

33. Virología Molecular

Estudio de la respuesta de plantas de alfalfa a la infección por el virus del enanismo (ADV)

Jaime, Camila¹; Dunger, Germán²

¹ autor; ² orientador

caami_j@hotmail.com; gdunger@fca.unl.edu.ar

Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional del Litoral

Resumen

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una leguminosa con alto valor nutritivo. Es la planta forrajera más distribuida a nivel mundial debido a su gran adaptabilidad a diferentes climas y suelos. Dentro de las enfermedades más importantes de la alfalfa, se encuentra la causada por el virus del enanismo (ADV). El ADV pertenece 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). En nuestro país, esta enfermedad tiene un 70% de prevalencia y genera un 30% de pérdida de producción, debido a que disminuye el área foliar y produce acortamiento de los nudos. Actualmente no hay información clara y detallada sobre el efecto del ADV en la alfalfa. Por ello, se presenta la primera caracterización a nivel bioquímico, microscópico y fotosintético del efecto del ADV en alfalfa.

Para comprender esta interacción planta-patógeno fueron utilizadas una gran variedad de técnicas incluyendo análisis moleculares, microscopía electrónica de barrido y fluorescencia, cortes histológicos para evaluar morfología interna y análisis bioquímicos para detección de calosa y ROS. Los resultados obtenidos nos indican que el ADV induciría alteraciones tanto a nivel del metabolismo energético, como a nivel bioquímico y de anatomía, demostrando que la infección con ADV desencadena respuestas de defensa importantes en la planta, que afectan su metabolismo basal y productividad.

PALABRAS CLAVE: Alfalfa, enanismo, ADV.

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 la causada por 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). Se especula que 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

radiculares de la planta pero se hace evidente en estadios avanzados de la infección 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, en el presente trabajo se describe 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

El objetivo general de este trabajo consiste en caracterizar a nivel molecular, morfológico, fisiológico, bioquímico y microscópico los efectos del ADV sobre plantas de alfalfa.

Específicamente se proponen los siguientes objetivos:

. Aislamiento del ADV presente en plantas de alfalfa infectadas en la zona de Esperanza (Santa Fe) y determinación del grado de identidad de secuencia con el ADV aislado y secuenciado en la zona de Manfredi (Córdoba).

. Determinar el tipo de respuesta que produce ADV en plantas de alfalfa.

. Analizar a nivel microscópico, bioquímico y morfológico las protuberancias desarrolladas en hojas de plantas infectadas por ADV.

. Estudiar el comportamiento fotosintético en plantas afectadas por ADV.

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 transcriptasa reversa (MMLV, Trans), 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 *Asel* 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 diaminobencidina (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.

estomática (Gs) y tasa de evaporación/transpiración (E).

Deposición de calosa

Los depósitos de calosa son típicamente observados en reacciones de defensa de la planta a diversos patógenos. El ensayo de detección de estos compuestos consiste en desteñir las hojas infectadas y controles, sin infectar, en alcohol 96 % (v/v). Luego, se incubaron en buffer fosfato de sodio 0,07 M, pH 9,0 por 30 minutos, posteriormente se reemplazó el buffer por una solución de azul de anilina 0,05 % (p/v) y se incubó una hora a temperatura ambiente. Finalmente se montan los fragmentos sobre porta objetos para posterior observación utilizando un microscopio de fluorescencia (Leica) para luego analizar las imágenes obtenidas mediante el programa Fiji-ImageJ (Daurelio et al, 2007).

Medición de eficiencia fotosintética

La eficiencia fotosintética se determinó utilizando un sistema de medición CIRAS-2 (PP System) utilizando saturación lumínica a $900 \text{ mol m}^{-2} \text{ seg}^{-1}$ y CO_2 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

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 CO_2 como fluido de transición, montadas en placas de bronce y adheridas a platinas de aluminio. Las muestras se metalizaron con oropaldio empleando el equipo Sputter Coater Emitech SC7640 y se visualizaron utilizando un microscopio electrónico de barrido FEI QUANTA 200 (Instituto de Física - CCT Rosario).

Cortes histológicos

Las hojas se fijaron en FAA (formaldehído-etanol-ácido acético-agua, 10:50:5:35 v/v) por al menos 48 horas y luego se preservaron en alcohol 70% (v/v). Las muestras se diseccionaron en una placa de Petri conteniendo alcohol 70% (v/v) y se seleccionaron los tercios medios de los folíolos y los peciólulos. Las muestras

se colocaron en casetes y se deshidrataron con alcohol etílico en grado creciente (80%, 90%, 96% v/v) hasta alcohol etílico absoluto. Se continuó con una clarificación de las muestras utilizando como fluido clarificante al xilol. Este pasaje también es gradual y se utilizaron mezclas de etanol-xilol con concentraciones crecientes del último. Seguido se infiltra la muestra en parafina. Al igual que en la clarificación, se utilizaron mezclas de xilol-parafina hasta llegar a parafina pura. Luego se realizaron los tacos de parafina donde serán incluidas las muestras, para finalmente, ser cortadas con un micrótopo. Los cortes son adheridos a portaobjetos para su posterior coloración. Se llevó a cabo una coloración doble con safranina y *Astra Blue*. Finalmente, se observaron los cortes por microscopía convencional y las imágenes fueron procesadas utilizando el programa Fiji-Image J.

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 del virus 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. Finalmente, la identidad se confirmó por secuenciación de los genes N y MP virales.

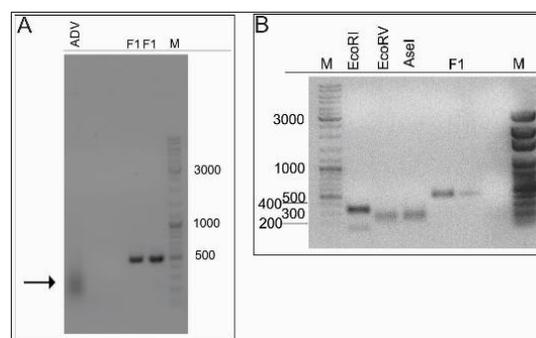


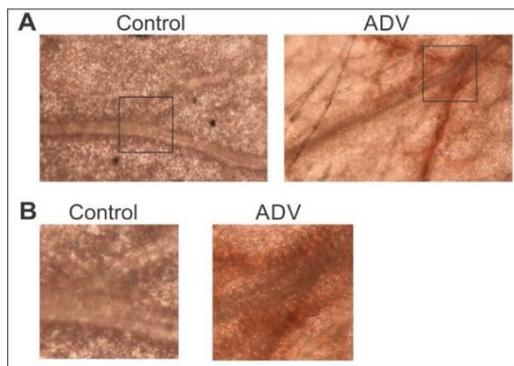
Figura 1. (A) Purificación de ADV y amplificación de fragmento interno de la polimerasa L (F1); la flecha indica el ADV purificado.

(B) Análisis de restricción de F1. Las enzimas utilizadas se indican en la parte superior. M, indica marcador de peso molecular, los números indican el tamaño en pares de bases.

El ADV produciría 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 2). En este ensayo se pudo detectar una alta producción de H_2O_2 en forma de pequeñas manchas localizadas en las inmediaciones a las nervaduras. Esto es coincidente con las áreas de deformación de las hojas y con los puntos de infección del pulgón negro.

Figura 2. (A) Detección de ROS en hojas de



alfalfa infectadas por ADV. **(B)** Ampliación de la zona de nervaduras donde se observa emisión de ROS marcada con un recuadro negro. Panel izquierdo: control, sin enfermedad; panel derecho: ADV, planta enferma.

La presencia del virus induciría deposición de calosa

La deposición de calosa fue evaluada mediante tinción con azul de anilina 0,05% (p/v).

Gran cantidad de calosa fue detectada en la lámina foliar, especialmente en la zona de las nervaduras (Figura 3) de plantas infectadas, mientras que en las hojas

control no se observó una deposición significativa.

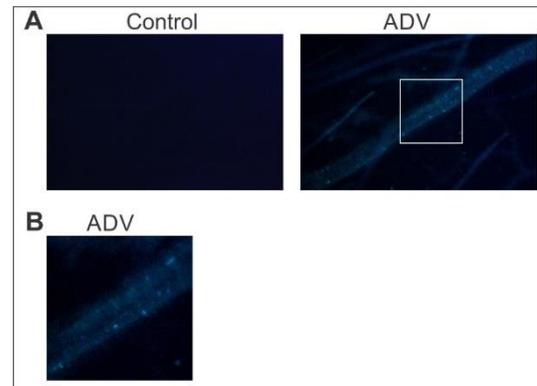


Figura 3. (A) Deposición de calosa en alfalfa. Se observa una elevada fluorescencia de calosa en plantas infectadas con ADV. **(B)** Ampliación de la zona marcada con un recuadro blanco en (A). Panel izquierdo: control, sin enfermedad; panel derecho: ADV, planta enferma.

El ADV induciría 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 4). En hojas severamente infectadas pueden observarse las protuberancias características de la infección dispuestas principalmente en las nervaduras de las hojas. Las imágenes revelan que las protuberancias serían causadas por un crecimiento irregular (hipertrofia celular) de tejidos ubicados por debajo del epitelial.

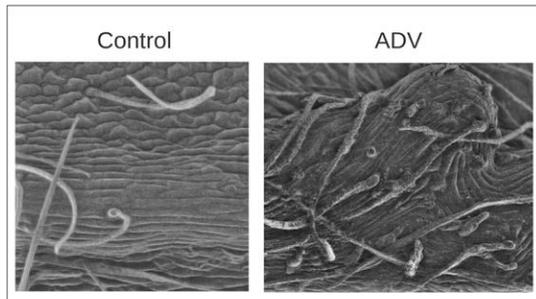


Figura 4. Observación de protuberancias en nervaduras por MEB. Panel izquierdo: control, sin enfermedad; panel derecho: ADV, planta enferma.

La infección por ADV disminuiría la eficiencia fotosintética

Utilizando un sistema de medición CIRAS-2 (PP system) se determinó la fotosíntesis neta (P_n , Figura 5). Se observó que la P_n se ve afectada negativamente en plantas infectadas por ADV, detectando niveles 40% menos que los observados en plantas control sin infectar.

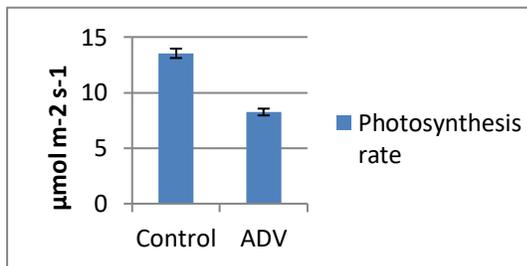


Figura 5. Tasa fotosintética en hojas de alfalfa. Control, corresponde a la planta sana, y ADV a la planta enferma.

Plantas infectadas con ADV presentan parénquima incoloro desorganizado

Se analizó la anatomía de folíolos de las plantas mediante la realización de cortes

histológicos. En las plantas infectadas se observó una elevada desorganización del parénquima fundamental (Figura 6), lo que influiría en la formación de las protuberancias observadas a simple vista y por microscopía electrónica de barrido.

Interesantemente, este fenómeno es observado casi exclusivamente en las regiones adyacentes a los haces vasculares y coincidente con los puntos de ingreso del virus por el vector natural.

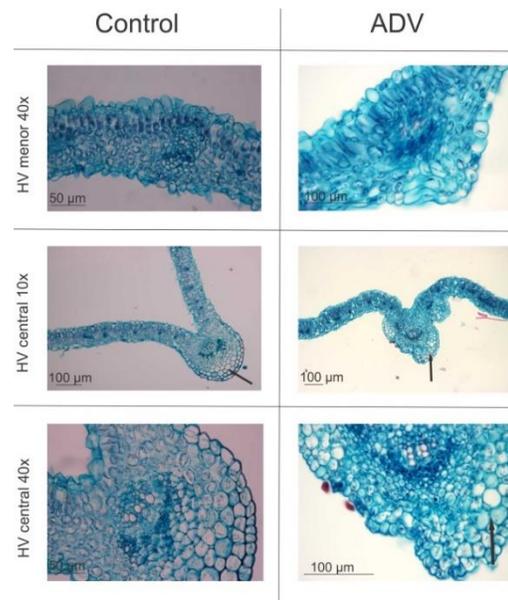


Figura 6. Cortes histológicos de folíolos de alfalfa. Los cortes correspondientes a la planta infectada por ADV (derecha) presentan gran desorganización del parénquima incoloro en la región de los haces vasculares. En la columna izquierda, folíolos de plantas control no infectadas. En la columna derecha, folíolos de plantas infectadas. Las barras negras indican el tamaño en μm ; las flechas negras indican el parénquima fundamental.

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 activaría mecanismos de defensa de la planta induciendo la producción de ROS para contrarrestar la infección viral. Interesantemente, las zonas de inducción de ROS y de deposición de calosa, coinciden con las nervaduras, región donde se observó un crecimiento celular irregular que tiende a provocar 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. Además, se postula que el crecimiento irregular del parénquima fundamental de los folíolos sería el responsable de la formación de las protuberancias características de esta enfermedad.

También observamos una drástica disminución de la tasa fotosintética en hojas de alfalfa infectadas lo que indicaría que el ADV estaría afectando drásticamente el metabolismo energético de la planta.

Bibliografía

- Baldock, J.O., Higgs, R.L., Paulson, W.H., Jakobs, J.A. and Schrader, W.D. 1981. Legume and mineral fertilizer effects on crop yields of several crop sequences in the Upper Mississippi Valley. *Agronomy Journal*. 73: 885-890.
- Bejerman, N., Giolitti, F., de Breuil, S., Trucco, V., Nome, C., Lenardon, S., and 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.
- Bejerman, N., Nome, C., Giolitti, F., Kitajima, E., de Breuil, S., Fernandez, J.P., Basigalup, D., Cornacchione, M., and Lenardon, S. 2011. First Report of a Rhabdovirus Infecting Alfalfa in Argentina. *Plant Disease* 95:771-771.
- Bustillo E. 2012. Calidad del forraje de alfalfa. Publicado en internet, disponible en: <http://www.pasturasyforrajes.com>.
- Collino D., De Luca M. and Dardanelli J. 2007. Uso del agua y la radiación para producción de forraje. En: Basigalup, D.H. (ed). *El cultivo de la alfalfa en la Argentina*. Ediciones INTA. 50-53-59-60.

-Daurelio LD, Tondo ML, Dunger G, Gottig N, Ottado J and Orellano EG. 2009. Hypersensitive response. In: Narwal SS, Catalán AN, Sampietro DA, Vattuone MA, Polyticka B, editors. Book on Plant Bioassays. Houston: Studium Press. 187-206.

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

-O'Rourke, J.A., Fu, F., Bucciarelli, B., Yang, S.S., Samac, D.A., Lamb, J.F., Monteros, M.J., Graham, M.A., Gronwald, J.W., Krom, N., Li, J., Dai, X., Zhao, P.X., and Vance, C.P. 2015. The *Medicago sativa* gene index 1.2: a web-accessible gene expression atlas for investigating expression differences between *Medicago sativa* subspecies. *BMC Genomics* 16:502.

-Racca R.W., Basigalup D., Brenzoni E., Collino D., Dardanelli J., Gonzalez N., Hansen N., Lopez E., Peticari A., Cuadrelli A. and Rivero E. 1998. Cuantificación de la FBN en alfalfa y caracterización de los factores ambientales que la regulan. Proc. XIX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Maturín, Venezuela.

-Signoret, P.A. and 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.*

-Smith, K. 1972. A textbook of plant viruses disease, Academic Press, ISBN: 0-12-651350-3.

-Vernon, L.P. 1960. Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. *Anal. Chem.* 32(9):1144-1150

Agradecimientos

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por darme la posibilidad de aprender y crecer como futura profesional.

A la Facultad de Ciencias Agrarias, por darme el espacio para la realización de mi tesina de grado.

A mi director Germán, por enseñarme todo lo que sé, por su apoyo constante y su paciencia.

Al LEMP, mi familia laboratoril, por la ayuda de todos los días.

A mi familia, por estar siempre a pesar de la distancia.

Financiamiento

Proyecto: ASaCTel n° 2010-109-16.

“Desarrollo de plantas transgénicas de alfalfa tolerantes al virus del enanismo”.

Director de proyecto: Dr. Germán Dunger