inoculación con áfidos virulíferos en plantas de algodón en estadio de una hoja emergida no totalmente expandida.

3.4 Ensayos de agroinfección

Las plantas de los distintos cultivares de algodón utilizadas para los ensayos de agroinfección se crecieron en cámaras de cría (Fotoperíodo 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad y Temperatura 25 ± 2 °C). Se utilizaron 10 macetas con tierra esterilizada por cada cultivar a evaluar y se sembró 1 planta por maceta. Las agroinfecciones se realizaron en los cotiledones de plantas en estadio de una hoja emergida no totalmente expandida (Figura 7).

Una colonia de *A. tumefaciens* cepa LBA4404 que contenía la construcción pBin19/35S-CLRDV se puso a crecer en medio LB suplementado con los antibióticos Kanamicina (100 $\mu\text{g/ml}$) y Rifampicina (100 $\mu\text{g/ml}$) por 48 hs a 28 °C (cultivo A). Luego, 400 μl del cultivo A (crecido durante 48 hs) se colocaron en 7 ml de medio LB suplementado con MES 10 nM pH 5,7, Kanamicina 100 μg , Rifampicina 100 $\mu\text{g/ml}$ y acetosiringona 25 μM y se creció a 28 °C durante 18 hs. El mismo procedimiento se realizó con una colonia de *A. tumefaciens* cepa LBA4404 que contenía el vector vacío pBin19. Los cultivos, crecidos durante 18 hs, se centrifugaron para recuperar las células a 2000 g y temperatura ambiente. Por último, se resuspendieron las células en *buffer* de infiltración (MES 10 nM, pH 5,7, MgCl_2 10 nM y acetosiringona 150 μM) a una OD_{600} final de 0.8 y fueron incubados a temperatura ambiente durante 3 hs. La suspensión de *A. tumefaciens* que porta el vector recombinante se trató con acetosiringona para activar los genes *Vir* y que la región T-DNA (transfer DNA) sea

transferida a la planta. Las infiltraciones se realizaron en los cotiledones de las plantas de algodón, utilizando una jeringa de 1 ml sin aguja (Figura 7). Antes de realizar las agroinfiltraciones, se efectuaron 1 a 2 punciones, con una aguja en la cara abaxial de los cotiledones, para facilitar la infiltración. Se registró la aparición de síntomas típicos de la infección (enrollamiento de las hojas, enanismo y color verde-azulado) a partir de los 30-40 días postinfiltración y se analizó la capacidad de replicación y de infección del clon de ADNc en las hojas sistémicas mediante RT-PCR (ver punto 3.8).



Figura 7. Técnica de agroinfiltración con el vector pBin19/35S-CLRDV en cotiledones de plantas de algodón. **(A)** Punciones con una aguja en la parte inferior de los cotiledones para facilitar la infiltración. **(B)** Extracción con jeringa de la suspensión de *A. tumefaciens* que porta el vector recombinante pBin19/35S-CLRDV. **(C)** Agroinfiltración en los cotiledones de las plantas de algodón con una jeringa de 1 ml sin aguja.

3.5 Ensayos de transmisión con áfidos desde plantas agroinfectadas

En una jaula individual cubierta con tela antiáfidos se colocaron vectores *A. gossypii* no virulíferos (sanos) sobre una planta agroinfectada con pBin19/35S-CLRDV, que presentaba síntomas de la enfermedad, durante 15 días para la adquisición del virus. Luego se trasladaron los áfidos a plantas de algodón de la variedad susceptible NC33B (60 plántulas) crecidas en otra jaula grande con malla antiáfidos. Los insectos vectores permanecieron sobre las plantas durante 20 días. Posteriormente, se eliminaron con el insecticida imidacloprid. La evaluación de los síntomas se realizó a partir de los 30-40 días posteriores a la infestación y la detección del virus mediante la técnica RT-PCR (ver punto 3.8).

3.6 Extracción de ARN de áfidos

Para la extracción de ARN se siguió un protocolo de extracción de ARN utilizando Trizol (ThermoFisher Science). Se utilizó como muestra un pool de aproximadamente 50 áfidos tomados de plantas con síntomas de enfermedad azul. La muestra se homogenizó con nitrógeno líquido usando un embolo y luego se agregó 800 µl de Trizol. Se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio libre de ARNasas y se la incubó por 5 min a 25 °C. Luego, se agregó 160 µl de cloroformo y se agitó el tubo con la mano por 15 seg e incubó a 25 °C durante 2-3 min. Se centrifugó a 10.000 g durante 15 min a 4 °C. La muestra se separó en una fase inferior roja de fenol-cloroformo, una interfase y una fase acuosa superior incolora donde permanece el ARN. Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio. Se agregó 5-10 µg de glicógeno libre de ARNasas. El glicógeno actúa como *carrier*, permanece en la fase acuosa y es coprecipitado con el ARN. Se agregó 400 µl de isopropanol e incubó a 25 °C durante 10 min. La muestra se centrifugó a 10.000 g durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 800 µl de etanol 75%. Luego, se mezcló y centrifugó a 6000 g durante 5 min a 4 °C, se removió el etanol y dejó secar al aire libre. Se resuspendió el ARN en 20 µl de agua libre de ARNasas (agua DEPC: Dietil Pirocarbonato) pipeteando varias veces y se incubó durante 10 min a 55-60 °C. Se guardó el ARN inmediatamente a -80 °C. La concentración del ARN total se estimó utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop Technologies).

3.7 Extracción de ARN de plantas de algodón

La extracción de ARN total se realizó con el *kit* comercial RNAqueous small scale phenol-free RNA isolation (ThermoFisher Science). Para ello, se realizó una minipreparación de ARN a partir de 100 mg de tejido de hojas congeladas a -80 °C, se maceró en mortero con N₂ líquido, se transfirió el tejido macerado a un tubo de 1,5 ml. Para mejorar la extracción de ARN a partir de tejido de algodón se agregó el aditivo AID (ThermoFisher Science) al primer *buffer* de extracción del *kit*, y luego se procedió tal cual las especificaciones del fabricante. Para obtener el ARN de la columna se realizaron dos eluciones con 80 µl de agua libre de ARNasas (agua DEPC: Dietil Pirocarbonato) previamente calentada a 70 °C para favorecer la resuspensión del ARN. El ARN se concentró hasta 50 µl finales mediante *speedvac* (Eppendorff) y se

guardó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. La concentración del ARN total se estimó utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop Technologies).

3.8 Detección del genoma del CLRDV por RT-PCR

La síntesis de la primera cadena de ADNc se realizó utilizando como template $5\text{ }\mu\text{g}$ de ARN total, oligonucleótidos al azar ($10\text{ ng}/\mu\text{l}$) como iniciadores y transcriptasa reversa SuperScript III (ThermoFisher Science) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Para la detección del CLRDV se amplificó una región del genoma viral correspondiente al ORF3 mediante PCR. Se utilizaron los *primers* CP up $5'\text{ATGAATACGGTCGTGGGTAG } 3'$ (posición: 3630-3649) y CP low $5'\text{CTATTTGGATTGTGGAATT } 3'$ (posición: 4236- 4217) que permiten obtener un fragmento de amplificación de 606 pb. En la Figura 8 se indica la posición de los *primers* y el fragmento amplificado.

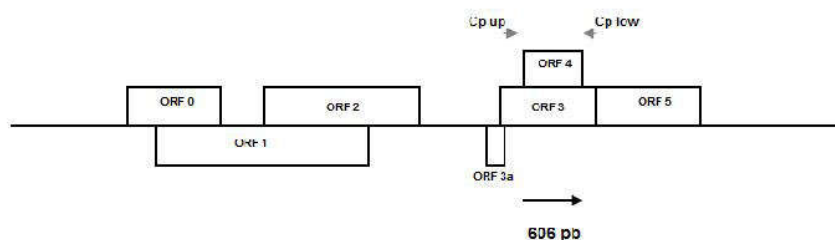


Figura 8. Esquema de la organización del genoma del CLRDV. Los rectángulos indican los marcos abiertos de lectura (ORFs) del CLRDV. Se indican los *primers* (flechas grises) utilizados para la amplificación mediante la técnica de PCR del ORF3 del CLRDV. Se indica el fragmento amplificado de 606 pb.

La mezcla de reacción de la PCR (*Premix*) se realizó según la Tabla 4.

Tabla 4. Mezcla de reacción de la PCR (*Premix*)

Reactivos	Concentración final	Volumen en μ l
		MIX ADNc
H ₂ O MilliQ	----	16,45
<i>Buffer</i> 10X	1X	2,5
MgCl ₂ 50 mM	1,5 mM	0,75
dNTPs 10 mM	0,4 μ M	1
Primer up 50 ng/ μ l		1
Primer low 50 ng/ μ l	2 ng/ μ l	1
<i>Taq</i> Platinum (10 U/ μ l)	0,08 U/ μ l	0,3
ADNc		2
Volumen final		25

A cada tubo se agregó 23 μ l de la *Premix* y 2 μ l del ADNc correspondiente a la muestra a analizar. Luego, se agregó una gota de aceite mineral a cada tubo y se conservaron en hielo hasta su colocación en el termociclador. La reacción de PCR se llevó a cabo con un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 min seguido por 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 52 °C, y 1 min a 72 °C, con una extensión final a 72 °C durante 10 min.

3.9 Visualización de los productos de amplificación

Los productos de amplificación fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de Etidio (concentración final de 0,5 μ g/ml) en *buffer* TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). La corrida electroforética se realizó a voltaje constante (8 V/cm) y los productos de amplificación se visualizaron bajo luz UV.

3.10 Clonado y secuenciación del ORF 3

El fragmento de amplificación de 606 pb correspondientes al ORF3 (cápside viral) obtenida a partir de ADNc de áfidos se cortó del gel y se purificó con el *kit*

comercial Qiaex II (Qiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante. Luego, el fragmento se clonó en el vector pGEMT-easy (ThermoFisher Science) y se transformaron bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 α competentes químicamente (Sambrook y col., 1989) y se seleccionaron los clones positivos, es decir las colonias que crecieron en medio LB conteniendo Ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) y presentaban coloración blanca en presencia de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside, 40 $\mu\text{g/ml}$ en dimetil formamida) e IPTG (Isopropil-1-tio- β -D-galactósido, 1 mM). Para obtener ADN plasmídico de alta calidad para secuenciación, se partió de 1,5 ml de cultivo bacteriano saturado. Las bacterias se cosecharon por centrifugación en microcentrífuga a 3000 g y se obtuvo el ADN plasmídico, utilizando columnas de Qiaprep Spin Plasmid Miniprep Kit (Qiagen), siguiendo las especificaciones del fabricante. El ADN se secuenció en el servicio de secuenciación del Instituto de Biotecnología de INTA-Castelar.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.11 Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos se utilizó el Test Exacto de Fisher. El test exacto de Fisher es una prueba estadística de significación que permite analizar aquellos datos que se dividen en dos categorías (plantas enfermas vs plantas sanas) y se utiliza cuando el número no es igual en cada tratamiento. Los datos se analizaron con el software estadístico InfoStat (Di Rienzo y col., versión 2016). El p valor nivel de significancia $\alpha=0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados previos al inicio de la Tesis

El grupo de trabajo desarrolló un clon infectivo de ADNc del *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRVD) (Delfosse y col., 2013). Este clon infectivo consta del ADNc viral bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) como iniciador de la transcripción y una secuencia final de polyA₍₁₅₎ para estabilizar el ARN mensajero (Figura 9). Las plantas de algodón infectadas con el clon infectivo desarrollarán síntomas típicos de infección por CLRVD y se detecta el ARN viral en las hojas superiores no infiltradas tanto por RT-PCR como por *Northern blot* (Delfosse y col., 2013).

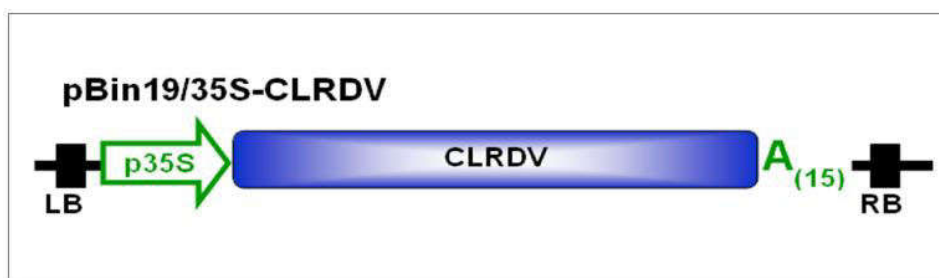


Figura 9. Esquema de la construcción pBin19/35S-CLRVD utilizada para la agroinfección de plantas de algodón con el clon infectivo. p35S: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. A₍₁₅₎: secuencia final de polyA₍₁₅₎. LB: *left border*, RB: *right border*.

4.2 Cría y multiplicación de *Aphis gossypii* virulífero

Con el objetivo de restablecer la metodología de multiplicación del vector *A. gossypii*, tradicionalmente empleada en el Laboratorio de Fitopatología de la EEA INTA Sáenz Peña, durante la campaña 2010/11 se colectó una colonia de *A. gossypii* de una planta de algodón con síntomas de enfermedad azul. La cría de estos áfidos virulíferos se realizó sobre plantas de la variedad NC33B (susceptible al CLRVD) (ver detalle en materiales y métodos, punto 3.2). A los 30 días las plantas comenzaron a desarrollar síntomas de enfermedad azul (Figura 10 A). Se seleccionaron los áfidos de las plantas de algodón que desarrollaron síntomas del CLRVD (Figura 10 B y C) y se trasladaron sobre plantas del cultivar NC33B, al estadio de una hoja emergida no totalmente expandida, crecidas en el invernáculo en jaulas libres de áfidos (Figura 10

D). A través de estas transmisiones secuenciales se logró contar con una población estable de áfidos virulíferos para realizar los experimentos de transmisión del virus por el método tradicional y las evaluaciones del comportamiento de las líneas de mejoramiento genético del cultivo de algodón. En el sistema de cría se consiguió reducir la presencia de enemigos naturales (parasitoides) lo cual permitió mantener poblaciones de áfidos en buenas condiciones sanitarias y más estables en el tiempo.

4.3 Establecimiento del sistema de transmisión no natural del CLRDV con el insecto vector

Para los ensayos de transmisión no natural del CLRDV con el insecto vector, se utilizaron los áfidos virulíferos obtenidos en el punto 4.2 (Figura 11 C) y plantas de algodón de la variedad NC33B susceptible al CLRDV y plantas de la variedad Guazuncho 2 INTA resistente al CLRDV.



Figura 10. Inoculación de plantas de algodón con áfidos virulíferos. **(A)** Planta NC33B con síntomas de enfermedad azul transmitida a través de áfidos (30 días posteriores a la inoculación). **(B)** Plantas de la variedad NC33B con síntomas de enfermedad azul donde se realizó la cría de los vectores. **(C)** Detalle de una colonia de áfidos virulíferos que se trasladaron a plantas de algodón sanas de la variedad NC33B o Guazuncho 2 INTA. **(D)** Jaulas cubiertas con telas antiáfidos donde se realizaron las inoculaciones.

En las plantas de la variedad Guazuncho 2 INTA resistente al CLRDV y en los 2 testigos no inoculados no se observaron plantas con síntomas de infección mientras que en dos plantas de la variedad NC33B susceptible al CLRDV se observaron síntomas de infección (Tabla 5). En ésta primera prueba se logró restablecer el sistema de transmisión del CLRDV con el insecto vector, con un porcentaje de infección en plantas susceptibles del 22%, demostrando que fue posible la transmisión secuencial sobre algodones desarrollados en invernáculo.

Tabla 5. Resultados de las transmisiones secuenciales con el insecto vector del CLRDV en una variedad susceptible (NC33B) y otra resistente (Guazuncho 2 INTA) de algodón en condiciones controladas en invernáculo.

Variedad de algodón	Nº plantas inoculadas	Nº plantas con síntomas	Porcentaje de infección*
NC33B (susceptible)	9	2	22,22% (2/9)
Guazuncho 2INTA (resistente)	9	0	0% (0/9)

* Entre paréntesis N° de plantas infectadas sistémicamente / N° total de plantas

4.4 Análisis del aislamiento de CLRDV presente en áfidos virulíferos

Para analizar si el aislamiento del CLRDV presente en la población de áfidos que se recuperó de campo en la campaña 2010/11 es similar al aislamiento del CLRDV del año 2006, a partir del cual se realizó la secuenciación del virus y la construcción del clon infectivo, se realizó la amplificación mediante RT-PCR del ORF 3 (correspondiente a la proteína P3 ó cápside viral) (Figura 11) y posterior secuenciación.

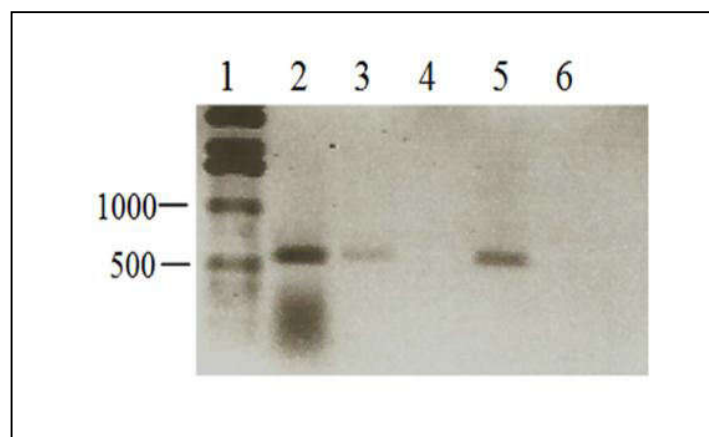


Figura 11. Análisis por RT-PCR del aislamiento del CLRDV presente en los áfidos virulíferos. Se amplificó la región correspondiente al ORF3 (606 pb). Calle 1: Marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen). Calles 2 y 3 pool de áfidos virulíferos. Calle 4: pool de áfidos no virulíferos. Calle 5: control positivo, clon infeccioso pBin19/35S-CLRDV. Calle 6: Control negativo: reactivos de la PCR sin ADN.

Se realizó la comparación de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del ORF3 obtenido a partir del virus CLRDV presente en el *pool* de áfidos con la secuencia del ORF3 del aislamiento CLRDV-ARG del año 2006 (número de acceso del GenBank: GU167940) (Figura 12). A nivel de nucleótidos y de aminoácidos se encontró una identidad del 98% con el CLRDV-ARG. Esta diferencia del 2% en la identidad de secuencia corresponde a la variabilidad esperable en un virus de ARN, demostrando que ambos virus, el que se obtiene a partir del clon infeccioso y el aislamiento obtenido del campo en el 2011, son similares.

A)

```

CLaf 1 ATGAATACGGTCGTGGGTAGAAGAACGATCAATGGAAGAAGACGACCACGTAGACGCAAC 60
      |||
CLRDV 1 ATGAATACGGTCGTGGGTAGAAGAACGATCAATGGAAGAAGACGACCACGTAGACGCAAC 60

CLaf 61 AGGCGTCGGCAAAATAGCCAGTGGTTGTGGTCCAAACCCCTCGGAACACACAACGCAGA 120
      |||
CLRDV 61 AGGCGTCGGCAAAATAGCCAGTGGTTGTGGTCCAAACCCCTCGGAACACACAACGCAGA 120

CLaf 121 AGACGACGAAGACGAGGAGGTCGTAATAGGACAGGAGGACGCATTCCCTGGAGGACCAGGA 180
      |||
CLRDV 121 AGACGACGAAGACGAGGAGGTCGTAATAGGACAGGAGGACGCATTCCCTGGAGGACCAGGA 180

CLaf 181 GCTTCGAGCGAGACATTTGTTTCTCAAAGACAATCTCTCGGGAAGTTCCCTCAGGATCA 240
      |||
CLRDV 181 GCTTCGAGCGAGACATTTGTTTCTCAAAGACAATCTCTCGGGAAGTTCCCTCAGGATCA 240

CLaf 241 ATCAGTTCGGGCGCTCTTTATCAGATTGCCCGGCATTAGCAATGGAATCTCAAGGCC 300
      |||
CLRDV 241 ATCAGTTCGGGCGCTCTTTATCAGATTGCCCGGCATTAGCAATGGAATCTCAAGGCC 300

CLaf 301 TACCATGAATATAAGATCTCAATGGTCTTATTGGAGTTCATCTCCGAGGCCTCTTCAACA 360
      |||
CLRDV 301 TACCATGAATATAAGATCTCAATGGTCTTATTGGAGTTCATCTCCGAGGCCTCTTCAACA 360

CLaf 361 TCCTCCGGTTCATCTCTTACGAAGTGGATCCACACTGTAAATGTCCACCTCTCTCTCC 420
      |||
CLRDV 361 TCCTCCGGTTCATCTCTTACGAAGTGGATCCACACTGTAAATGTCCACCTCTCTCTCC 420

CLaf 421 ACATTAACAAATTCGGAATCACCAAGAATGGGAGGAAGCAATTCGGCGCTCTTATC 480
      |||
CLRDV 421 ACATTAACAAATTCGGAATCACCAAGAATGGGAGGAAGCAATTCGGCGCTCTTATC 480

CLaf 481 AATGGACAGGAATGGCATGACACCTCCGAGGACCAATTCAGAACTTTATACAAAGGCAAT 540
      |||
CLRDV 481 AATGGACAGGAATGGCATGACACCTCCGAGGACCAATTCAGAACTTTATACAAAGGCAAT 540

CLaf 541 GGTTCCTCGTCGATAGCTGGCTCTTTTAGGTCACAATTCGGTGCCAATTCACAAATCCA 600
      |||
CLRDV 541 GGTTCCTCGTCGATAGCTGGCTCTTTTAGGTCACAATTCGGTGCCAATTCACAAATCCA 600

CLaf 601 AAATAG 606
      |||
CLRDV 601 AAATAG 606

```

B)

```

CLaf 1 MNTVVGRRTINGRRRPRRRNRRRQNPVVVVQTPRNTQRRRRRRRGGRRNTGGRIPIGGFG 60
      |||
CLRDV 1 MNTVVGRRTINGRRRPRRRNRRRQNPVVVVQTPRNTQRRRRRRRGGRRNTGGRIPIGGFG 60

CLaf 61 ASSETFVFSKDNLSGSSSGSITFGPSLSDCPAFSNGMLKAYHEYKISMVLEFISEASST 120
      |||
CLRDV 61 ASSETFVFSKDNLSGSSSGSITFGPSLSDCPAFSNGMLKAYHEYKISMVLEFISEASST 120

CLaf 121 SSGSISYEVDPHCKLSTLSSTINKFGITKNGRKQFAASFINGQEWHDTSDDQFRILYKGN 180
      |||
CLRDV 121 SSGSISYEVDPHCKLSTLSSTINKFGITKNGRKQFAASFINGQEWHDTSDDQFRILYKGN 180

CLaf 181 GSSSIAGSFKVTIRCQFHNPK 201
CLRDV 181 GSSSIAGSFKVTIRCQFHNPK 201

```

Figura 12. Comparación de la secuencia del ORF 3 del CLRDV-ARG del 2006 con el aislamiento del CLRDV obtenido de áfidos de campo en 2011 (Claf) utilizando el programa Blast. **(A)** Comparación de la secuencia de nucleótidos (identidad del 98%, 593/606). **(B)** Comparación de la secuencia de aminoácidos (identidad del 98%, 197/201) y similitud del 99% (200/201).

4.5 Establecimiento del método de agroinfección con el clon infeccioso del CLRDV

Para establecer el método de infección con el clon infeccioso del CLRDV en la Estación Experimental del INTA en Sáenz Peña se realizaron ensayos de agroinfección en plantas de algodón de la variedad NC33B (susceptibles). Las plantas

de algodón infiltradas con el clon infectivo desarrollaron enanismo, enrollamiento de las hojas, textura coriácea con coloración verde oscura-azulada y amarillamiento de las nervaduras, síntomas típicos de infección por CLRDV. El porcentaje de infección fue del 60% y los primeros síntomas se detectaron a los 30 días postinoculación (Figura 13).

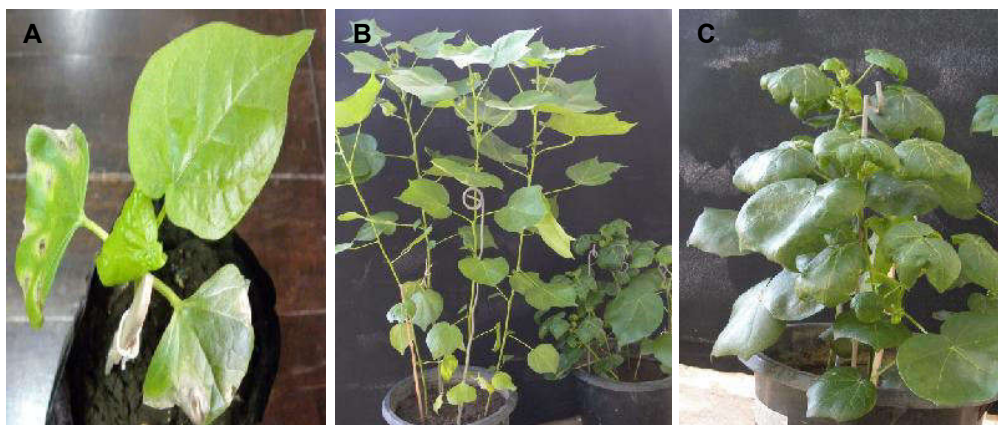


Figura 13. Agroinfección de plantas de algodón NC33B con el clon infectivo pBin19/35S-CLRDV. **(A)** Síntomas observados a los 30 días posteriores a la agroinfección. **(B)** Planta testigo (izquierda) y planta agroinfectada a los 80 días postinfección. **(C)** Detalle de planta agroinfiltrada con síntomas típicos de la enfermedad azul a los 80 días postinfección.

Para confirmar la infección, se realizó la detección del ARN viral en las hojas superiores no infiltradas (hojas sistémicas) de plantas que presentaban síntomas, a los 45 días postinfección, mediante RT-PCR (Figura 14). En todas las plantas analizadas se observó amplificación de la región correspondiente al ORF 3 de 606 pb, confirmando la presencia del CLRDV. De esta forma se estableció en la Estación Experimental Sáenz Peña el sistema de infección de algodón con CLRDV por agroinfección con el clon infectivo.



Figura 14. Análisis por RT-PCR de las hojas superiores (no inoculadas) a los 45 días postagroinfección. Amplificación del ORF3 (606 pb) en 5 plantas con síntomas de infección (pl 1-5) y una planta agroinfiltrada con el vector pBin19. Control positivo: construcción pBin19/35S-CLRVDV. Control negativo: reactivos de la PCR sin ADNc. Marcador de peso molecular 1Kb.

4.6 Ensayos de transmisión del CLRVDV con áfidos a partir de plantas agroinfiltradas

Para analizar si la población viral obtenida, en las plantas infectadas con el clon infectivo, era competente para ser transmitido por el insecto vector de la enfermedad y capaz de desarrollar síntomas en una nueva planta, se realizaron ensayos de transmisión secuencial con áfidos no virulíferos. El porcentaje de infección observado fue del 20% (12/60 plantas) y las plantas infectadas presentaron los síntomas típicos de enfermedad azul. Este porcentaje de infección es consistente con lo obtenido en las transmisiones secuenciales realizadas en invernáculo con áfidos que fueron alimentados sobre plantas infectadas naturalmente con el virus. Por lo tanto, la progenie viral obtenida en las plantas infectadas con el clon infectivo del CLRVDV es competente para ser transmitida por el insecto vector de la enfermedad.

4.7 Estudio del uso potencial del clon infectivo para la evaluación de la resistencia al CLRVDV

Con el objetivo de validar el uso del clon infectivo como método de selección del gen de resistencia a CLRVDV, se evaluaron cultivares de algodón en las cuales se conoce su respuesta ante la infección por el virus (variedades susceptibles y

resistentes al CLRDV) con el método tradicional de infección no natural por el áfido y con el clon infectivo para comparar ambos sistemas de infección. Se utilizaron los cultivares NC33B y Stoneville 474, susceptibles a la infección, y los cultivares Guazuncho 2 INTA y NuOpal, resistentes a la infección. Para confirmar la infección de las plantas se realizó la detección del ORF3 del virus en las hojas sistémicas (Figura 15) por RT-PCR. Los resultados se resumen en la Tabla 6.

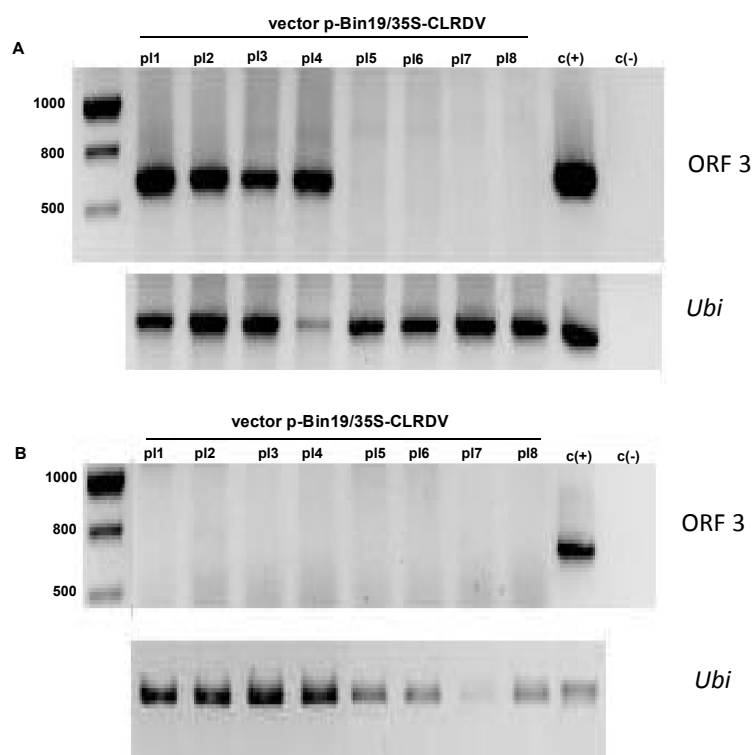


Figura 15. Análisis por RT-PCR de plantas de algodón agroinfectadas con el clon infectivo del CLRDV. **(A)** Se analizaron las hojas superiores (no inoculadas) a los 45 días postinfección de plantas del cultivar susceptible NC33B con síntomas de CLRDV (plantas 1-4) y sin síntomas (plantas 5-8) y **(B)** plantas del cultivar resistente Guazuncho 2 INTA sin síntomas de enfermedad (plantas 1-8). Control positivo (c+): planta naturalmente infectada con el CLRDV. Control negativo: reactivos de la PCR sin ADN. En A y B se amplificó la región correspondiente al ORF3 del CLRDV (606 pb) (gel superior) y una región del mensajero de Ubi (500 pb) (gel inferior). Marcador de peso molecular 1Kb.

Tabla 6. Resultados de los ensayos de infección, con el método tradicional de inoculación no natural, con el vector virulífero y agroinfecciones con el clon infectivo pBin19/35S-CLRDV.

Variedades de algodón	Experimentos	Porcentaje de infección con la técnica del insecto vector*	Porcentaje de infección con el clon infectivo CLRDV*
NuOpal (R)	1	0% (0/20)	0% (0/20)
	2	0% (0/32)	0% (0/20)
Guazuncho2 INTA (R)	1	0% (0/20)	0% (0/20)
	2	0% (0/32)	0% (0/20)
Stoneville 474 (S)	1	19% (6/32)	46% (7/15)
	2	62.5% (20/32)	30% (6/20)
NC33B (S)	1	41% (13/32)	60% (12/20)
	2	53% (17/32)	60% (9/15)

(R) resistente

(S) sensible

* Entre paréntesis N° de plantas infectadas sistémicamente / N° total de plantas

Con el objetivo de analizar si hay diferencias significativas en la respuesta de las variedades susceptibles estudiadas frente a la infección con CLRDV utilizando ambos métodos de inoculación se realizó el Test Exacto de Fisher (Tabla 7). En el caso de la variedad susceptible NC33B no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos de infección en los dos ensayos analizados. Se observó un mayor porcentaje de infección, cuando se utilizó el clon infectivo, debido a que el método es más eficiente. En el caso de la variedad Stoneville 474, en el primer ensayo no se observaron diferencias significativas, mientras que en el segundo ensayo se observó una diferencia significativa, debido a que el porcentaje de infección con la técnica del insecto vector fue muy alta y la del clon infectivo relativamente baja, siendo en este ensayo más eficiente la infección con el sistema de áfidos.

Por otro lado, en todos los ensayos realizados con las dos variedades resistentes, Guazuncho 2 INTA y NuOpal, el porcentaje de infección fue cero, utilizando ambos métodos, es decir ninguna planta analizada fue infectada por el CLRDV, independiente del método de inoculación.

Por lo tanto, las variedades analizadas respondieron de igual forma a la infección por el virus, independientemente del método de inoculación utilizado, demostrando que el clon infectivo del CLRDV es un método válido e equivalente al tradicionalmente utilizado con áfidos virulíferos.

Tabla 7. Análisis estadístico de los resultados de las infecciones, en las variedades susceptibles inoculadas con el método tradicional del vector virulífero y agroinfecciones, con el clon infectivo pBin19/35S-CLRDV.

Variedades de algodón	Experimentos	Infección con insecto vector [†]	Infección con clon infectivo CLRDV [†]	Test exacto de Fisher (P valor)
Stoneville 474 (S)	1	6/32	7/15	0,07
	2	20/32	6/20	0,02*
NC33B (S)	1	13/32	12/20	0,25
	2	17/32	9/15	0,76

*Diferencia significativa

[†]N° de plantas infectadas sistémicamente / N° total de plantas

4.8 Evaluación de la resistencia a CLRDV de líneas mejoradas de algodón utilizando el método de agroinfección

Se implementó por primera vez el uso del clon infectivo del CLRDV como sistema de infección en la evaluación del comportamiento sanitario de líneas avanzadas en el Programa Nacional de mejoramiento genético de algodón de la EEA Sáenz Peña. Se evaluaron tres líneas obtenidas en el programa: líneas 45826, 6635 y 4172. Los resultados se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados de los ensayos de infección con el método de agroinfección, con el clon infectivo pBin19/35S-CLR DV, en líneas avanzadas de algodón del Programa Nacional de mejoramiento genético. Se utilizaron como testigos la variedad resistente (Guazuncho 2 INTA) y la variedad susceptible (NC33B).

Líneas y variedades de algodón	Porcentaje de infección con el infectivo del CLR DV*
Línea 45826	0% (0/40)
Línea 6635	25% (10/40)
Línea 4172	0% (0/40)
NC33B (S)	25% (10/40)
Guazuncho2 INTA (R)	0% (0/12)

*Entre paréntesis N° de plantas infectadas sistémicamente / N° total de plantas

Los resultados de las inoculaciones indican que las líneas 45826 y 4172 se comportaron como resistentes y la línea 6635 como susceptible. La línea 6635 tuvo el mismo porcentaje de infección (25%) que la variedad NC33B que es comúnmente utilizada en experimentos de evaluación de genotipos de algodón como testigo susceptible. Las plantas enfermas presentaron la sintomatología típica descripta para la enfermedad azul.

Se realizó una segunda experiencia para evaluar nuevas líneas avanzadas del programa de mejoramiento seleccionadas por su excelente desempeño agronómico. Los resultados se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados de infección con el método de agroinfección, con el clon infectivo pBin19/35S-CLRDV, en progenies de algodón del Programa Nacional de mejoramiento genético. Se utilizaron como testigos la variedad resistente (Guazuncho 2 INTA) y la variedad susceptible (NC33B).

Línea	Progenies	Síntomas de enfermedad azul	
114	0114-4	-	
	0114-5	-	
	0114-6	-	
	0114-7	-	
	0114-8	-	
	0114-9	-	
	0114-10	-	
	0114-11	-	
	314	0314-1	-
		0314-2	+
		0314-3	-
0314-4		-	
0314-5		+	
0314-6		-	
0314-7		-	
514	0314-8	-	
	0514-1	-	
	0514-2	-	
	0514-3	-	
	0514-4	-	
	0514-5	-	
	0514-6	-	
	0514-7	-	
Guazuncho 2 INTA (R)		0	
NC33B (S)		20%	

El porcentaje de infección para NC33B fue del 20% y las plantas del cultivar resistente no presentaron síntomas del CLRDV. En las progenies de la línea 114 y de la línea 514 no se observaron plantas con síntomas de enfermedad azul. La línea 314 se clasificó como susceptible por presentar plantas con síntomas del CLRDV.



Figura 16. Agroinfección de plantas de algodón de líneas mejoradas con el clon infectivo pBin19/35S-CLRDV. **(A)** Síntomas observados a los 30 días posteriores a la agroinfección. **(B)** Plantas a los 80 días posteriores a la agroinfección, con síntomas del CLRDV y **(C)** sin síntomas.

En la progenie de la línea 314 se detectaron plantas con y sin síntomas del CLRDV. Estos resultados indican que el genotipo 314 podría ser heterocigota (Rr) para el carácter. Sin embargo, en la línea 114 no se observaron plantas susceptibles lo que indica que el genotipo es homocigota dominante (RR). Para determinar el genotipo de cada planta se podría realizar un test de progenie.

Estos resultados constituyen la primera utilización práctica del método del clon infectivo para la evaluación de líneas mejoradas de plantas de algodón contra la enfermedad azul del algodón.

5. DISCUSIÓN

La enfermedad azul del algodón es en la actualidad uno de los principales problemas fitopatológicos del cultivo (Bonacic Kresic, comun. pers.). En el manejo de las enfermedades de origen viral la principal estrategia es el uso de variedades resistentes, por lo tanto la búsqueda de fuentes de resistencia genética en algodón son consideradas de alta prioridad.

Los estudios de transmisión experimental con áfidos virulíferos mostraron que la enfermedad azul del algodón puede transmitirse eficientemente y reproducir los síntomas de la enfermedad (Costa & Carvalho, 1962; Vaissayre, 1970; Bonacic Kresic, 2006). La evaluación de germoplasma de algodón resistente a CLRDV en los programas de mejoramiento se puede realizar mediante la inoculación con áfidos virulíferos mantenidos en invernáculo bajo condiciones controladas. Esta es una metodología compleja que requiere mantener una población numerosa de vectores, con capacidad infectiva durante todo el año, limitando operativamente la cantidad de germoplasma a evaluar. Otra forma de evaluación consiste en la siembra del material genético bajo condiciones de infección natural a campo. Este método presenta varias desventajas, siendo la principal la dependencia de las infestaciones naturales de áfidos, las cuales no presentan una distribución uniforme en el campo. Por otra parte, la incidencia de la infección es variable en cada campaña, dependiendo de la cantidad de virus circulante en el campo. Además, la sincronización entre la presencia de los vectores virulíferos y el estadio de desarrollo de la planta es indispensable para la identificación de genotipos resistentes (Violic y col., 2001). Todas estas variables pueden alterar los resultados, siendo necesario evaluar las líneas provenientes del programa de mejoramiento durante varias campañas, para obtener información sobre la resistencia o susceptibilidad del material a enfermedad azul. Por todo lo expuesto, se requiere de nuevas herramientas para mejorar la metodología de evaluación del germoplasma de algodón para esta enfermedad. En el presente trabajo se muestran avances en el desarrollo de un sistema alternativo de infección por el virus de manera no natural, el cual constituye una herramienta esencial para la evaluación y selección de plantas resistentes al virus en los programas de mejoramiento genético del cultivo de algodón.

5.1 Restablecimiento del sistema de transmisión del CLRDV con el insecto vector

El sistema de cría de insectos vectores debe estar perfectamente ajustado para lograr ahorrar recursos y obtener insectos en cantidad y calidad bajo condiciones de invernáculo durante todo el año. Con el objetivo de mejorar el sistema de cría de *A. gossypii* y la transmisión secuencial del CLRDV en invernáculo, se determinaron las principales condiciones para reducir la mortalidad de áfidos por ataque de enemigos naturales y por la acción de factores abióticos. Diversos factores pueden afectar la reproducción de los áfidos, tales como la calidad de la planta hospedera, temperatura, humedad relativa y presencia de enemigos naturales (Narváez & Notz, 1993; Kocourek y col., 1994). Dixon (1985) y Soglia y col. (2003) determinaron que variaciones en la temperatura de cría producen cambios en la tasa de reproducción de los áfidos y en la longevidad. Por otro lado, en condiciones de invernáculo la presencia de parasitoides es observada constantemente y pueden eliminar por completo la población de áfidos. Durante el desarrollo del trabajo, se ajustaron estas condiciones para lograr un manejo óptimo de la cría del insecto vector, incorporándose la aplicación de insecticida en los alrededores de jaulas e invernáculo para reducir la población de parasitoides.

En condiciones controladas de laboratorio, las poblaciones de áfidos son más estables en el tiempo que en condiciones naturales de campo, debido principalmente a que se controla la temperatura y fotoperíodo, la presencia de enemigos naturales y se mantienen sobre plántulas de algodón creciendo en forma óptima. Oliveira y col. (2010) bajo condiciones controladas de laboratorio (70% de humedad relativa, fotoperíodo de 14 horas y temperatura de 25 °C) obtuvieron en intervalos de 20 días colonias sanas de áfidos para transferir a nuevas plantas. Domínguez (2004) bajo condiciones de laboratorio (Temperatura 23 °C \pm 2°C, H.R. 45% \pm 2%, fotoperíodo 16L:8O) obtuvo suficiente cantidad de individuos de *A. gossypii* para realizar bioensayos en intervalos de 27 días. Los resultados obtenidos en los ensayos de cría y multiplicación realizados en esta tesis coinciden con los reportados por Oliveira y col. (2010), donde logramos mantener poblaciones estables y obtener vectores disponibles para ensayos en intervalos de aproximadamente 30 días.

Cuando se realizaron los experimentos para restablecer el método de infección no natural con el insecto vector del CLRDV en invernáculo, se trasladaron 4 áfidos transmisores por planta los cuales se mantuvieron sobre las mismas durante 8 horas (Bonacic Kresic, 2006). Debido al bajo porcentaje de transmisión del CLRDV observado (20%) en esta tesis (punto 4.3) se decidió incorporar modificaciones en el

protocolo para lograr un mayor porcentaje de transmisión e infección. Waterhouse y col. (1988) reportaron que para una transmisión eficiente de los *Luteovirus* se necesita un período de 24 h para la adquisición e inoculación. En estudios preliminares en invernáculo, Takimoto (2003) observó que el aumento del período de inoculación; como así también el número de vectores virulíferos, favorecen una expresión más rápida y mayor severidad de los síntomas. Por otro lado, Michelotto & Busoli (2006) determinaron que entre 8 y 12 días es el período en el cual un áfido virulífero permanece activo como vector del CLRDV. En base a estos datos, se decidió modificar el ensayo de transmisión y las evaluaciones se realizaron aumentando la cantidad de áfidos virulíferos por planta (10 vectores por planta a evaluar) y aumentando el período de inoculación a 14 días de permanencia sobre las mismas. El porcentaje de infección obtenido en las variedades susceptibles inoculadas fue entre el 20% y el 62%, según el ensayo (Tabla 6). Las modificaciones incorporadas al sistema de transmisión secuencial no natural del CLRDV sobre algodones desarrollados en invernáculo permitieron, en la mayoría de los casos, mejorar el porcentaje de infección.

Otra metodología utilizada para la transmisión del virus es la liberación en ensayos a campo de áfidos virulíferos criados en condiciones de invernáculo. Cauquil & Vaissayre (1971) reportaron porcentajes de transmisiones a campo de 60% a 100% con el pulgón del algodón en África. Bonacic Kresic (datos inéditos) en ensayos realizados a campo en la EEA INTA Sáenz Peña obtuvo un porcentaje de transmisión del 58%. Las diferencias observadas en los porcentajes de infección obtenidos entre los ensayos en invernáculo y a campo podrían deberse a que estos últimos se realizan a través de liberaciones de mayor cantidad de vectores virulíferos, dado que los vectores se liberan empleando porciones de hojas de plantas afectadas que contienen colonias establecidas de vector y son fijadas sobre las hojas superiores del material susceptible. En estas evaluaciones a campo, se liberan al ambiente gran cantidad de áfidos virulíferos que pueden afectar la dinámica de la infección en el área del ensayo, siendo un punto negativo de esta metodología.

En los ensayos de transmisión realizados en esta tesis, los primeros síntomas de infección (epinastia y enrollamiento de hojas) se observaron entre los 20 y 25 días posteriores a la inoculación. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Cauquil & Vaissayre (1971) y Cauquil & Follin (1983) quienes determinaron que los primeros síntomas de la enfermedad se desarrollaban entre los 9 y 28 días posteriores a la inoculación con el CLRDV. Takimoto (2003) en referencia a los primeros síntomas indicó que las variedades susceptibles presentaron epinastia como primer síntoma a

los 9 días posteriores a la inoculación y enrollamiento de hojas a los 7-10 días posteriores a la inoculación.

De esta manera se logró restablecer el sistema de transmisión con el insecto vector del CLRDV en la Estación Experimental de INTA Sáenz Peña y poner a punto las condiciones para lograr una población de vectores estable, durante todo el año, para realizar los ensayos de evaluaciones de las variedades de algodón susceptibles y resistentes.

Durante el desarrollo de la tesis se demostró que el aislamiento del CLRDV presente en la población de áfidos que se recuperó de campo en la campaña 2011 y que actualmente se dispone en la EEA Sáenz Peña para los ensayos de transmisión, es similar al aislamiento del CLRDV del año 2006, a partir del cual se realizó la secuenciación del virus y la construcción del clon infectivo. A nivel de nucleótidos y de aminoácidos la identidad fue del 98% con el CLRDV-ARG, aislamiento del año 2006. Este análisis permitió asegurar que los ensayos de comparación entre ambos métodos de inoculación (áfido virulífero vs clon infectivo) fueron realizados con la misma variante del CLRDV.

Estos resultados adquieren mayor relevancia debido a que a partir de las campañas algodoneras 2009/10/11 en varias regiones de la provincia de Chaco se detectó una virosis similar a enfermedad azul, pero con algunas diferencias en la sintomatología, en cultivares de algodón susceptibles y resistentes a CLRDV, produciendo el primer quiebre de resistencia del germoplasma (Bonacic Kresic com. pers.). Los síntomas se caracterizan por enrollamiento suave de las hojas y deformaciones foliares en la zona apical con aspecto "arrosetado". En todos los casos y en ambas campañas agrícolas, fue detectada la presencia del pulgón del algodón (*A. gossypii*) y en algunos casos la presencia de mosca blanca (*Bemisia tabaci*). Para la identificación de la posible virosis se realizaron ensayos de PCR para intentar amplificar virus pertenecientes a cuatro familias virales: *Luteovirus*, *Geminivirus*, *Llavivirus* y *Potyvirus*. Cuando se utilizaron *primers* diagnósticos para el grupo taxonómico de los *Luteovirus* se logró amplificar una región del genoma viral, se secuenció y se observó identidad de secuencia con el CLRDV. Realizamos la secuenciación completa del genoma del virus y los análisis filogenéticos permitieron definir que este virus es una nueva especie del género *Polerovirus*, cercanamente relacionada al CLRDV. El nombre propuesto para este nuevo virus es *Cotton leafroll bushy virus* (CLRBV). Por otro lado, demostramos con ensayos de transmisión no natural, que este nuevo virus es transmitido por el insecto *A. gossypii*. (Agrofoglio y col., datos inéditos). Por lo tanto, ambos virus se encuentran actualmente circulando

en la zona aldonera de la provincia de Chaco y son transmitidos por el mismo insecto vector.

5.2 Establecimiento del método de agroinfección con el clon infectivo del (CLRVD) en la EEA Sáenz Peña

La producción de clones infectivos de ADNc es un paso esencial para desarrollar sistemas de genética reversa para virus de ARN, permitiendo la caracterización del virus a nivel molecular y biológico, el estudio de la función de los genes virales (a través de mutagénesis sitio dirigida), de la replicación y la interacción planta-virus-vector a nivel molecular. El sistema de inoculación de clones infectivos utilizando *A. tumefaciens* (agroinfección) es un método muy eficiente y económico porque evita la transcripción in vitro del genoma viral y no requiere de equipos de biobalística. La técnica de agroinfección ha sido ampliamente utilizada para la inoculación de clones infectivos de virus de ARN (Grimsley y col., 1986; Grimsley y col., 1987; Turpen y col., 1993; Lamprecht & Jelkmann, 1997; Liu & Lomonosoff, 2002; Chiba y col., 2006) y se trata del principal método utilizado para iniciar la infección viral con virus de la familia *Luteoviridae* (Leiser y col., 1992; Prüfer y col., 1995). En los últimos años, se han desarrollado con éxito clones infectivos para varios *Poleovirus* como *Potato leafroll virus* (Sadowy y col., 1998; Franco-Lara y col., 1999), *Beet western yellows virus* (Leiser y col., 1992), *Beet mild yellow virus* (Stevens & Viganó 2007) y más recientemente por nuestro grupo del CLRVD-ARG (Delfosse y col., 2013)

Una posible aplicación de la agroinfiltración de clones infectivos es su uso potencial en los programas de mejoramiento genético asistido para la evaluación, identificación y selección de genes de resistencia y/o tolerantes al virus en el germoplasma de algodón como lo demuestran nuestros resultados.

Plantas de algodón de la variedad susceptible NC33B fueron agroinfiltradas con *A. tumefaciens* con pBin19/35S-CLRVD. Los primeros síntomas se detectaron luego de los 30 días de realizadas las agroinfiltraciones con el CLRVD y el porcentaje de infección fue del 60%. Estos resultados obtenidos en la Experimental Sáenz Peña coinciden con lo publicado previamente por nuestro grupo, donde se observa que ocurre la replicación viral en el sitio de infección, la movilidad de las partículas entre células contiguas y a su vez su distribución en forma sistémica hacia las hojas superiores. De esta manera el virus logra establecer la infección y se manifiestan los

síntomas típicos de la infección natural (Delfosse y col., 2013). Por otro lado, el porcentaje de infección es similar al obtenido por otros autores. Leiser y col. (1992) utilizaron el sistema de agroinfiltración con un clon infectivo de ADNc del BWYV en plantas susceptibles al virus, donde los síntomas de infección aparecieron a los 10 días posteriores a la agroinfiltración y los porcentajes de infección que obtuvieron variaron entre el 33-100% en los distintos experimentos.

5.3 Ensayos de transmisión con áfidos desde plantas agroinfiltradas

Para completar la caracterización de la actividad biológica del clon infectivo del CLRDV, se realizaron ensayos de transmisión de la progenie viral, desde plantas de algodón infectadas con el clon infectivo del CLRDV que presentaron síntomas de la enfermedad. Áfidos no virulíferos de *A. gossypii* fueron liberados para alimentarse sobre plantas de algodón agroinfiltradas con el clon infectivo del CLRDV (presentando síntomas de enfermedad azul) y luego fueron transferidos a plantas sanas de algodón de la variedad NC33B (S) que desarrollaron síntomas de enfermedad azul. Los experimentos descritos nos permitieron demostrar que el clon infectivo produce viriones que son competentes para ser transmitidos por los áfidos y desarrollar síntomas de la enfermedad en una nueva planta. La transmisión del virus fue del 20% siendo este valor de eficiencia de transmisión consistente con el obtenido previamente (Bonacic Kresic, datos inéditos) y en el punto 4.3 de esta tesis. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Leiser y col. (1992) en un test de transmisibilidad del BWYV (*Beet western yellow virus*) en el cual utilizaron vectores (*Myzus persicae*) no virulíferos los cuales se alimentaron sobre plantas de *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii* y *Physalis floridana* agroinfiltradas con el BWYV y se trasladaron luego a plantas sanas de *Montia perfoliata* que desarrollaron la enfermedad. Prüfer y col. (1995) demostraron que es posible la transmisión de *Cucurbit aphid-borne yellows Virus* (CABYV) desde plantas de melón y pepino agroinfiltradas con el CABYV por los vectores *M. persicae* y *A. gossypii* y desarrollar los síntomas típicos de la enfermedad.

5.4 Estudio del uso potencial del clon infectivo para la evaluación de la resistencia al CLRDV

El CLRDV, al igual que el resto de los *Polerovirus*, infecta y replica en los tubos cribosos, las células acompañantes de floema y ocasionalmente en el parénquima floemático de su planta hospedadora (Domier & D'Arcy, 2008; Takimoto y col., 2009). El CLRDV es transmitido en la naturaleza de manera circulativa, desde plantas infectadas a plantas sanas, a través de la actividad de alimentación de una especie específica de áfidos, *A. gossypii*. La transmisión circulativa de los *Polerovirus*, en particular del CLRDV, se inicia cuando el áfido adquiere el virus de los tubos cribosos al picar una planta enferma. El virus viaja por el estilete y luego de circular por el áfido sin replicar llega a las glándulas salivares donde el virus es expulsado con la saliva en el tejido vascular de una nueva planta hospedadora (D'Arcy, 2005). Por otro lado, la forma de ingreso del virus a la planta hospedante utilizando el clon infectivo es diferente al ingreso a través de la infección con áfidos. Cuando se infiltran los cotiledones de las plantas de algodón con la agrobacteria que porta el clon infectivo (pBin19-35S/CLRDV) la región T-DNA, en la cual está incluida el ADNc viral, se transfiere de la bacteria a las células vegetales. De esta forma se inicia la infección por la transcripción del ADNc viral a partir del promotor 35S. En la agroinfiltración la región T-DNA se puede transferir a todos los tipos celulares (mesófilo, células de la vaina, parénquima vascular, células acompañante de floema y tubos cribosos) y este hecho podría cambiar la respuesta de las variedades de algodón resistentes a la infección con el virus.

Con el objetivo de validar el uso del clon infectivo como método de selección del gen de resistencia a CLRDV, se infectaron cultivares de algodón en los cuales se conoce su respuesta ante la infección por el virus (variedades susceptibles y resistentes al CLRDV) con el método tradicional de infección no natural con el áfido virulífero y con el clon infectivo para comparar la respuesta de los cultivares. Las plantas analizadas de las variedades resistentes (NuOpal y Guazuncho 2 INTA) no presentaron síntomas de la enfermedad y no se detectó ARN viral con ninguno de los dos métodos de infección utilizados. Estos resultados muestran que la diferente forma de entrada del virus a la planta no le permitió al mismo sobrepasar al gen de resistencia. Cuando se analizó la variedad susceptible NC33B el porcentaje de infección con el método tradicional del áfido virulífero fue de 41% y 53%, en dos ensayos independientes, y en la variedad Stoneville 474 de 19% y 62,5%, respectivamente. En el caso de la variedad Stoneville 474, las diferencias observadas

en los porcentajes de infección, obtenidos en los dos experimentos realizados, podría deberse a varios factores que afectan la eficiencia de transmisión. De acuerdo con Sylvester (1980) los factores que afectan la eficiencia de transmisión son la duración de los periodos de adquisición e inoculación del virus por los áfidos, la temperatura, el número de insectos efectivamente virulíferos por planta y la edad de los áfidos. Por otro lado, el porcentaje de infección obtenido en las variedades susceptibles estudiadas es similar al obtenido por diversos autores que trabajaron con la transmisión del virus de la enfermedad azul. En ensayos de evaluación del comportamiento de cultivares de algodón frente al CLRDV Takimoto (2003) utilizó 10 vectores virulíferos por planta por un período de 3 horas, logrando un porcentaje de infección del 50% en las plantas de variedades susceptibles. Michelotto & Busoli (2006) realizaron inoculaciones en distintos momentos del ciclo de la planta (20, 27, 34, 41, 48 y 55 días postemergencia) y utilizaron un adulto áptero de *A. gossypii* por planta durante 48 horas. Los áfidos fueron previamente alimentados en plantas con síntomas del CLRDV. El porcentaje promedio de plantas que presentaron síntomas de enfermedad azul fue de 54,2% y fue inferior al obtenido por los mismos autores cuando utilizaron 1 ninfa (3^o/4^o estadio) durante 96 horas de inoculación y 1 adulto de *A. gossypii* durante 48 horas, el cuál varió entre 77,8% y 95,6% en plantas del cultivar susceptible CNPA ITA 90, respectivamente (Michelotto & Busoli, 2003). El estadio fenológico de las plantas no influye en la eficiencia de transmisión del virus por el vector *A. gossypii* (Michelotto & Busoli 2006), en cambio adultos ápteros de *A. gossypii* son más eficientes que las ninfas en la transmisión del virus (Michelotto & Busoli, 2003). No obstante estos resultados, Cauquil & Vaissayre (1971) confirmaron que todos los estadios de los áfidos virulíferos (alados, ápteros y ninfas en los últimos estadios de desarrollo) son capaces de transmitir el virus.

Bonacic Kresic (datos inéditos), en ensayos realizados a campo en la EEA INTA Sáenz Peña, a través de inoculaciones con áfidos virulíferos, obtuvo un porcentaje de transmisión del 58%. Otro factor importante en el porcentaje de infección obtenido es la susceptibilidad al virus de los cultivares estudiados. Takimoto (2003) determinó que la cantidad de áfidos infectivos necesarios para analizar la resistencia a la enfermedad azul depende de la susceptibilidad del cultivar analizado. Para la variedad IAC 24 la inoculación con 5 áfidos virulíferos no fue suficiente para que ocurra la transmisión del virus e infección de las plantas. En cultivares de mayor susceptibilidad el mismo número de vectores fue suficiente para la transmisión de la enfermedad. Galbieri y col. (2010) trabajaron con un test de reacción de genotipos a la transmisión con el vector natural utilizando distintas concentraciones con áfidos virulíferos por planta (2, 6, 15, 25) y analizaron la incidencia de la enfermedad. Los

resultados de sus experimentos demuestran que la eficiencia de transmisión fue directamente proporcional al número de áfidos por planta. Las concentraciones más elevadas (15 a 25 áfidos/planta) son las recomendadas para realizar test de resistencia de cultivares debido a que con esas concentraciones de vectores fue posible observar diferencias significativas entre las medias de dos genotipos. La variedad NuOpal (R) presentó un comportamiento independiente a la concentración de áfidos utilizada, comportándose siempre como resistente, al contrario de las demás variedades seleccionadas que tuvieron comportamiento diferente según la concentración de áfidos (Galbieri y col., 2010).

En los experimentos de inoculación realizados en esta tesis, con el clon infectivo del CLRDV, el porcentaje de infección en la variedad susceptible NC33B fue del 60%, en dos ensayos independientes y en la variedad susceptible Stoneville 474 fue de 30% y 60%, en dos ensayos independientes. Estos resultados coinciden con los reportados por Delfosse y col. (2013) en plantas de algodón de la variedad susceptible NC33B con valores de infección que van del 60 al 92%, según el ensayo, para infecciones sistémicas positivas con el clon infectivo del CLRDV. Se observó que los porcentajes de infección obtenidos por Delfosse y col. (2013) en varios ensayos son mayores a los obtenidos en el presente trabajo en la variedad NC33B y estas variaciones podrían deberse a pequeñas diferencias en el estadio de las plantas y las condiciones de crecimiento en el invernáculo (por ejemplo, la temperatura) utilizadas.

Nuestros resultados nos permiten concluir que las infecciones obtenidas utilizando el clon infectivo son similares a las obtenidas con el áfido virulífero, en cuanto a la respuesta de los cultivares estudiados y al desarrollo de síntomas de la enfermedad azul del algodnero. A pesar que la diferencia observada en los porcentajes de infección entre ambos métodos fue no significativa, se observó en general un mayor porcentaje de infección con el clon infectivo.

La técnica de infección con el clon infectivo presenta varias ventajas con respecto al método de infección natural a campo o el de transmisión no natural con el áfido virulífero. Al ser un método más eficiente permite utilizar un menor número de plantas por línea y por lo tanto evaluar más líneas por ensayo. La técnica de preparación del inóculo para agroinfiltrar es sencilla, se realiza en laboratorio, requiriendo poco tiempo y espacio. La agroinfiltración de cotiledones es sencilla y rápida. Por el contrario, en el método de infección no natural con áfidos virulíferos el traslado de al menos 10 áfidos por planta con un pincel demanda mayores cuidados y tiempo para evitar dañar a los vectores. En este sentido la técnica del clon infectivo presenta ventajas prácticas frente a la metodología tradicional. Por otro lado, la bacteria *A. tumefaciens* que contiene el clon infectivo se conserva en glicerol a -20 °C

o en colonias sobre una placa de Petri a 4 °C, requiriendo un mínimo mantenimiento. Por otro lado, el mantenimiento de una colonia de vectores infectivos durante todo el año es más compleja, requiere mayor espacio, recursos y es más susceptible a cambios ambientales, tales como la temperatura o a ser infectada por parasitoides, afectando la supervivencia de la colonia y perdiendo la fuente de inóculo viral.

Nuestros resultados permiten proponer al clon infectivo del CLRDV, en lugar de la transmisión con el insecto vector, como método para la selección del gen de resistencia a CLRDV en el programa de mejoramiento de algodón y de esta forma preseleccionar los materiales de interés para luego evaluarlos a campo con infecciones naturales. Por otro lado, el método del clon infectivo permitiría la búsqueda rápida de nuevos genes de resistencia al CLRDV en las accesiones de algodón del banco de germoplasma. Cabe mencionar que utilizando este método de selección de nuevas fuentes de resistencia se puede perder mecanismos de defensa que posean las plantas evaluadas contra los áfidos. Los mecanismos de defensa de las plantas contra insectos que podrían tener un rol en defensa contra CLRDV se conocen como antixenosis y antibiosis. La antixenosis o no preferencia, expresa la capacidad de la planta de no compatibilizar con el parásito, evitando que actúe como hospedante, no dejando que el insecto la utilice para oviposición, alimento o refugio. Puede estar dado por toxinas, por la presencia de repelentes volátiles o de pelos de tipo no glandular. En tanto, la antibiosis incluye todos los efectos adversos ejercidos por una planta en la biología de los insectos, es decir se ejerce principalmente sobre el crecimiento, desarrollo o sobrevivencia del insecto. Un ejemplo de este tipo son los pelos glandulares en las hojas.

5.5 Evaluación de la resistencia a CLRDV de líneas mejoradas de algodón utilizando el método de agroinfección

En Argentina el método utilizado en mejoramiento genético del cultivo de algodón es el de *pedigree* descrito por Allar (1960), Poisson (2002) y Royo y col. (2007). El mismo consiste en combinar características de dos individuos mediante cruzamientos controlados y posterior selección. En etapas iniciales del proceso es conveniente seleccionar por características de alta heredabilidad y aumentar la presión de selección en generaciones posteriores. Los rasgos morfológicos, porcentaje de desmote y comportamiento sanitario, son algunas de las características a elegir como indicadores en las etapas iniciales.

En la caracterización y evaluación agronómica de variedades comerciales de algodón y líneas genéticas avanzadas provenientes del programa de mejoramiento del INTA se siguen ciertos criterios de productividad. El rendimiento de algodón en bruto y el rendimiento de fibra, en kilos por hectárea, y la calidad de la misma, representan uno de los criterios aditivos de mayor relevancia en la elección de las variedades. La calidad de fibra alcanzada por las variedades de algodón en la Argentina ha superado en los últimos años los estándares básicos establecidos por las hilanderías. Es por este motivo, que la calidad representa un criterio de selección a considerar. Otro de los criterios productivos es el rendimiento industrial, el cual representa en nuestro país la característica de mayor incidencia en la elección de la variedad por parte del productor. Además impacta significativamente en los rendimientos (Tcach, com. pers.).

La tolerancia y resistencia genética de los materiales utilizados a las enfermedades presentes en una región, es el mecanismo de mayor eficacia para su control. Por este motivo, es importante evaluar el perfil fitosanitario de cada genotipo. Actualmente el programa de mejoramiento del cultivo de algodón está orientado a la selección de líneas con resistencia a las principales enfermedades de incidencia económica en Argentina (bacteriosis, fusariosis y enfermedad azul), bajo infección natural e inoculaciones controladas a campo.

En base a los resultados promisorios obtenidos en la validación del clon infectivo del CLRDV se decidió utilizar por primera vez dicho clon en la evaluación del comportamiento sanitario de tres líneas avanzadas del programa de mejoramiento genético de algodón de la EEA Sáenz Peña. Las líneas 4172 y 45826 se comportaron como resistentes y no se observó infección con el CLRDV y la línea 6635 se comportó como susceptible con un porcentaje de infección del 25%. Estas líneas habían sido evaluadas previamente a campo con el método de liberación de áfidos virulíferos. En la campaña agrícola 2009/10 se evaluó la línea 45826 y se la clasificó como resistente. En la campaña 2013/14 se evaluó nuevamente la línea 45826 y presentó un 2,2% de infección (plantas con síntomas/total de plantas del ensayo) mostrando un comportamiento diferente al registrado en la campaña 2009/10. Las líneas 4172 y 6635 también fueron evaluadas en la campaña 2013/14 y no presentaron síntomas de la enfermedad. Las condiciones ambientales registradas durante este ensayo provocaron una distribución irregular del áfido virulífero, por lo tanto la presencia de síntomas de la enfermedad también fue irregular. Durante el ensayo se observaron genotipos altamente susceptibles, como NC33B, que no se infectaron, por lo tanto el resultado de resistencia de las líneas 4172 y 6635, podría deberse a que esas plantas no fueron picadas por áfidos virulíferos, tal como ocurrió con la línea susceptible NC33B. Además, se observaron infestaciones naturales con el insecto vector y se

registró la presencia de plantas con síntomas de CLRBV, nuevo virus emergente que quiebra la resistencia. Estos resultados muestran las dificultades que presentan las evaluaciones a campo, en comparación al sistema de evaluación desarrollado con el clon infectivo, donde el inóculo viral está presente en todas las plantas que se evalúan. La línea 45826 resultó resistente en la evaluación con el clon infectivo en el primer ensayo a campo, pero en el segundo ensayo a campo presentó un 2,2% de infección. Una posible explicación es que en la evaluación de esta línea a campo haya ocurrido una coinfección con el CLRDV y CLRBV, debido a que ambos virus se transmiten por el mismo insecto vector y en el campo dónde se realizó el ensayo se detectaron plantas con síntomas de CLRBV. De esta manera el virus CLRBV quebraría la resistencia de la línea permitiendo que el virus CLRDV infecte las plantas y se observen síntomas de enfermedad azul.

La línea 6635 resultó susceptible al CLRDV en el ensayo de evaluación con el clon infectivo, por lo tanto debería introgresarse el gen de resistencia por cruzamiento con un padre resistente (Guazuncho 2 INTA) y nuevamente con la técnica de infección con el clon infectivo del CLRDV identificar en la progenie los individuos resistentes y que posean alto rendimiento de fibra de algodón.

Se realizó otro ensayo de líneas menos avanzadas del programa de mejoramiento genético de algodón con el sistema del clon infectivo. Se evaluaron las progenies de las líneas 114, 314 y 514, materiales que aún no fueron evaluados a campo. Los resultados mostraron que las líneas 114 y 514 son resistentes a la infección por CLRDV y homocigotas para la fuente de resistencia, debido a que toda la progenie fue resistente a la infección. En la línea 314 se observaron individuos resistentes y susceptibles, por lo tanto la resistencia está segregando y la línea no es aún homocigota para el carácter. El sistema de evaluación con el clon infectivo permite con un bajo número de plantas seleccionar las líneas que poseen la fuente de resistencia en homocigosis de una manera más rápida, permitiendo llevar a evaluación a campo materiales que no estén segregando el carácter.

5.6 Perspectivas futuras

Actualmente el programa de mejoramiento de algodón de la EEA Sáenz Peña dispone de líneas con buenas características agronómicas, que fueron clasificadas como sensibles frente a enfermedad azul en evaluaciones realizadas con el método

tradicional del áfido virulífero. Por este motivo, fueron descartadas para el cultivo extensivo en la región y coleccionadas en el Banco de Germoplasma de la EEA Sáenz Peña. Se propone realizar cruzamientos entre esas líneas y un padre resistente a la infección viral por CLRDV (Guazuncho 2 INTA) para transferir los alelos de resistencia y empleando la técnica del clon infectivo del virus identificar las plantas que heredaron el o los alelos de resistencia. Luego, se continuará con una nueva retrocruza y ensayos de agroinfección con el CLRDV en las plantas obtenidas, para seleccionar plantas resistentes con las características agronómicas de la planta original.

Teniendo en cuenta los resultados de ésta tesis, nos proponemos desarrollar un clon infectivo del CLRBV, para realizar una búsqueda en las variedades de algodón disponibles en el banco de germoplasma del programa de mejoramiento de algodón del INTA, para identificar si existen genes de resistencia y/o tolerancia a esta nueva virosis que puedan ser utilizados en mejoramiento e introgresión en variedades élite.

6. CONCLUSIONES

1. Se logró establecer el método de agroinfección con el clon infectivo de ADNc del CLRDV, en variedades de algodón susceptibles, en el Laboratorio Regional de Patología Vegetal de la EEA INTA Sáenz Peña.
2. Se logró restablecer el sistema de transmisión secuencial del CLRDV con áfidos virulíferos, en variedades de algodón susceptibles y en condiciones controladas, método tradicionalmente empleado en la EEA para la evaluación del comportamiento de líneas mejoradas frente al CLRDV.
3. Se demostró que la progenie viral del CLRDV producida a partir del clon infectivo es transmisible por el vector *A. gossypii*.
4. Se comprobó que no hay diferencia en la respuesta de las variedades de algodón susceptibles, frente a la infección con CLRDV, utilizando el sistema de infección con el clon infectivo o con áfidos virulíferos.
5. Se demostró que el clon infectivo del CLRDV puede utilizarse como sistema de infección de rutina en los Programas de mejoramiento de algodón, siendo un método más sencillo y fácil de aplicar que el sistema de áfidos virulíferos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G.N. 1997. Fitopatología. 2º Ed. Limusa. 635 p.
- Allard, R.W. 1960. Principles of plant breeding. John Wiley & Sons. New York. 473 p.
- Arturi, M.J. 1984. El algodón: Mejoramiento genético y técnica de su cultivo. Buenos Aires, Editorial Hemisferio Sur S.A. pp. 7-12.
- Bonacic Kresic, I.; Campagnac, N.; Poisson, J.; Ojeda, A.D. 1997. Informe sobre la enfermedad azul del algodnero en la República Argentina. VI Reunión Asociación Latinoamericana de Investigación y Desarrollo del algodnero, P.R. Sáenz Peña Informe por disciplinas pp. 1-7.
- Bonacic Kresic, I. 2000. Enfermedad azul. <http://inta.gob.ar/saenzpena>
- Bonacic Kresic, I.; Ojeda, A.D.; Gómez, D.E. 2006. Primera contribución al conocimiento de la enfermedad azul del algodnero en Argentina. Resúmenes XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. San Fernando del Valle de Catamarca, Argentina. pp. 331-332.
- Bonacic Kresic, I.; Ojeda, A.D.; Poisson, J.A.; Gómez, D.E. 2006. Evaluación de cultivares y líneas avanzadas frente a la Enfermedad Azul del Algodnero, en condiciones de campo. Proyecto Nacional de Algodón INTA, Ediciones INTA 3ra Reunión Anual. pp. 179-183.
- Brown, J.K. 1992. Virus diseases of cotton. In: Cotton diseases (R.J. Hillocks, ed.). CAB International, Wallingford, UK. pp. 275-329.
- Cauquil, J.; Follin, J.C. 1983. Presumed virus and mycoplasma-like organism disease in subsaharam Africa and in the rest of the world. *Coton et fibres tropicales* 38: 293-317.
- Cauquil, J. 1977. Etudes sur une maladie d'origine virale du cotonnier: la maladie bleue. *Coton et Fibres Tropicales* 32: 259-278.
- Cauquil, J.; Vaissayre, M. 1971. La "maladie bleue" du cotonnier en Afrique: transmission de cotonnier a cotonnier par *Aphis gossypii* Glover. *Coton et Fibres Tropicales* 26: 463-466.
- Campagnac, N.A.; Bonacic Kresic, M.; Poisson, J. 1986. Mal de Misiones: nueva enfermedad del algodón de probable origen virósico. Resúmenes VI Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Alto Valle de Rio Negro y Neuquén. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue. 2: 503-511.
- Chiba, M.; Reed, J.C.; Prokhnevsky, A.I.; Chapman, E.J.; Mawassi, M.; Koonin, E.V.; Carrington, J.C.; Dolja, V.V. 2006. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology* 346: 7-14.

- Correa, R.L.; Silva, T.F.; Simoes-Araujo, J.L.; Barroso, M.S.; Vaslin F.S. 2005. Molecular characterization of a virus from the family Luteoviridae associated with cotton blue disease. *Archives of Virology* 50: 1357-1367.
- Costa A.S.; Carvalho A.M.B. 1962. Molestias de virus do algodoeiro. *Bragantia* 21: 50-51.
- D'Arcy,C.J.; Domier, L.L.; Mayo, M.M. 2000. Family Luteoviridae. *In: Virus taxonomy, Classification and nomenclature of viruses* (M.H.V. Van Regenmortel, C.M Fauquet C.M. y D.H.L. Bishop, eds). Academic Press, San Diego. pp. 775-784.
- D'Arcy,C.J.; Domier, L.L. 2005. Family Luteoviridae. *In: Fauquet,C.M.; Mayo, M.A.;Maniloff ,J.; Desselberger, U. and Ball, L.A. (eds) Virus taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, pp 891-900.*
- Delfosse, V.C.; Casse, M.F.; Agrofoglio, Y.C.; Bonacic Kresic, I.; Hopp, H.E., Ziegler-Graff, V.; Distéfano, A.J. 2013. Agroinoculation of a full-length cDNA clone of cotton leafroll dwarf virus (CLR DV) results in systemic infection in cotton and the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Virus Research* 175: 64-70.
- Delfosse, V.C.; Agrofoglio, Y.C.; Casse, M.F.; Bonacic Kresic, I.; Hopp, H.E.; Ziegler-Graff, V.; Distéfano, A.J. 2014. The P0 protein encoded by cotton leafroll dwarf virus (CLR DV) inhibits local but not systemic RNA silencing. *Virus Research* 180: 70-75
- Distéfano, A.J., Bonacic Kresic, I.; Hopp, H.E. 2010. The complete genome sequence of a virus associated with cotton blue disease, cotton leafroll dwarf virus, confirms that it is a new member of the genus Polerovirus. *Archives of Virology* 155: 1849-54.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Dixon, A.F.G. 1985. Aphid Ecology. Primera edición. Chapman & Hall. Nueva York. 157 p.
- Domínguez, E.; Quiros, D.I.; Emmen, D. 2004. Efecto de la temperatura sobre el ciclo de vida de *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *Tecnociencia* 6: 61-69.
- Ebert, T.A.; Cartwright B. 1997. Biology and ecology of *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *Southwest Entomology* 22: 116-153.
- Fang, D.D.; Xiao, J.; Canci, P.C. 2010. A new SNP haplotype associated with blue disease resistance gene in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 120: 943-953.

- Franco-Lara, L.F.; McGeachy, K.D.; Commandeur, U.; Martin, R.R.; Mayo, M.A.; Barker, H. 1999. Transformation of tobacco and potato with cDNA encoding the full-length genome of *Potato leafroll virus*: evidence for a novel virus distribution and host effects on virus multiplication. *Journal of General Virology* 80: 2813-2822.
- Fryxell, P.A. 1992. A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (*Malvaceae*). *Rheda* 2: 108-165.
- Galbieri, R.; Cia, E.; Fuzatto, M.G.; Franzon, R.C.; Belot, J.L.; Souza Dias, J.A.C. 2010. Transmissibilidade e reação de genótipos de algodoeiro a uma atípica do vírus do mosaico das nervaduras. *Tropical Plant Pathology* 35: 088-095.
- Gallo, D.; Nakano, O.; Wiendel, F.M.; Silveira Neto S.; Carvalho, R.P.L.; Batista, G.C.de; Berti Filho, E.; Para, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramin, J.D. 1988. Manual de entomologia agrícola. 2º Ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 649 p.
- Gildow, F.E. 1999. Luteovirus transmission and mechanisms regulating vector specificity. In: Smith, H.G. and Barker, H. (ed.), *The Luteoviridae*. CAB International, Oxon, United Kingdom. pp. 88-113.
- Gray, S.; Gildow, F.E. 2003. Luteovirus-aphid interactions. *Annual Review of Phytopathology* 41: 539-566.
- Grimsley, N.; Hohn, B.; Hohn, T.; Walden, R. 1986. 'Agroinfection', an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 83: 3282-3286
- Grimsley, N.; Hohn, T.; Davies, J.W.; Hohn, B. 1987. *Agrobacterium*-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. *Nature* 325: 177-179.
- ICAC (Comité Consultivo Internacional del Algodón). <http://www.icac.org>.
- Innes, N.L. 1983. Bacterial blight of cotton. *Biological Reviews* 58: 157-176.
- Karley, A.J.; Pitchford, J.W.; Douglas, A. E.; Parker, W.E.; Howard, J.J. 2003. The causes and processes of the mid-summer population crash of the potato aphids *Macrosiphum euphorbiae* and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 93: 425-438.
- King, A.B.S.; Saunders, J.L. 1984. Las Plagas invertebradas de cultivos anuales en América Central. Una guía para su reconocimiento y control. Administración de Desarrollo Extranjero. Londres. 182 p.
- Klein, E.; Brault, V.; Klein, D.; Weyens, G.; Lefèbvre, M.; Ziegler-Graff, V.; Gilmer, D. 2014. Divergence of host range and biological properties between natural isolate and full-length infectious cDNA clone of the Beet mild yellowing virus 2ITB. *Molecular Plant Pathology* 15: 22-30.

- Kocourek, F.; Havelka, J.; Beránková, J.; Jarosik, V. 1994. Effect of temperature on development rate and intrinsic rate or increase of *Aphis gossypii* reared on greenhouse cucumbers. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 71: 59-64.
- Leiser, R.M.; Ziegler-Graff, V.; Reutenauer, E.; Herrbach, E.; Lemaire, O.; Guilley, H.; Richards, K.; Jonard, G. 1992. Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with Beet western yellows luteovirus. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 89: 9136-9140.
- Mayo, M.A.; Ziegler-Graff, V. 1996. Molecular biology of Luteoviruses. *Advances in Virus Research* 46: 413-460.
- Mayo, M.A.; Miller, W.A. 1999. The structure and expresión of luteovirus genome, *In:Smith, H.G., Barker, H. (ed.), The Luteoviridae*. CABI, Wallingford, Conn. pp. 23-42.
- Michelotto, M.A.; Busoli, A.C. 2003. Eficiência de ninfas e adultos de *Aphis gossypii* Glover na transmissão do vírus do mosaico das nervuras do algodoeiro. *Bragantia* 62: 255-259.
- Michelotto, M.A.; Busoli, A.C. 2006. Efeito da Época de inoculação do Vírus do Mosaico das Nervuras por *Aphis gossypii* Glover no Desenvolvimento e na Produção do Algodoeiro. *Neotropical Entomology* 35: 251-256.
- Mondino, M. 2006. Algodón. *En. E. De la Fuente (eds.), Cultivos Industriales*. Buenos Aires. FAUBA. pp. 359-365.
- Olivera, J.E.; De Bortoli, S.A.; Ferreira dos Santos, R.; Nunes Moreira, A. 2010. Desenvolvimento de metodologia de criação e multiplicação de *Aphis gossypii*: avanços e sucessos. *Comunicata Scientiae* 1: 65-68.
- Lamprecht, S.; Jelkmann, W. 1997. Infectious cDNA clones used to identify strawberry mild yellow edge-associated potyvirus as causal agent of the disease. *Journal of General Virology* 78: 2347-2353.
- Liu, L.; Lomonosoff, G.P. 2002. Agroinfection as rapid method for propagating Cowpea-mosaic virus-based constructs. *Journal of Virological Methods* 105: 343-348.
- Miranda, J.E.; Suassuna, N.D.; Morello, C.L.; Vaslin, F.S.; Freire, E.C. 2008. Doença azul do algodoeiro: Novos aspectos a serem considerados no manejo. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Embrapa Algodão: Campina Grande Circular Técnica 121: 1-11.
- Narváez, Z.; Notz, A. 1993. Desarrollo, longevidad y reproducción del áfido verde del ajonjolí, *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) sobre plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) y ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). *Boletín Entomología Venezolana* 8: 53-61.

- Nateshan, H.; Muniyappa, V.; Swanson, M.M.; Harrison, B.D. 1996. Host range, vector relations and serological relationships of cotton leaf curl virus from southern India. *Annals of Applied Biology* 128: 233-244.
- Pfeffer, S.; Duyoner, P.; Heim, F.; Richards, K.E.; Jonard, G.; Ziegler-Graff, V. 2002. Po of Beet western yellow virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* 76: 6815-6824.
- Poisson, J.A.F. 2002. Breve historia de la producción de algodón en la argentina. p. 1-8. In. INTA-EEA Sáenz Peña (eds.), De Chacra Oficial a Estación Experimental. 79 años de Investigación Algodonera en el Centro de la Provincia del Chaco.
- Prüfer, D.; Wipfscheibel, C.; Richards, K.; Guilley, H.; Lecoq, H.; Jonard, G. 1995. Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of cucurbit aphid-borne yellows virus and its use in gene exchange experiments with structural proteins from other luteoviruses. *Virology* 214: 150-158.
- Pupim Junior, O; Schuster, I.; Pinto, R.B.; Pires, E.; Belot, J.L.; Silvie, P.; Chitarra, L.G.; Hoffmann, L.V.; Barroso, P. 2008. Inheritance of resistance to cotton blue disease. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43: 661-665.
- Royo, O.M.; Erazzu, L.; Bonacic Kresic, I.; Poisson, J.; Montenegro, A. 2003. Screening of cotton germplasm for "blue disease" under natural field infestation. In: Swanepoel A. (ed.) Proceedings of the world cotton research conference-3, Cape Town, South Africa. Agricultural Research Council-Institute for Industrial Crops (Publisher). pp. 305-316.
- Royo, O.M.; Poisson J.; Bonacic Kresic, I.; Montenegro, A.; Ibaló, S.I.; Mazza, S.; Giménez, L. 2007. Direction of Cotton Breeding in Argentina. Plant Breeding and Genetics World Cotton Research Conference-4, Lubbock, Texas, USA, 10-14 September 2007. 17 p.
- Rummel, D.R.; Arnold, M.D.; Slosser, J.E.; Neece, K.C.; Pinchak, W.E. 1995. Cultural factors influencing the abundance of *Aphis gossypii* Glover in Texas High Plains cotton. *South Western Entomologists* 20: 396-406.
- Saini, E.D. 2003. Insectos y ácaros perjudiciales al cultivo de algodón y sus enemigos naturales. Publicación del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola. Buenos Aires Ediciones INTA. pp. 24-25.
- Sadowy, E.; Pluta, K.; Gronenborn, B.; Hulanicka, D. 1998. Infectious transcripts from cloned cDNA of Potato leafroll luteovirus. *Acta Biochimica Polonica* 45: 611-619.
- Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E.F. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. ColdSpring Harbor Laboratory Press, New York. 1626 p.

- Santos, W.J. 1999. Monitoramento e controle das pragas do algodoeiro. *In*: Cia, E., Freire, E. C., Santos, W. J. (Eds.). Cultura do algodoeiro. Piracicaba: Potafós 296 p.
- SIIA. (Sistema Integrado de Información Agropecuaria). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Presidencia de la Nación. URL: <http://www.sii.gov.ar>.
- Silva, T.F.; Corrêa, R. L.; Castilho, Y.; Bélot, J.L.; Vaslin, M.F.S. 2008. Widespread distribution and a new recombinant species of Brazilian virus associated with cotton blue disease. *Virology Journal* 5: 123.
- Silva, T.F.; Corrêa, R. L.; Castilho, Y.; Suassuna, N.; Silvie, P.; Zambiasi, T.C.; Bélot, J.L.; Vaslin, M.F.S. 2007. Análise de possíveis de quebra de resistência em variedades de algodoeiro resistentes á doença azul.VI Congresso Brasileiro do Algodão. 7 p.
- Soglia, M.C.M.; Bueno, V.H.P.;Rodrigues, S.M.M.; Sampaio, M.V. 2003.Fecundidade e longevidade de *Aphis gossypii* Glover, 1877, (Hemiptera: Aphididae) em diferentes temperaturas e cultivares comerciais de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Revista Brasileira de Entomologia* 47: 49-54.
- Stevens, M.; Viganó, F. 2007. Production of a full-length infectious GFP-tagged cDNA clone of Beet mild yellowing virus for the study of plant polerovirus interactions. *Virus Genes* 34: 215-221.
- Sylvester, E.S. 1980. Circulative and propagative virus transmission by aphids. *Annual Review Entomology* 25: 257-286.
- Takimoto, J.K. 2003. Estudo da relação vetor-patógeno-hospedeiro para doença azul do algodoeiro. MSc THesis, Instituto Agronomico de Campinas, São Paulo Brazil, 97 p.
- Takimoto,J.K.; Benetti Queiroz-Voltan, R.; Caram de Souza-Dias, J.A.; Cia, E. 2009. Alterações anatômicas em algodoeiro infectado pelo vírus da doença azul. *Bragantia* 68:109-116.
- Turpen, T.H.; Turpen, A.M.; Weinzettl, N.; Kumagai, M.H.; Dawson, W.O. 1993. Transfection of whole plants from wounds inoculated with *Agrobacterium-tumefaciens* containing cDNA of Tobacco mosaic virus. *Journal of Virological Methods* 42: 227-240.
- Van der Wilk, F.; Houterman, P.; Molthoff, J.; Hans, F.; Dekker, B.; Van del Heuvel, J.; Huttinga, H.; Goldbach, R. 1997. Expresión of the Potatoe leafroll virus ORF 0 induces viral-disease-like symptoms in transgenic potato plants. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 10: 153-159.
- Vaissayre, M.1970. Biologie du puceron du cotonnier *Aphis gossypii* Glover en conditions naturelles. Rapport de stage, ORSTOM, Montpellier, 53 p.

Violic, A.D.; Granados, G.; Marathée, J.P.; Paliwal, R.L. 2001. El Maíz en los trópicos: mejoramiento y producción. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO.392p.

Waterhouse, P.M.; Gildow, F.E.; Johnstone, G.R. 1988. Luteovirus group. *In*:AAB Descriptions of plant viruses. Kew, GB: The Institute, (339) 9 p.