

CARACTERIZACIÓN GENERAL DE PLANTAS DE ALFALFA INFECTADAS POR EL VIRUS DEL ENANISMO

Camila Jaime¹, Sebastián Muchut²

*1. Departamento de Producción Animal, 2. Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias,
Universidad Nacional del Litoral*

Área temática del trabajo: Ingeniería.

Sub-área: Agronomía.

Grupo: X

INTRODUCCIÓN

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una leguminosa perenne ampliamente utilizada para alimentación animal y uno de los alimentos de mayor valor nutritivo por masa seca. En la actualidad es la planta forrajera más ampliamente distribuida a nivel mundial debido principalmente a la gran adaptación al crecimiento en diferentes tipos de climas y suelos. Argentina es el mayor productor de alfalfa del hemisferio sur y el segundo a nivel mundial (Lenardon et al, 2010).

En la agricultura moderna las pérdidas de producción debido a enfermedades emergentes de plantas son altas y la alfalfa no es la excepción. En nuestro país, dentro de las enfermedades virales más importantes de este cultivo se encuentra el Alfalfa Dwarf Virus (ADV). El ADV es un virus perteneciente a la familia Rhabdoviridae y ha sido agrupado como un cytorhabdovirus presentando material genético como ARN monocatenario negativo (ssRNA; Bejerman et al, 2011; Bejerman et al, 2015). Los viriones han sido observados en floema (tejido de conducción de savia elaborada) y principalmente en el espacio perinuclear de las células vegetales (Signoret y Alliot, 1997). La transferencia viral entre plantas es llevada a cabo por el pulgón negro (Signoret & Alliot, 1997). El ADV, al producir acortamiento de nudos y deformación de hojas, otorga a las plantas un aspecto de arbustos enanos. La enfermedad comienza afectando los tejidos radicales de la planta pero se hace evidente en estadios avanzados de la afección cuando son afectadas las partes aéreas (Smith, 1972). Entre los síntomas tempranos en la parte aérea de la planta se encuentran el acortamiento de los tallos y una leve disminución del tamaño de las hojas (Smith, 1972). En estadios tardíos de la enfermedad se observan gran cantidad de arrugas, acortamiento de venas y formación de papilas en la superficie abaxial de la hoja; y epinastia sobre la cara adaxial.

Si bien el enanismo de la alfalfa fue descrito hace algunas décadas, en la actualidad no hay información clara y detallada sobre el efecto del ADV en las plantas. Por ello, se presenta en el presente trabajo la primera caracterización a nivel bioquímico, microscópico y fotosintético del efecto del ADV sobre plantas de alfalfa. Los resultados obtenidos acrecentarán sustancialmente el conocimiento sobre los efectos del ADV en alfalfa y permitirán diagramar sistemas de control más eficientes.

OBJETIVOS

Caracterizar a nivel bioquímico, fotosintético y microscópico los síntomas ocasionados por la infección de plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) por ADV.

Proyecto: **ASaCTel** n° 2010-109-16. "Desarrollo de plantas transgénicas de alfalfa tolerantes al virus del enanismo".

Director del proyecto: Dr. German Dunger

Director de pasantía: Dr. German Dunger

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Los ensayos detallados en el presente trabajo fueron llevados a cabo utilizando plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivadas en invernadero a temperatura promedio de 25°C y ciclo de 16 horas de luz. Las plantas infectadas fueron recolectadas en zonas agrícolas de la ciudad de Esperanza (Santa Fe), trasplantadas a macetas de 10 L de capacidad y mantenidas en condiciones similares a las sanas pero aisladas físicamente de éstas.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis enzimático.

Para el aislamiento viral se utilizaron hojas jóvenes que fueron maceradas con mortero y nitrógeno líquido. Luego se siguió un procedimiento basado en el reactivo Trizol con posterior extracción y precipitación con cloroformo: alcohol isoamílico. El ARN total resultante se retro-transcribió a ADNc utilizando la enzima retrotranscriptasa, siguiendo las indicaciones del fabricante, y utilizando oligonucleótidos hexaméricos aleatorios. El ADV fue confirmado por PCR utilizando Taq polimerasa (Invitrogen) y oligonucleótidos específicos para amplificación de un fragmento del gen L. El fragmento obtenido fue digerido con las enzimas *EcoRI*, *EcoRV* y *AseI* utilizando condiciones recomendadas por el fabricante.

Detección de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Se determinó la producción de peróxido de hidrógeno utilizando la metodología previamente reportada por Dunger y colaboradores (2005) con modificaciones. Se incubaron fragmentos de hojas de plantas sanas e infectadas con 3,3 diamino bencidina (DAB) por 16 horas y oscuridad. Luego las hojas se decoloraron con etanol y se montaron fragmentos de las mismas sobre portaobjetos para observación en un microscopio óptico Leica con objetivo de 40X y 60X.

Medición de eficiencia fotosintética

La eficiencia fotosintética se determinó utilizando un sistema de medición CIRAS-2 (PP System) utilizando saturación lumínica a 900 mol m² seg⁻¹ y CO₂ de 500ppm como referencias. Las hojas se colocaron en el detector de manera de sellar completamente la cubeta de detección y se dejó hasta estabilización de los datos. Seguido se determinaron los parámetros: tasa fotosintética (Pn), conductancia estomática (Gs) y tasa de evaporación/transpiración (E).

Microscopía electrónica de barrido

Se fijaron fragmentos de hoja en solución de FAA (formaldehído-etanol-ácido acético-agua, 10: 50: 5: 35 v/v) por 48 horas y luego se transfirieron a etanol 70%. Las muestras, previa disección bajo microscopio estereoscópico (Nikon SMZ-10), fueron deshidratadas en serie creciente de etanoles (70%, 80%, 96%, 100%) más dos cambios de acetona 100%. Posteriormente, las muestras fueron secadas por punto crítico (Emitech K850) utilizando CO₂ como fluido de transición, montadas en placas de bronce y adheridas a platinas de aluminio. Las muestras se metalizaron con oro-paladio empleando el equipo Sputter Coater Emitech SC7640 y se visualizaron utilizando un microscopio electrónico de barrido FEI QUANTA 200 (Instituto de Física - CCT Rosario).

Proyecto: **ASaCTel** n° 2010-109-16. "Desarrollo de plantas transgénicas de alfalfa tolerantes al virus del enanismo".

Director del proyecto: Dr. German Dunger

Director de pasantía: Dr. German Dunger

RESULTADOS

Las plantas enfermas analizadas estaban infectadas por ADV

Con la finalidad de confirmar que las plantas de alfalfa estaban infectadas por el ADV se llevó a cabo la extracción de ARN a partir de hojas con síntomas de enfermedad. Posteriormente se amplificó un fragmento del gen que codifica para la polimerasa L utilizando como molde ADNc previamente retrotranscrito a partir del ARN extraído. Como se observa en la figura 1A, se amplificó un fragmento correspondiente a 497pb coincidente con lo esperado. Este fragmento (denominado F1) fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI*, *EcoRV* y *AseI* para estudiar los patrones de corte y confirmar que F1 corresponda al fragmento de L del ADV secuenciado (Bejerman et al, 2015). Los resultados obtenidos en este análisis (Figura 1B) junto a los obtenidos por tamaño de amplificación nos permiten afirmar que las plantas enfermas contienen ADV.

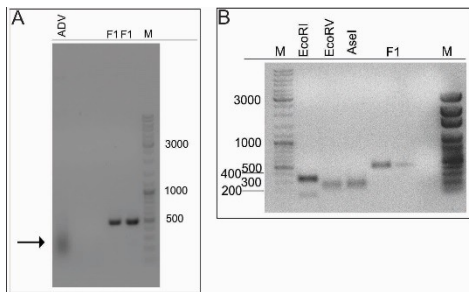


Figura 1. Purificación de ADV y amplificación de fragmento interno de la polimerasa L (F1); la flecha indica el ADV (A). Análisis de restricción de F1. Las enzimas utilizadas se indican en la parte superior (B). M, indica marcador de peso molecular, los números indican el tamaño en pares de bases.

El ADV produce ROS en las zonas de infección

Se analizó la producción de la ROS peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en hojas infectadas utilizando tinción con DAB (Figura 2A). Se pudo detectar una alta producción de H_2O_2 en forma de pequeñas manchas localizadas en las inmediaciones a las nervaduras (Figura 2A). Esto es coincidente con las áreas de deformación de las hojas y con los puntos de infección del pulgón negro.

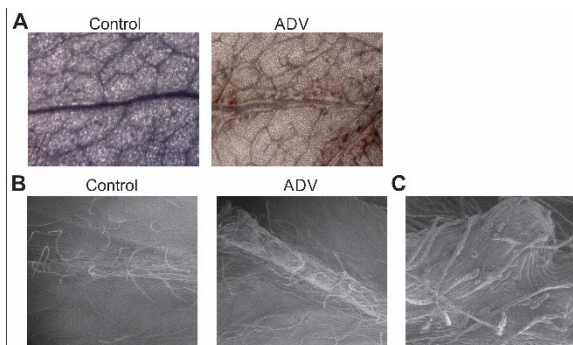


Figura 2. Detección de ROS en zonas de nervaduras de hojas de plantas de alfalfa (A). Observación de protuberancias en nervaduras por MEB (B). (C) corresponde a una zona ampliada de ADV en (B). En la parte superior de cada figura se indica a que planta de alfalfa corresponde la imagen; Control, sin enfermedad; ADV, planta enferma.

El ADV induce la deformación de las nervaduras

Utilizando microscopía electrónica de barrido (MEB) analizamos hojas de plantas infectadas con la finalidad de observar la morfología y disposición de las células vegetales en las protuberancias inducidas por el ADV (Figura 2B y C). En hojas severamente

Proyecto: **ASaCTel** n° 2010-109-16. “Desarrollo de plantas transgénicas de alfalfa tolerantes al virus del enanismo”.

Director del proyecto: Dr. German Dunger

Director de pasantía: Dr. German Dunger

infectadas pueden observarse las protuberancias características de la infección dispuestas principalmente en las nervaduras de hojas. Las imágenes revelan que las protuberancias serían causadas por un crecimiento irregular (hipertrofia celular) de tejidos ubicados por debajo del epitelial (Figura 2C).

La infección por ADV disminuye la eficiencia fotosintética

Utilizando un sistema de medición CIRAS-2 determinamos la fotosíntesis neta (Figura 3) y observamos que se ve afectada negativamente en plantas infectadas.

Photosynthesis rate

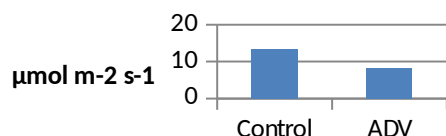


Figura 3. Tasa fotosintética en hojas de alfalfa. Control, corresponde a la planta sana, y ADV a la planta enferma.

CONCLUSIONES

El conjunto de los resultados desarrollados nos permiten concluir que el efecto del ADV sobre plantas de alfalfa involucra aspectos fisiológicos y morfológicos. Por medio del ensayo de tinción con DAB determinamos que el ADV activa mecanismos de defensa de la planta induciendo la producción de ROS para contrarrestar la infección viral. Interesantemente, las zonas de inducción de ROS coinciden con las nervaduras, región donde se observó un crecimiento celular irregular que provoca alteraciones macroscópicas (protuberancias y pliegues) en las hojas. Esto estaría indicando que los puntos de contacto con el vector de transferencia e ingreso viral serían los más afectados. También observamos una drástica disminución de la tasa fotosintética en hojas de alfalfa infectadas lo que indicaría que el ADV estaría afectando el metabolismo energético y que se podría estar dando de forma indirecta debido al cambio morfológico de las hojas.

BIBLIOGRAFÍA

Bejerman, N., Nome, C., Giolitti, F., Kitajima, E., de Breuil, S., Fernandez, J.P., Basigalup, D., Cornacchione, M., Lenardon, S. 2011. First Report of a Rhabdovirus Infecting Alfalfa in Argentina. *Plant Disease* 95:771-771.

Bejerman, N., Giolitti, F., de Breuil, S., Trucco, V., Nome, C., Lenardon, S., Dietzgen, R.G. 2015. Complete genome sequence and integrated protein localization and interaction map for alfalfa dwarf virus, which combines properties of both cytoplasmic and nuclear plant rhabdoviruses. *Virology* 483:275-283.

Dunger, G., Arabolaza, A.L., Gottig, N., Orellano, E.G., Ottado, J. 2005. Participation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* hrp cluster in citrus canker and nonhost plant responses. *Plant Pathol.* 54:781-788.

Proyecto: **ASaCTel** n° 2010-109-16. "Desarrollo de plantas transgénicas de alfalfa tolerantes al virus del enanismo".

Director del proyecto: Dr. German Dunger

Director de pasantía: Dr. German Dunger

Lenardón, S.; Pérez Fernández, J. Basigalup, D. 2010. Descubren una nueva enfermedad en alfalfa. INTA informa. Disponible en: <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=2693>.

Signoret, P.A., Alliot, B.C. 1997. Lucerne enation virus en (Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. Zurcher, E.J.). Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database: 62.U.P.0.029.

Proyecto: **ASaCTel** n° 2010-109-16. “Desarrollo de plantas transgénicas de alfalfa tolerantes al virus del enanismo”.

Director del proyecto: Dr. German Dunger

Director de pasantía: Dr. German Dunger