



*Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados*



**CONTRIBUCIONES BIOLÓGICAS Y MOLECULARES AL CONOCIMIENTO
DE LA ENFERMEDAD DEL MOSAICO ESTRIADO DEL TRIGO**

Vanina Alemandri

Tesis

Para optar al Grado Académico de
Doctor en Ciencias Agropecuarias

Córdoba, 2017

**CONTRIBUCIONES BIOLÓGICAS Y MOLECULARES AL CONOCIMIENTO
DE LA ENFERMEDAD DEL MOSAICO ESTRIADO DEL TRIGO**

Vanina Alemandri

Comisión Asesora de Tesis

Directora: Dra. Graciela Truol

Co- directora: Dra. Paola López Lambertini

Asesor: Dr. Juan Alberto Argüello

Tribunal Examinador de Tesis

Dr. Joel Arneodo

Dra. Patricia Fichetti

Dr. Juan Alberto Argüello

Presentación formal académica

30 de noviembre de 2017
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Universidad Nacional de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Patología Vegetal (IPAVE) y al Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) por brindarme sus instalaciones y facilitar el desarrollo de este trabajo de Tesis.

A mi directora, Dra. Graciela Truol por su dedicación, responsabilidad y contribución permanente en mi formación tanto profesional como personal. A mi co-directora, Dra. Paola López Lambertini por su trabajo, orientación y apoyo durante todo el desarrollo de esta tesis. A mi asesor, Dr. Juan A. Argüello por sus valiosas contribuciones y consejos.

Al Ing. Carlos Bainotti y su grupo de trabajo de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) de INTA Marcos Juárez por su colaboración y trabajo conjunto en los ensayos a campo. A la Dra. Denise Navia del Embrapa (Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria), Recursos Genéticos y Biotecnología, Brasilia por brindarme la oportunidad para desarrollarme profesionalmente durante mi estadía en Brasil. Al Dr. Douglas Lau, de Embrapa Trigo por hacer posible un excelente trabajo conjunto entre ambos países.

A mi grupo de trabajo y amigas, Fernanda Mattio, Analía Dumón, Evangelina Argüello, Cinthia Conforto y Sandra Mónica Rodríguez por ayudarme, sostenerme y alentarme en todo momento en lo profesional como así también en lo personal, y por estar siempre disponibles durante todo el proyecto de tesis.

A todos mis amigos y compañeros del CIAP por su desinteresada ayuda, aprecio y muy buenos momentos compartidos.

A mi familia, a Galdi, Simón y Mateo, a mi mamá Criss, a mi papá Raúl, a mis hermanos, Emi, Rauli y Gise.

A todos los que de una u otra forma colaboraron y brindaron su apoyo para la realización de este trabajo.

A Galdi, Simón y Mateo

A mis papás, Raúl y Cristina

A mis hermanos, Emilce, Raúl y Gisela

RESÚMEN

El virus del mosaico estriado del trigo (*Wheat streak mosaic virus*, WSMV), transmitido por el ácaro *Aceria tosichella*, es considerado plaga no cuarentenaria reglamentada en Argentina. El objetivo general de esta Tesis fue caracterizar los componentes y su diversidad del patosistema WSMV-*A. tosichella*-trigo necesarios para seleccionar estrategias efectivas de manejo de la enfermedad. Se desarrolló una estrategia para la amplificación del genoma completo de WSMV y su posterior pirosecuenciación. Se obtuvo la secuencia completa de 13 aislamientos provenientes de *Triticum aestivum*, *Avena fatua*, *Digitaria sanguinalis* y de diferentes regiones trigueras. Las estrechas relaciones filogenéticas encontradas entre los aislados argentinos de WSMV, los australianos y los de la región del Pacífico noroeste de Estados Unidos (APNW) sugieren que la presencia del WSMV en nuestro país se podría haber originado a partir de una única introducción desde la región APNW. Además, se realizó la caracterización de la población intra-hospedante mediante la reconstrucción de haplotipos y la búsqueda de polimorfismos de simple nucleótido de los 13 aislamientos. Tres aislamientos se distinguieron por su mayor diversidad y distribución de mutaciones a lo largo de su genoma, y los restantes fueron menos diversos. Se determinó la presencia de *Triticum mosaic virus* completando el complejo WSMV-HPWMoV-TriMV en Argentina. Se detectó solamente el linaje WCM2 de *A. tosichella*, considerado el más invasivo. Se encontraron distintas especies de Eriophyidae en cereales y malezas aledañas a trigo. *Aculodes stipacolus* proveniente de *Stipa* sp. se describió por primera vez para América del Sur. Se identificó *Abacarus hystrix* constituyendo una alerta por su capacidad transmisora de virus que no se encuentran en el país. También, se realizó la evaluación del comportamiento de cultivares de trigos frente a dos complejos WSMV-*A. tosichella* de Argentina. Los cultivares presentaron diferentes niveles de tolerancia dependiendo de la virulencia del aislamiento de WSMV en invernáculo y a campo. Estos resultados contribuyen al establecimiento de estrategias de manejo efectivas para el patosistema WSMV-*A. tosichella*-trigo en Argentina.

Palabras claves: *Wheat streak mosaic virus*, *Triticum mosaic virus*, *Aceria tosichella*, Eriophyidae, evaluación de cultivares de trigo.

ABSTRACT

Wheat streak mosaic virus (WSMV) is transmitted by the mite *Aceria tosichella* and is considered a regulated non-quarantine pest in Argentina. The general aim of this thesis work was to characterize the components and their diversity of the WSMV-*A. tosichella*-wheat pathosystem required to select effective strategies for managing wheat streak mosaic disease. A strategy for the amplification of the whole WSMV genome and further pyrosequencing was developed. The whole sequence of 13 isolates from *Triticum aestivum*, *Avena fatua*, *Digitarias anguinalis* and from different wheat producing areas was obtained. The close phylogenetic relationships found among the WSMV isolates from Argentina, Australia and the American Pacific northwestern (APNW) suggest that the presence of WSMV in Argentina might have originated from a single introduction from the APNW region. Moreover, the intra-host population was characterized by reconstructing haplotypes and searching for single-nucleotide polymorphisms of the 13 isolates. Three isolates were distinguished for their greater diversity and distribution of mutations along the genome, and the rest was less diverse. The presence of *Triticum mosaic virus* was detected as completing the WSMV-HPWMoV-TriMV complex in Argentina. Only the WCM2 lineage of *A. tosichella*, the most invasive one, was detected. Different species of Eriophyidae were found in cereals and weeds adjacent to wheat. *Aculodes stipacolus* from *Stipasp.* is described for the first time for South America. Likewise, *Abacarus hystrix* was identified, which poses a threat due to its capacity of transmitting viruses that are not present in the country. Moreover, the behavior of wheat cultivars against two WSMV-*A. tosichella* complexes from Argentina was evaluated. The cultivars exhibited different levels of tolerance, depending on the viral isolate virulence in greenhouse and in the field. These results contribute to the development of effective management strategies for the WSMV-*A. tosichella*-wheat pathosystem in Argentina.

Key words: *Wheat streak mosaic virus*, *Triticum mosaic virus*, *Aceria tosichella*, Eriophyidae, evaluation of wheat cultivars.

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
BIBLIOGRAFÍA	10
CAPÍTULO 2	18
RELACIONES FILOGENÉTICAS DE DIFERENTES AISLAMIENTOS ARGENTINOS DEL WSMV	18
INTRODUCCIÓN	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Obtención del genoma completo del WSMV de trigo y hospedantes alternativos	19
Análisis de recombinación y filogenéticos	21
RESULTADOS	22
Obtención de genoma completo del WSMV en trigo y hospedantes alternativos de diferentes regiones de Argentina	22
Análisis de recombinación y filogenéticos de la CP del WSMV	24
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	30
CAPÍTULO 3	33
CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN INTRA-HOSPEDANTE DEL <i>WHEAT</i> <i>STREAK MOSAIC VIRUS</i> (WSMV) MEDIANTE ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN MASIVA DE SU GENOMA COMPLETO	33

INTRODUCCIÓN.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
Obtención del genoma completo del WSMV de trigo y hospedantes alternativos	35
Reconstrucción de haplotipos virales de genoma completo del WSMV.....	35
Análisis de Polimorfismos de nucleótido simple (SNP, Single Nucleotide Polymorphisms) del genoma completo del WSMV	36
RESULTADOS	37
Pre-procesamiento de las secuencias (limpieza de datos)	37
Reconstrucción de haplotipos virales del genoma completo del WSMV	39
Análisis de Polimorfismos de nucleótido simple (SNP, Single Nucleotide Polymorphisms)	44
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	55
BIBLIOGRAFÍA	56
CAPÍTULO 4.....	62
DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DEL <i>TRITICUM MOSAIC VIRUS</i> (TRIMV) EN EL CULTIVO DE TRIGO EN ARGENTINA	62
INTRODUCCIÓN.....	62
MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
Material evaluado	64
Transmisión mecánica del TriMV	65
Detección del TriMV mediante técnicas serológicas	66
Detección del TriMV mediante técnicas moleculares.....	67
RESULTADOS	68
DISCUSIÓN.....	72

CONCLUSIONES.....	74
BIBLIOGRAFÍA.....	74
CAPÍTULO 5.....	77
DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE ÁCAROS ERIÓFIDOS EN TRIGO Y CEREALES Y MALEZAS ALEDAÑAS	77
INTRODUCCIÓN.....	77
MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
Determinación de las especies crípticas de <i>Aceria tosichella</i> provenientes de las mismas muestras de trigo utilizadas para caracterizar la diversidad del WSMV (Capítulos 2 y 3).	81
Identificación de especies de eriófidos en cereales y malezas alledañas en la zona de Mar y Sierra de la provincia de Buenos Aires, por su posible rol como puentes verdes	83
Identificación de especie de eriófido en <i>Stipa</i> sp. en la subregión triguera IV, por su posible rol como puente verde.....	84
RESULTADOS	86
Determinación de las especies crípticas de <i>Aceria tosichella</i> provenientes de las mismas muestras de trigo utilizadas para caracterizar la diversidad del WSMV (Capítulos 2 y 3).	86
Identificación de especies de eriófidos en cereales y malezas alledañas en la zona de Mar y Sierra de la provincia de Buenos Aires, por su posible rol como puentes verdes	90
Identificación de especie de eriófido en <i>Stipa</i> sp. en la subregión triguera IV, por su posible rol como puente verde.....	95
DISCUSIÓN.....	102
CONCLUSIONES.....	106
BIBLIOGRAFÍA.....	107
CAPÍTULO 6.....	111

EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE CULTIVARES DE TRIGO FRENTE AL WSMV Y SU VECTOR <i>ACERIA TOSICHELLA</i> EN TRANSMISIONES EXPERIMENTALES CON EL VECTOR		111
INTRODUCCIÓN.....		111
MATERIALES Y MÉTODOS.....		113
Multiplicación de inóculo y del ácaro vector		113
Transmisión del complejo WSMV-A. <i>tosichella</i> bajo condiciones de invernáculo		114
Transmisión del complejo WSMV-A. <i>tosichella</i> bajo condiciones de campo		116
Análisis estadístico		117
RESULTADOS		118
Transmisión del complejo WSMV-A. <i>tosichella</i> bajo condiciones de invernáculo		118
Transmisión del complejo WSMV-A. <i>tosichella</i> bajo condiciones de campo		122
DISCUSIÓN.....		125
BIBLIOGRAFÍA		130
CAPÍTULO 7.....		134
CONCLUSIONES GENERALES.....		134
ANEXO I.....		138
ANEXO II.....		148
Especies de <i>Aculodes</i> asociadas a gramíneas (<i>Poaceae</i>) descritas a nivel mundial utilizadas para realizar la comparación y descripción de la nueva especie		148
PUBLICACIONES.....		157

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Datos de los trece aislamientos de WSMV	20
Tabla 2.2. Iniciadores diseñados para la amplificación del genoma completo de WSMV .	22
Tabla 2.3. Concentraciones, purezas y volúmenes obtenidos de los productos de PCR purificado desde gel de agarosa para cada uno de los 13 aislamientos de WSMV.....	23
Tabla 3.1. Procesado de lecturas obtenidas mediante tecnología 454/Roche para la reconstrucción de haplotipos, correspondientes a 13 aislados de WSMV argentinos.....	37
Tabla 3.2. Número y frecuencia de haplotipos de los 13 aislamientos de WSMV reconstruidos.....	41
Tabla 3.3. Detalles metodológicos, de aplicación y bibliográficos de los diferentes métodos para reconstrucción de haplotipos empleados en este estudio.....	42
Tabla 3.4. (Continuación) Detalles metodológicos, de aplicación y bibliográficos de los diferentes métodos para reconstrucción de haplotipos empleados en este estudio.	43
Tabla 3.5. Procesado de las lecturas obtenidas mediante tecnología 454/Roche para la búsqueda de Polimorfismos de simple nucleótido (SNP, Single Nucleotide Polymorphisms), correspondientes a los 13 aislados de WSMV argentinos secuenciados.	45
Tabla 3.6 Número de haplotipos reconstruidos mediante el método QuasiRecomb y de SNP con frecuencias mayores a 2% encontrados para cada uno de los 13 aislados de WSMV. Los datos de las infecciones mixtas con TriMV y los del linaje de <i>A. tosichella</i> corresponden a los resultados obtenidos en el Capítulo 4 y 5 respectivamente. Se resaltan los tres aislados más diversos (WSMV02, WSMV01 y WSMV03) y el de menor diversidad (WSMV08) detectados mediante análisis de haplotipos y SNP.	46
Tabla 4.1. Iniciadores utilizados para la amplificación de <i>Triticum mosaic virus</i> (TriMV), <i>Wheat streak mosaic virus</i> (WSMV) y un control interno de planta.....	67
Tabla 4.2. Muestras de trigo y Triticale analizadas para <i>Triticum mosaic virus</i> mediante métodos serológicos.	70
Tabla 4.3. Muestras de trigo y Triticale analizadas para <i>Triticum mosaic virus</i> mediante métodos moleculares.	71
Tabla 5.1. Poblaciones de ácaros establecidas a partir de los muestreos dirigidos provenientes de diferentes regiones trigueras argentinas.	86
Tabla 5.2. Detalles de la identificación morfológica y molecular de ácaros recolectados en la zona de Mar y Sierra en la provincia de Buenos Aires, Argentina.....	92

Tabla 5.3. (Continuación) Detalles de la identificación morfológica y molecular de ácaros recolectados en la zona de Mar y Sierra en la provincia de Buenos Aires, Argentina.....	93
Tabla 5.4. (Continuación) Detalles de la identificación morfológica y molecular de ácaros recolectados en la zona de Mar y Sierra en la provincia de Buenos Aires, Argentina.....	94
Tabla 6.1. Aislados de <i>Wheat streak mosaic virus</i> (WSMV) y de <i>A. tosichella</i> utilizados para evaluar cultivares de trigo.....	114
Tabla 6.2. Escala de seis clases según la metodología de Langham (2009) para la evaluación de severidad de síntomas.....	115
Tabla 6.3. Categorización de los cultivares evaluados en función de los inóculos GM-2009 y MJ-2010 en condiciones de invernáculo. Valores de Absorbancia relativa media, significancia de la interacción, según prueba de comparaciones múltiples DGC, y grados de severidad. Los cultivares susceptibles, tolerante y los no infectados fueron resaltados en color rojo, amarillo y verde respectivamente. Se resaltan en color gris los cultivares que se comportaron como tolerantes o no infectados en condiciones de invernadero y campo. .	121
Tabla 6.4. Categorización de los cultivares evaluados según Medias de Absorbancia relativa y grado de severidad en función de dos inóculos diferentes, GM-2009 y MJ-2010 en condiciones de campo. Los cultivares susceptibles, tolerante y los no infectados fueron resaltados en color rojo, amarillo y verde respectivamente.....	124
Tabla 1. Cambios a nivel de nucleótido, aminoácido, codón, su posición en el genoma, efecto en la proteína, la cobertura y la frecuencia para cada SNP detectado en todo el genoma para los 13 aislamientos de WSMV estudiados.....	138
Tabla 2. Descripción de 10 ácaros eriófidios (hembras) recolectados sobre <i>Stipa</i> sp. Las mediciones están presentadas en micrómetros (mm).	153

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1.1. Representación esquemática de la organización del genoma del *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) y las proteínas virales.4
- Fig. 2.1. A: Ubicación geográfica de los 13 aislamientos de WSMV estudiados provenientes de las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos y Córdoba durante el período 2009-2011. B: subregiones trigueras II Norte, II Sur, III, IV, V Norte y V Sur de Argentina.21
- Fig. 2.2. Gel de agarosa al 1,5% con los productos de PCR de aproximadamente 9384 pb correspondientes a la amplificación del genoma completo de los 13 aislamientos de WSMV estudiados.24
- Fig. 2.3. Árbol filogenético Maximum-likelihood (ML) realizado con modelo GTR+I+G construido a partir de 99 secuencias correspondientes a la CP de WSMV. Solo se muestran los valores de bootstrap >500.25
- Fig. 2.4. Árbol filogenético Maximum-likelihood (ML) realizado con modelo Tamura-Nei construido a partir de 13 secuencias correspondientes a la CP de aislamientos argentinos de WSMV. Solo se muestran los valores de bootstrap >500.26
- Fig. 3.1. Distribución del total de lecturas obtenidas para cada uno de los 13 aislamientos de WSMV en función de la posición de nucleótidos correspondiente al genoma completo de referencia utilizado (GenBank FJ348359).38
- Fig. 3.2. Frecuencia de los SNP según su posición en el genoma para los 13 aislados de WSMV. En color negro se presentan las mutaciones sinónimas y en rojo las no-sinónimas.48
- Fig. 3.3. N° total de SNP para cada proteína del WSMV correspondientes a los 13 aislados virales estudiados.49
- Fig. 4.1. Representación esquemática de la organización del genoma del *Triticum mosaic virus* (TriMV) y las proteínas virales.63
- Fig. 4.2. Lote de trigo, cultivar BioINTA 3005, con 100% de incidencia de WSMV en la localidad de Leones, provincia de Córdoba en la campaña 2012.64
- Fig. 5.1. Productos de PCR correspondientes a la amplificación de la región ITS y 16S empleando DNA de ácaros obtenido en forma individual y utilizando grupos de 10 y 25 ácaros.87
- Fig. 5.2. Árbol filogenético obtenido por análisis Neighbour-Joining (NJ) con modelo Maximum Composite Likelihood correspondiente a la región ITS1, realizado con los haplotipos detectados a partir de todas las secuencias generadas en este estudio, incluyendo los géneros *Aceria*, *Abacarus* y *Aculodes*. En color azul y rojo se señalan los linajes

WCM1 (o Type 1) y WCM2 (o Type 2) descritos para *Aceria tosichella* respectivamente, en celeste *Abacarus* y en rosado *Aculodes*. El haplotipo de *A. tosichella* detectado en este estudio está incluido en x41 en JF960148. El número seguido de x significa el número de secuencias utilizadas para el análisis. Se indica con asterisco (*) las secuencias generadas en este estudio.....89

Fig. 5.3. Árbol filogenético obtenido por análisis Neighbour-Joining (NJ) con modelo Tamura-Nei correspondiente a la región 16S, realizado con los haplotipos detectados a partir de todas las secuencias generadas en este estudio, incluyendo los géneros *Aceria*, *Abacarus* y *Aculodes*. En color azul y rojo se señalan los linajes WCM1 (o Type 1) y WCM2 (o Type 2) descritos para *Aceria tosichella* respectivamente, en celeste *Abacarus* y en rosado *Aculodes*. El haplotipo de *A. tosichella* detectado en este estudio está incluido en BRA-TA-36B-3 *A. tosichella* WCM2 x51. El número seguido de x significa el número de secuencias utilizadas para el análisis. Se indica con asterisco (*) las secuencias generadas en este estudio.....90

Fig. 5.4. Diseños esquemáticos de *Aculodes stipacolus* Alemandri and Navia sp. nov. A: vista dorsal completa de hembra. B: vista ventral completa de hembra..... 100

Fig. 5.5. Diseños esquemáticos de *Aculodes stipacolus* Alemandri and Navia sp. nov. (A): región coxigenital de hembra, (B) detalles de microtubérculos en vista lateral, (C) empodio, (D) pata 1, (E) pata 2 (F) vista lateral de hembra. 101

Fig. 5.6. Fotografías digitales de *Aculodes stipacolus* Alemandri and Navia sp. nov. (A) vista dorsal de hembra, (B) vista ventral de hembra, (C) vista lateral de hembra, (D) región coxigenital de macho, (E) vista anterolateral de hembra, (F) empodio, (G) región coxigenital de hembra bajo microscopio DIC, (H) región coxigenital de hembra bajo microscopio de contraste de fase, (I) vista anterolateral con detalles de ornamentación en escudo dorsal. 102

Fig. 6.1. Ensayos de transmisión del complejo WSMV-*A.tosichella* bajo condiciones de campo (A y B) e invernáculo (D y E). Multiplicación de inóculo viral y del ácaro vector bajo condiciones controladas (C y F). 116

Fig. 6.2. Absorbancia relativa de WSMV en función de los dos inóculos GM-2009 y MJ-2010, para cada cultivar evaluado en condiciones de invernáculo. Los números por encima de cada barra representan el porcentaje de plantas infectadas con GM-2009 y MJ-2010 en rojo y azul respectivamente. 119

Fig. 6.3. Absorbancia relativa de WSMV para cada cultivar evaluado en función de dos inóculos diferentes, GM-2009 y MJ-2010, en condiciones de campo. Cultivares con valores de Absorbancia relativa por arriba de 2 son considerados susceptibles. 123

LISTA DE ABREVIATURAS

%	porcentaje
°C	grado centígrado
1a	seta proximal en coxisternum I
1b	seta anterior en coxisternum I
2a	seta proximal en coxisternum II
ADN	ácido desoxirribonucleico
amiRNA	Artificial microRNA (micro RNA artificial)
ANT	Adenine Nucleotide Translocase
APNW	American Pacific Northwest (Región del Pacífico noroeste de Estados Unidos)
Ar	absorbancia relativa
ARN	ácido ribonucleico
ARS	Agricultural Research Service (Servicio de Investigación Agrícola)
barcodes	códigos específicos
BrSMV	<i>Brome streak mosaic virus</i>
BSMV	Barley stripe mosaic virus
bv	ventral basifemoral
BYDV	Barley yellow dwarf virus
BYSMV	Barley yellow striate mosaic virus
cDNA	ácido desoxirribonucleico copia
CIAP	Centro de Investigaciones Agropecuarias
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COI	citocromo c oxidasa subunidad 1
CP	cápside proteica
CYDV	Cereal yellow dwarf virus
d	seta pedipalp dorsal genital
D2	región divergente 2
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas con doble sandwich de anticuerpos)
DGC	Di Rienzo, Guzmán y Casanoves
DIC	microscopía diferencial de contraste de interferencia
DIECA	dietil ditiocarbamato de sodio
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleótidos trifosfato
EEA	Estación Experimental Agropecuaria
EEUU	Estados Unidos
em	empodio tarsal (em)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Investigación Agropecuaria
ep	seta pedipalp coxal
ESALQ	Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'

FAO	Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura).
Fr	frecuencia
ft'	seta del tarso fastigial paraxial
ft''	seta del tarso fastigial antaxial
GM	General de Madariaga
ha	hectárea
HPV	High Plains virus
HPWMoV	High plains wheat mosaic virus
INDEAR	Instituto de Agrobiotecnología de Rosario
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IPAVE	Instituto de Patología Vegetal
ITS	Internal Transcribed Spacer (espaciadores transcritos internos)
l'	seta tibial paraxial
l''	seta antaxial genua
M	molar
m ²	metro cuadrado
min	minutos
miRNA	micro Ribonucleic Acid (micro ácido ribonucleico interferente)
MJ	Marcos Juárez
ML	Maximum Likelihood
mM	minimolar
MN	Macherey-Nagel
MRCV	Mal de Río Cuarto Virus
mtDNA	DNA mitocondrial
nd	no detectado
NGS	Next Generation Sequencing (secuenciación masiva de nucleótidos, de alto rendimiento o de nueva generación)
NJ	Neighbor-Joining
nr	no realizado
ONMV	<i>Oat necrotic mottle virus</i>
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pH	pondus Hydrogenii = potentia Hydrogenii (potencial hidrógeno)
PROSUL	Programa Sul-Americano de Apoio às Atividades de Cooperação
PTGS	silenciamiento génico postranscripcional
R	resistente
rDNA	DNA ribosomal nuclear
RGMV	<i>Ryegrass mosaic virus</i>
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribosomal
RT	transcripción reversa

Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
S	susceptible
SBWMV	Soil borne wheat mosaic virus
sc	seta escapular
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms (polimorfismos de nucleótido simple)
ssRNA	ARN de simple cadena
T	total
TM	transmisión mecánica
TriMV	Triticum mosaic virus
u'	seta del tarso inguinal paraxial
USDA	United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura de Estados Unidos)
WCM	Wheat Curl Mite
WMoV	Wheat mosaic virus
WSMV	Wheat streak mosaic virus
µg	microgramo
µl	microlitro
µm	micrómetro
µM	micromolar

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

El trigo (*Triticum aestivum* L.) fue domesticado hace unos 10.000 años y desde entonces se ha extendido por todo el mundo hasta convertirse en uno de los cultivos más importantes de la humanidad (Dubcovsky y Dvorak, 2007). La superficie de tierra cubierta por trigo es la más grande que cualquier otra cosecha de alimentos. Este cereal proporciona alrededor de una quinta parte de las calorías consumidas por los seres humanos, con una producción estimada de 750 millones de toneladas para 2016/2017 en todo el mundo (USDA, 2017). Su producción es la tercera mayor de los cereales del mundo, después del maíz y el arroz (FAO, 2013). La abundante documentación generada sobre evolución y genética del trigo no se equipara prácticamente con ningún otro cultivo. La plasticidad del genoma de este cereal sobresale como factor clave en su éxito destacándose por su capacidad de adaptación a diversos ambientes (Dubcovsky y Dvorak, 2007). Estudios de relaciones genéticas indican que los primeros trigos cultivados fueron nativos de la región sureste de Turquía (Nesbitt, 1998; Dubcovsky y Dvorak, 2007). En Argentina, el trigo se introdujo a través del Río de la Plata en 1527. La primera siembra del cultivo se realizó en la provincia de Santa Fe y en la década de 1870 se produjo su expansión a colonias agrícolas de Santa Fe, Córdoba, La Pampa y Entre Ríos atrayendo sucesivas oleadas de inmigrantes (Miralles y Gonzalez, 2009). Actualmente, la región triguera argentina se halla localizada en la región pampeana y se divide en siete subregiones ecológicas (Triguera I, II norte, II sur, III, IV, V norte y V sur) de acuerdo a las características locales de clima y suelo. En el presente, el trigo es el cereal de invierno de mayor importancia económica en Argentina, tanto por la superficie sembrada (5,3 millones de ha) como por la producción de granos (13,9 millones de toneladas) (Minagri, 2016).

La producción de trigo es afectada anualmente por diferentes factores limitantes tanto abióticos como bióticos. Entre los primeros, revisten gran importancia el déficit hídrico y nutricional y las temperaturas extremas en el estado crítico del cultivo. En cuanto a los bióticos se destacan las enfermedades de origen fúngico y viral (Nisi *et al.*, 2004;

Truol, 2009). En Argentina, las principales enfermedades de origen fúngico en trigo son la roya de la hoja o roya anaranjada (*Puccinia triticina*), mancha amarilla o mancha parda (*Drechslera tritici repentis*) y septoriosis (*Septoria tritici*) en hojas, y fusariosis en la espiga (*Fusarium graminearum*) (Alberione, 2011; Annone, 2017). Respecto a las enfermedades de origen viral se han reportado hasta el momento nueve virus: *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) (Truol *et al.*, 1990), *Mal de Río Cuarto Virus* (MRCV) (Rodríguez Pardina *et al.*, 1998), *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) (Sagadin y Truol, 2003), *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) (Truol *et al.*, 2004), *Soil borne wheat mosaic virus* (SBWMV) (Truol *et al.*, 2005), *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV) (Sagadin *et al.*, 2006), *High plains wheat mosaic virus* (HPWMoV) (Truol y Sagadin, 2007; Tatineni *et al.*, 2014), *Barley yellow striate mosaic virus* (BYSMV) (Dumón, 2011) y un rhabdovirus relacionado al *Maize yellow striate virus* (Dumón, 2015). Cabe aclarar que HPWMoV anteriormente fue llamado High Plains virus (HPV) (Jensen *et al.*, 1996) o *Wheat mosaic virus* (WMoV) (Skare *et al.*, 2006).

WSMV es la especie tipo del género *Tritimovirus* perteneciente a la familia *Potyviridae* (Stenger *et al.*, 1998). Los Tritimovirus son transmitidos por ácaros eriófidios a hospedantes monocotiledóneas y son filogenéticamente distantes de los *Rymovirus* transmitidos por estos mismos organismos (Salm *et al.*, 1996; Stenger *et al.*, 1998). El WSMV es naturalmente transmitido por el ácaro *Aceria tosichella* Keifer, conocido como ácaro del enrollamiento del trigo (Wheat Curl Mite, WCM) (Slykhuis, 1955). Los dos principales síntomas causados por WSMV en trigo son mosaico y estriado en las hojas (Murray *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 2003). Los síntomas pueden progresar a clorosis, necrosis, enanismo severo, plantas estériles o con producción de semillas marchitas y eventualmente muerte de la planta (Wiese, 1987; Ellis *et al.*, 2003). WSMV fue reportado por primera vez en las Planicies Altas del centro de Estados Unidos en la década de 1920 (McKinney, 1937). WSMV es considerado el agente causal de una de las enfermedades más importantes en el cultivo de trigo a nivel mundial (Conner *et al.*, 1991; Nyitrai, 1991; Jiang *et al.*, 1993; Makkouk y Kumari, 1997). En EEUU, se registraron pérdidas debido a WSMV de 464 dólares/ha y, en ciertos casos, daños totales (Edwards *et al.*, 1988; Velandia *et al.*, 2010). Dichas pérdidas resultaron mayores en trigos con riego ya que se ha

demostrado una menor eficiencia en el uso del agua cuando las plantas están infectadas con WSMV (Price *et al.*, 2010). Del mismo modo, en Australia, WSMV ha producido pérdidas de rendimiento de hasta 100% en algunos campos de trigo, con estimaciones de más de 5 millones de dólares en pérdidas anuales (Murray *et al.* 2013). Aunque esta virosis ha sido motivo de preocupación para productores de cereales y estudiado por investigadores durante al menos seis décadas, sigue representando un desafío en términos de medidas de control (Navia *et al.*, 2013). Este virus, se encuentra ampliamente distribuido en las regiones productoras de trigo de América del Norte (Slykhius y Bell, 1963; Brakke, 1987; al Sánchez-Sánchez *et al.*, 2001), Eurasia (Reshetnik *et al.*, 1996; Nyitrai y Gaborjanyi, 1998; Makkouk y Kumasi, 1997), África (Kapooria y Ndunguru, 2004), Oceanía (Ellis *et al.*, 2003; Lebas *et al.*, 2009) y América del Sur (Truol *et al.*, 2004; Mar *et al.*, 2013). Actualmene, el WSMV es una virosis emergente en Australia y Sudamérica representando una nueva amenaza para la producción de cereales (Navia *et al.*, 2013).

En nuestro país, el WSMV causal del mosaico estriado del trigo se detectó por primera vez en el 2002 en el área central de la provincia de Córdoba (Marcos Juárez y Jesús María) (Truol *et al.*, 2004). Después de esta primera detección, el virus fue considerado plaga no cuarentenaria reglamentada, según Resolución 248/2003 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA, 2003). La presencia del WSMV fue reportada en las siguientes provincias: Salta, Tucumán, Santiago del Estero, Córdoba, Entre Ríos, Santa Fe, Buenos Aires y La Pampa (Sagadín y Truol, 2005, 2007; Truol *et al.*, 2008; Truol, 2009). Fueron registrados altos porcentajes de incidencia, prevalencia y grados de severidad por WSMV en nuestro país. En 2007, se reportó una importante epifitía del WSMV en el sudeste de la provincia de Buenos Aires, principal región productora de trigo del país, con porcentajes de hasta un 100% de incidencia y pérdidas totales en varios lotes analizados (Truol, 2009). En 2012, se observaron condiciones similares de severidad y pérdidas de producción en la región triguera de Córdoba, con lotes enteramente afectados y no cosechados (Alemandri *et al.*, 2014). Asimismo, WSMV es una enfermedad de importancia en el marco de las exportaciones debido a la certificación de libre infección requerida al poseer transmisión por semilla

(SENASA, 2003; Jones *et al.*, 2005; Lanoiselet *et al.*, 2008; Sagadin *et al.*, 2008). El principal cultivo afectado por WSMV es trigo, aunque también infecta a cebada, avena, triticale y maíz (Brakke, 1971). En Argentina, además de trigo, este virus se ha detectado en otras gramíneas cultivadas o espontáneas, tales como *Avena sativa* L., *Hordeum vulgare*, *Zea mays*, *Setaria italica*, *Digitaria sanguinalis* L., *Echinochloa crusgalli* L., *Panicum* sp, *Brachiaria* sp., *Gramma* sp, *Cynodon dactylon* L. y *Sorghum halepense* L. (Sagadin y Truol, 2008; Truol, 2009; Truol *et al.*, 2010). Esto último indicaría la presencia del vector en dichos hospedantes en nuestro país.

En cuanto a las características del genoma del WSMV, está constituido por un segmento de ssRNA sentido positivo de aproximadamente 9384 nucleótidos, el cual es traducido como una única poliproteína (Choi *et al.*, 2000; 2002). De su procesamiento (P1, HC-Pro and NIa) se derivan hasta 9 proteínas maduras (P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa, NIB, y CP) (Choi *et al.*, 2000; 2002; Stenger *et al.*, 2006). En la Fig. 1.1 se muestra la representación esquemática de la organización del genoma WSMV. Estudios previos han indicado que la mayoría de las proteínas de los *Potyvirus* son multifuncionales (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Se destacan por su función las siguientes proteínas: HC-Pro en transmisión por eriófidos (Stenger *et al.*, 2005), P1 en la actividad supresora del mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) (Stenger *et al.*, 2007) y P3 en replicación y movimiento (Choi *et al.*, 2005).



Fig. 1.1. Representación esquemática de la organización del genoma del *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) y las proteínas virales.

En 2004, fue identificado el ácaro vector, *A. tosichella* en Argentina, recolectándolo mediante un método de lavado de plantas de trigo con síntomas característicos de WSMV (Navia *et al.*, 2006). Luego fue detectado en Brasil (Pereira *et al.*, 2009) y Uruguay (Castiglioni y Navia, 2010). En la actualidad, *A. tosichella* está presente en Europa (Oldfield y Proeseler, 1996), América del Norte (Oldfield y Proeseler, 1996; Hoffmann y

Lopez-Campos, 2000; Amrine, 2003), África (Meyer, 1981), Asia (Oldfield, 1970), Oriente Medio (Oldfield, 1970; Makkouk y Kumasi, 1997; Denizhan *et al.*, 2010), Oceanía (Halliday y Knihinicki, 2004) y América el Sur. Este eriófido se encuentra principalmente en trigo, pero puede desarrollarse en otros cereales como el maíz, avena, cebada, centeno y mijo. *A. tosichella* se encontró en cerca de 120 especies hospedantes de la familia *Poaceae* (Jeppson *et al.*, 1975; Amrine, 2003). WCM puede sobrevivir durante al menos 3 meses a temperaturas cercanas a cero, incluyendo varios días alrededor de -18°C (Townsend y Johnson, 1996). Además, este ácaro tiene la capacidad de persistir tanto en áreas semiáridas como templadas, con una distribución limitada por calor y estrés por sequía (Schiffer *et al.*, 2009). Los daños causados por *A. tosichella* incluyen decoloración, enrollado y desarrollo anormal de hojas y retraso en el crecimiento de las plantas. Dicho retraso se produce debido a que las hojas infestadas no se expanden normalmente, permaneciendo dentro de hojas más viejas arqueando la planta (Oldfield, 1970; Jeppson *et al.*, 1975; Makkouk y Kumari, 1997). Las pérdidas de rendimiento en cultivos de trigo debido a altas infestaciones de WCM pueden alcanzar el 30% (Harvey *et al.*, 2002).

Además de transmitir WSMV, *A. tosichella* también es vector de HPWMOV (Seifers *et al.*, 1997). Generalmente, el WSMV y HPWMOV se encuentran en infecciones mixtas en trigo (Mahmood *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 1996; Seifers *et al.*, 2002; Skare *et al.*, 2006). Debido a esto, se refiere comúnmente a esta problemática como el complejo de virus transmitidos por *A. tosichella*. Se ha demostrado que WCM es transmisor de un nuevo virus que infecta trigo en Estados Unidos perteneciente a la familia *Potiviridae*, denominado *Triticum mosaic virus* (TriMV) (Siefers *et al.*, 2008). El TriMV se encuentra en infecciones mixtas con el WSMV con reportes de 91% de muestras coinfectadas (Byamukama *et al.*, 2013). Se ha demostrado que estos dos virus exhiben sinergismo cuando coinfectan trigo produciendo un aumento en los títulos de ambos virus, una mayor expresión de síntomas y consecuentemente un aumento en la pérdida de rendimiento (Tatineni *et al.*, 2010; Byamukama *et al.*, 2014). En Argentina, hasta el momento, no se ha investigado TriMV.

Actualmente, los ácaros eriófidos se convirtieron en organismos de importancia económica en la agricultura no solo por su rol como vectores de virosis sino también como plagas directas y especies invasoras (Lindquist *et al.*, 1996; Navia *et al.*, 2010). *A. tosichella* pertenece a la superfamilia Eriophyoidea para la cual han sido descritas 4000 especies (Amrine, 2003), aunque se estima que sólo el 1,6-8% de la fauna existente de eriófidos se han descubierto (Amrine *et al.*, 2003). Su pequeño tamaño, su simplicidad estructural y el número limitado de rasgos de identificación dificultan su determinación taxonómica (Lindquist *et al.*, 1996). Resulta necesaria la identificación precisa de estos ácaros eriófidos para poder implementar estrategias de control y mitigación de los mismo así como completar su sistemática. En Argentina, son escasas las investigaciones relacionadas a la identificación de ácaros eriófidos en gramíneas. Entre otras causas, debido a la falta de profesionales expertos en esta temática en el país.

Por otra parte, estudios sobre resistencia de trigo a ácaros y la capacidad de éstos para transmitir virus evidenciaron la existencia de diferentes poblaciones de *A. tosichella*. Harvey y col. (1995; 1999) observaron que diferentes poblaciones de WCM (de Kansas, Nebraska, Montana, Alberta, South Dakota y Texas) variaron en el grado de virulencia frente a diferentes fuentes de resistencia en trigo, clasificando las poblaciones en tres biotipos. Estudios posteriores realizados por Malik y col. (2003) mostraron diferentes respuestas de estos tres biotipos de ácaros a numerosas líneas de *Aegilops tauschii* (especie importante en estudios de genética del trigo). También, se ha demostrado que diferentes cepas de *A. tosichella* variaron en su capacidad para transmitir WSMV y HPWMoV (Seifers *et al.*, 2002). Harvey y col. (2001) sugirieron que diferentes cepas de WCM pueden variar en su capacidad para sobrevivir en diferentes hospedantes.

En los últimos años, el rápido desarrollo de marcadores moleculares basados en DNA permitió contar con herramientas eficaces para la identificación de especies de animales. Existen marcadores mitocondriales y nucleares desarrollados para identificar ácaros eriófidos (Hebert *et al.*, 2003; Sonnenberg *et al.*, 2007) (Carew *et al.*, 2004; Skoracka y Dabert, 2009). Carew y col. (2009) utilizaron el gen mitocondrial 16S rRNA y dos marcadores nucleares (Internal Transcribed Spacer 1 = ITS1 y Adenine Nucleotide

Translocase = ANT) para estudiar poblaciones de *A. tosichella*. Estos investigadores mostraron que WCM provenientes de trigo y otros hospedantes en Australia se componen de, al menos, dos linajes separados que pueden representar diferentes especies estrechamente relacionadas debido a la falta de evidencia de intercambio genético entre ellos. Investigaciones posteriores apoyan el concepto de que WCM es un complejo de especies (Skoracka *et al.*, 2012, Miller *et al.*, 2013) indicando que los ácaros recolectados en trigo se dividen en dos linajes genéticos distintos. Estos resultados son consistentes con los estudios genéticos conducidos en Australia y Estados Unidos (Carew *et al.*, 2009; Seifers *et al.*, 2002). En Argentina, se han caracterizado sólo algunas poblaciones de *A. tosichella* recolectadas desde trigo, indicando que están presentes los dos linajes descritos anteriormente (Skoracka *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2013). Resulta imprescindible conocer la variabilidad de *A. tosichella* en diferentes regiones trigueras de nuestro país, ya que la existencia de especies crípticas conlleva significativas implicancias en el establecimiento de medidas de control eficientes (Bickford *et al.*, 2007).

El manejo del patosistema WSMV-*A. tosichella* se halla enfocado principalmente en la prevención con el uso de medidas como prácticas culturales y utilización de materiales resistentes o tolerantes al virus y/o al ácaro (Wegulo *et al.*, 2008; McMullen y Waldstein, 2010). Para reducir el potencial de propagación del virus se busca interrumpir el ciclo de vida de *A. tosichella* destruyendo plantas de cereales voluntarias y malezas hospedantes que actúan como puentes verdes (Navia *et al.*; 2013). El cultivo de maíz juega un papel importante proporcionando un hospedante alternativo para el virus y el vector desde la cosecha del trigo hasta la emergencia del mismo en la próxima campaña. En Argentina, se ha desarrollado germoplasma de trigo con resistencia al WSMV y al ácaro vector mediante selección asistida por marcadores moleculares (Bainotti *et al.*, 2013). Resulta necesario evaluar dichos materiales con nuestros aislamientos de WSMV y especies de *A. tosichella*. Por otra parte, se conoce que las poblaciones de virus de plantas son genéticamente heterogéneas (García Arenal *et al.*, 2003). El análisis de la estructura genética y evolución de poblaciones son de gran interés para el desarrollo de estrategias de control eficiente y estable ya que a menudo éstas fallan debido a la evolución de las poblaciones de los patógenos superando fuentes de resistencia utilizadas. Este aspecto cobra importancia para

WSMV ya que una de las principales estrategias de manejo de la enfermedad, como se mencionó anteriormente, es el mejoramiento de la capacidad del hospedante para tolerar o resistir a la infección viral (Fahim *et al.*, 2012).

El WSMV se identificó primero en Argentina (2002) y luego en Brasil (2013), por lo que resulta interesante comparar el comportamiento de este patosistema entre ambos países. Del mismo modo, el vector *A. tosicHELLa* también fue registrado en los dos países, (2004 en Argentina y 2006 en Brasil). Sin embargo, en Brasil no ocurrieron epidemias severas por WSMV y los niveles de población de *A. tosicHELLa* en condiciones de campo fueron bajos. Surge el interrogante si la diferencia de cultivares y hospedantes son responsable de esa falta de epidemias en dicho país. En este contexto, Argentina y Brasil comenzaron a trabajar en forma conjunta desde 2006 en el marco de tres proyectos internacionales referidos a este complejo de virus transmitidos por eriófidos (Proyecto Internacional PROSUL-CNPQ, 2006-2009; Proyecto CNPq/MAPA 2008-2010; Proyecto de Cooperación Internacional Bilateral Argentina-Brasil INTA-EMBRAPA, 2010-2014). Cabe mencionar que los objetivos de la presente Tesis formaron parte de dichos proyectos.

En Argentina, el comportamiento del patosistema WSMV-*A. tosicHELLa*-trigo plantea interrogantes acerca de los factores que ocasionan su incidencia, prevalencia y severidad en nuestro país. Qué ácaros eriófidos se encuentran presentes en nuestros cultivos?, cuál es la diferencia genética de los aislamientos de WSMV y su diversidad?, existen otras especies de virus involucradas en la enfermedad que podrían explicar su severidad?, cómo es el comportamiento de los cultivares de trigo frente al complejo WSMV-*A. tosicHELLa* que utilizan nuestros productores?. El conocimiento de las poblaciones de patógenos, sus vectores, hospedantes y la interacción entre ellos resulta de importancia para el establecimiento de estrategias de manejo efectivas para este patosistema en uno de los cultivos más importantes de nuestro país.

Por lo antes expuesto, se proponen en este trabajo las siguientes hipótesis y objetivos.

HIPÓTESIS

I - WSMV posee diversidad intra-hospedante en trigo.

II - La enfermedad del mosaico estriado está ocasionada por la presencia de un complejo viral en Argentina.

III - El vector *A. tosichella* se halla incluido en un complejo de especies crípticas en Argentina.

IV - Los cultivares de trigo tienen diferente nivel de tolerancia frente a diferentes aislamientos de WSMV en transmisiones experimentales con el vector *A. tosichella*.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los componentes y su diversidad del patosistema WSMV-*A. tosichella*-trigo necesarios para seleccionar estrategias efectivas de manejo de la enfermedad del mosaico estriado del trigo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Establecer las relaciones filogenéticas de diferentes aislamientos argentinos del WSMV.

-Caracterizar la diversidad genética intra-hospedante del WSMV mediante análisis de secuenciación masiva del genoma completo.

-Identificar la presencia del *Triticum mosaic virus* (TriMV) transmitido también por *A. tosichella* en el cultivo de trigo en Argentina.

-Determinar las especies de ácaros eriófidos presentes en el agroecosistema productivo de trigo.

-Evaluar el comportamiento de cultivares de trigo frente al complejo WSMV-A. *tosichella* en transmisiones experimentales con el vector.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberione E.J. 2011. Principales enfermedades foliares en trigo. Publicado en Internet, disponible en <http://inta.gob.ar/documentos/principales-enfermedades-foliares-en-trigo>. Activo Febrero 2017.
- Alemandri V., Dumón A., Rodríguez M.S., Argüello E., Mattio F. y Truol, G. 2014. Monitoreo e incidencia de virus transmitidos por *Aceria tosichella* KEIFER. En: Jornadas de Cierre del Proyecto de Cooperación Internacional INTA-EMBRAPA. 6, 7 y 8 de Octubre de 2014, Córdoba, Argentina. p. 46-37.
- Amrine J.W.Jr, Stasny T.A.H. and Flechtmann, C.H.W. 2003. Revised Keys to the World Genera of the Eriophyoidea (Acari: Prostigmata). (Indira Publishing House: West Bloomfield, MI). 244 pp.
- Amrine J.W.Jr. 2003. Catalog of the Eriophyoidea. A working catalog of the Eriophyoidea of the world. Publicado en Internet, disponible en <http://insects.tamu.edu/research/collection/hallan/acari/eriphyidae>. Activo Marzo 2011.
- Annone J.G. 2017. Las enfermedades foliares y de la espiga de trigo de más frecuente ocurrencia: importancia relativa, patrones epidémicos y estrategias para su manejo. EEA INTA Pergamino. Publicado en Internet, disponible en <http://www.agrositio.com/vertext/vertext.php?id=20014&se=19>. Activo Julio 2017.
- Bainotti C., Formica B., Helguera M., Vanzetti L., Fraschina J., Salines J., Alberione E., Gómez D., Donaire G., Pontaroli A.C., Alemandri V. y Truol G. 2013. Mejoramiento de trigo para resistencia al *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) y High plains virus (HPV). Desarrollo y evaluación de germoplasma argentino y brasileño en infecciones naturales y artificiales. En: Workshop: Cooperação Internacional Embrapa/INTA. 17 e 18 de setembro de 2013, Passo Fundo, Brasil. Livro de Resumos. p.11-14.
- Bickford D., D.J. Lohman, N. S. Sodhi, P.K.L. Ng, R. Meier, K. Winker, K.K. Ingram and I. Das. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 22: 148-155.
- Brakke M.K. 1971. *Wheat streak mosaic virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 48. Assoc. 4 pp.
- Brakke M.K. 1987. Virus disease in wheat. In: Heyne EG (ed) *Wheat and wheat improvement*, 2nd edn. ASA-CSSA-SSSA, Madison. pp 585-603.

- Byamukama E., Seifers D.L., Hein G.L., De Wolf E., Tisserat N.A., Langham M.A.C., Osborne L.E., Timmerman A. and Wegulo S.N. 2013. Occurrence and distribution of *Triticum mosaic virus* in the central Great Plains. *Plant Dis.* 97: 21-29.
- Byamukama E., Wegulo S.N., Tatineni S., Hein G.L., Graybosch R.A., Baenziger P.S. and French R. 2014. Quantification of yield loss caused by *Triticum mosaic virus* and *Wheat streak mosaic virus* in winter wheat under field conditions. *Plant Dis.* 98(1): 127-133.
- Carew M. Schiffer M., Umina P., Weeks A. and Hoffmann, A. 2009. Molecular markers indicate that the wheat curl mite, *Aceria tosichella* Keifer, may represent a species complex in Australia. *Bull. Entomol. Res.* 99(5): 479-86.
- Carew M.E., Goodisman M.A.D. and Hoffmann A.A. 2004. Species status and population genetic structure of grapevine eriophyoid mites. *Entomol. Exp. Appl.* 111:87-96.
- Castiglioni E. and Navia D. 2010. Presence of the Wheat Curl Mite, *Aceria tosichella* Keifer (Prostigmata: Eriophyidae), in Uruguay. *Agrociencia* 14:19-26.
- Choi I.R., Stenger D.C., Morris T.J. and French R. 2000. A plant virus vector for systemic expression of foreign genes in cereals. *Plant J.* 23: 547-55.
- Choi I.R., Hall J.S., Henry M., Zhang L. and Hein G.L. 2001. Contributions of genetic drift and negative selection on the evolution of three strains of *wheat streak mosaic* tritimovirus. *Arch. Virol.* 146: 619–28.
- Choi I.R., Horken K.M., Stenger D.C. and French R. 2002. Mapping of the P1 proteinase cleavage site in the polyprotein of *Wheat streak mosaic virus* (genus Tritimovirus). *J. Gen. Virol.* 83: 443-50.
- Choi I.R., Horken K.M., Stenger D.C. and French R.C. 2005. An internal RNA element in the *Wheat streak mosaic virus* P3 cistron revealed by synonymous mutations that affect both movement and replication. *J. Gen. Virol.* 86:2605-2614.
- Conner R.L., Thomas J.B. and Whelan E.D.P. 1991. Comparison of mite resistance for control of wheat streak mosaic *Crop Science.* *Crop Sci.* 31: 315-318.
- Denizhan E., Szydło W., Diduszko D. and Skoracka A. 2010. Preliminary study on eriophyoid mites (Acari: Eriophyidae) infesting grasses in Turkey. En: Moraes GJ, Castillo RC, Flechtman CH (eds). En: XIII International Congress of Acarology. Recife, p.70.
- Dubcovsky J. and Dvorak J. 2007. Genome plasticity: a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science* 316: 1862-1866.
- Dumón A.D., Mattio M.F., Argüello Caro E.B., Alemandri V.M., Puyané N., del Vas M., López Lambertini P. y Truol G. 2015. Occurrence of a closely-related isolate to *Maize yellow striate virus* in wheat plants. *Agriscientia* 32 (2): 107-112.
- Dumón A.D., Argüello-Caro E.B., Alemandri V.M., Bainotti C., Mattio M.F., Rodríguez S.M., del Vas M. y Truol G. 2011. Identificación y caracterización biológica del *Barley yellow striate mosaic virus* (BYSMV): Nueva enfermedad del trigo en Argentina. *Trop. Plant Pathol.* 36:374-382.
- Edwards M. C. and McMullen M. P. 1988. Variation in tolerance to *wheat streak mosaic virus* among cultivars of hard red spring wheat. *Plant Dis.* 72: 705-707.
- Ellis M.H., Rebetzke G.J. and Chu P. 2003. First report of *wheat streak mosaic virus* in Australia. *Plant Pathol.* 52: 808.

- Fahim M., Millar A.A., Wood C.C. and Larkin P.J. 2012. Resistance to *Wheat streak mosaic virus* generated by expression of an artificial polycistronic microRNA in wheat. *Plant Biotechnol J.* 10(2): 150-63.
- FAO, 2013. Food and Agricultural Organization. Statistical Yearbook 2013. World Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, 2013. Publicado en Internet, disponible en <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF>. Activo Febrero 2017.
- García-Arenal F., Fraile A. and Malpica J.M. 2003. Variation and evolution of plant virus populations. *Int. Microbiol.* 6: 225-232.
- García-Arenal F., Fraile A. and Malpica J.M. 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 157-186.
- Halliday R.B. and Knihinicki D.K. 2004. The occurrence of *Aceria tulipae* (Keifer) and *Aceria tosichella* Keifer in Australia (Acari: Eriophyidae). *Int. J. Acarol.* 30: 113-118.
- Harvey T.L., Martin T.J., Seifers D.L. and Sloderbeck P.E. 1995. Adaptation of wheat curl mite (Acari: Eriophyidae) to resistant wheat in Kansas. *J. Agric. Entomol.* 12: 119-125.
- Harvey T.L., Seifers D.L. and Martin T.J. 2001. Host range differences between two strains of wheat curl mites (Acari: Eriophyidae). *J. Agric. Urban. Entomol.* 18: 35-41.
- Harvey T.L., Seifers D.L., Martin T.J., Brown-Guedira F.L. and Gill B.S. 1999. Survival of wheat curl mites on different sources of resistance in wheat. *Crop Sci.* 39: 1887-1889.
- Hebert P.D.N., Ratnasingham S. and de Waard J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *P. Roy. Soc. London. B Bio.* 270: S96-S99.
- Hoffmann A. y Lopez-Campos G. 2000. Biodiversidad de los Ácaros en México. Fideicomiso Fondo para la Biodiversidad, Coyoacan, México.
- Jensen S.G., Lane L.C. and Seifers D.L. 1996. A new disease of maize and wheat in the high plains. *Plant Dis.* 80: 1387-1390.
- Jeppson L.R., Keifer H.H. and Baker E.W. 1975. Mites injurious to economic plants. University of California Press, Los Angeles. 644 pp.
- Jiang J., Friebe B., Dhaliwal H.S., Martin T.J. and Gill B.S. 1993. Molecular cytogenetic analysis of agropyron-elongatum chromatic in wheat germplasm specifying resistance to *wheat streak mosaic virus*. *Theor. Appl. Genet.* 86: 41-48.
- Jones R.A.C., Coutts B.A., Mackie A.E., Dwyer G.I. 2005. Seed transmission of *Wheat streak mosaic virus* shown unequivocally in wheat. *Plant Dis.* 89: 1048-1050.
- Kapooria R.G. and Ndunguru J. 2004. Occurrence of viruses in irrigated wheat in Zambia. *Bull OEPP/EPPO* 34: 413-419.
- Lanoiselet V.M., Hind-Lanoiselet T.L. and Murray G.M. 2008. Studies on the seed transmission of *Wheat streak mosaic virus*. *Australas Plant Path.* 37: 584-588.
- Lebas B.S.M., Ochoa-Corona F.M., Alexander B.J.R., Lister R.A., Fletcher J.D.F., Bithel S.L.I. and Burnip G.M. 2009. First report of *Wheat streak mosaic virus* on wheat in New Zealand. *Plant Dis.* 93: 430.

- Lindquist E.E., Sabelis M.W. and Bruin, J. 1996. Eriophyoid Mites –Their Biology, Natural Enemies and Control. (Elsevier Science Publishers: Amsterdam).790 pp.
- Mahmood T., Hein G.L. and Jensen S.G. 1998. Mixed infection of hard red winter wheat with High Plains virus and *Wheat streak mosaic virus* from wheat curl mites in Nebraska. *Plant Dis.* 82: 311-315.
- Makkouk K. and Kumari S. 1997. Natural occurrence of *wheat streak mosaic virus* on wheat in Syria. *Rachis* 16: 74-76.
- Malik R, Smith C.M, Brown-Guedira G.L, Harvey T.L. and Gill B.S. 2003. Assessment of *Aegilops tauschii* for resistance to biotypes of wheat curl mite (Acari: Eriophyidae). *J Econ. Entomol.* 96(4): 1329-1333.
- Mar T.B., Lau D., Schons J., Pereira P.R.V. da S. and Carminatti A.J. 2013. Identification and characterization of *Wheat Streak Mosaic Virus* isolates in wheat-growing areas in Brazil. *Int. J. Agron.* (Article ID 983414).
- McKinney H.H. 1937. Mosaic diseases of wheat and related cereals. *US Dep. Agric.Circ.* 442: 1–23.
- McKinney H.H. 1956. Interference and synergy—their possible use in identifying certain mosaic viruses of cereals and indicating degrees of relationship. *Plant Dis. Report.* 40: 898–903.
- McMullen M. and Waldstein D. 2010. *Wheat streak mosaic*. *Plant Disease Management*, NDSU Extension Service. PP-646. Publicado en Internet, disponible en <https://www.ag.ndsu.edu/pubs/plantsci/smgrains/pp646.pdf>. Activo Noviembre 2016.
- McNeil J.E., French R., Hein G.L., Baenziger P.S. and Eskridge K.M. 1996. Characterization of genetic variability among natural populations of *wheat streak mosaic virus*. *Phytopathology* 86: 1222–27.
- Meyer M.K.P. 1981. Mite pests of crops in southern Africa. *Sci. Bull. Dep. Agric. Fish. Rep. S. Afr.* 397: 1-92.
- Miller A.D., Skoracka A., Navia D., Santos de Mendonca R., Szydło W., Schultz M.B., Smith C.M., Truol G. and Hoffmann A.A. 2013. Phylogenetic analyses reveal extensive cryptic speciation and host specialization in an economically important mite taxon. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66: 928-940.
- Minagri, 2016. Ministerio de agroindustria. Dirección de información agropecuaria y forestal. Estimaciones agrícolas. Informe semanal al 31 de marzo de 2016. Publicado en Internet, disponible en <http://www.minagri.gob.ar/new/0-0/programas/dma/granos/Informe-semanal-cultivos.pdf>. Activo Febrero 2017.
- Mirales D.J y Gonzales, F. 2009. El trigo en Argentina: Perspectivas del pasado, presente y futuro para aumentar el rendimiento. En: XVII Congreso AAPRESID, 19 de Agosto, Rosario, Santa Fe. Publicado en Internet, disponible en http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=02662&inst=yes&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=730839. Activo Febrero 2017.
- Montana J.R., Hunger R.M. and Sherwood J.L. 1996. Serological characterization of *wheat streak mosaic virus* isolates. *Plant Dis.* 80: 1239–44.
- Murray DA, Clarke MB and Ronning DA, 2013. Estimating invertebrate pest losses in six major Australian grain crops. *Aust. J. Entomol.* 52: 227–241.

- Murray T.D., Parry D.W. and Cattlin N.D. 1998. A Colour Handbook of Diseases of Small Grain Cereal Crops. London, UK: Manson Publishing.
- Navia D., Ochoa R., Welbourn C. and Ferragut, F. 2010. Adventive eriophyoid mites: a global review of their impact, pathways, prevention and challenges. *Exp. Appl. Acarol.* 51: 225-255. doi:10.1007/s10493-009-9327-2.
- Navia D., Truol G., Mendonça R.S. and Sagadín M. 2006. *Aceria tosichella* Keifer (Acari: Eriophyidae) from *Wheat streak mosaic virus*-infected wheat plants in Argentina. *Int. J. Acarol.* 32:189-193.
- Navia D., de Mendonca R. S., Skorachka A., Knihinicki D., Hein G. L., Pereira P. R. V., Lau D. and Truol G. 2013. Wheat curl mite, *Aceria tosichella*, and transmitted viruses: An expanding pest complex affecting cereal crops. *Exp. Appl. Acarol.* 59: 95-143.
- Nesbitt M. 1998. Where was einkorn wheat domesticated? *Trends in Plant Science* 3: 1360–1385.
- Nisi J., Bainotti C., Frascina J., Formica B. y Salines J. 2004. Programa de Mejoramiento de Trigo del INTA: Avances en la Calidad del Trigo Argentino. *IDIA XXI* (6): 29-33.
- Nyitrai A. 1991. Investigation on the damage caused by *wheat streak mosaic virus*. *Novenytermeles* 40: 21-26.
- Nyitrai A. and Gaborjanyi R. 1998. Wheat streak mosaic a new virus disease for Hungary. *Cereal Res. Commun.* 16: 261-263.
- Oldfield G.N. 1970. Mite transmission of plant viruses. *Ann. Rev. Entomol.* 15: 343-380.
- Oldfield G.N. and Proeseler G. 1996. Eriophyoid mites as vectors of plant pathogens. En: Lindquist EE, Sabelis MW, Bruin J (eds) *Eriophyoid mites - their biology, natural enemies and control*, Elsevier Science BV, Amsterdam, pp. 259-273.
- Pereira P.R.V.S., Navia D., Salvadori J.R. and Lau D. 2009. Occurrence of *Aceria tosichella* in Brazil. *Pesq. Agropec. Brasil.* 44: 539-542.
- Price J., Workneh, F., Evett, S., Jones, D., Arthur, J., and Rush, C. 2010. Effects of *Wheat streak mosaic virus* on root development and water-use efficiency of hard red winter wheat. *Plant Dis.* 94:766-770.
- Rabenstein F., Seifers D.L, Schubert J., French R. and Stenger D.C. 2002. Phylogenetic relationships, strain diversity, and biogeography of tritimoviruses. *J. Gen. Virol.* 83: 895-906.
- Reshetnik G.V., Mishchenko L.T., Kolesnik L.V. and Boiko L. 1996. Detection of *wheat streak mosaic virus* in some regions of the Ukraine. *Mikrobiolohichniy Z* 58: 39-45.
- Rodríguez Pardina P.E., Giménez Pecci M.P., Laguna I.G., Dagoberto E. y Truol G.A. 1998. Wheat: A new natural host for the Mal de Río Cuarto virus in the endemic disease area, Río Cuarto, Córdoba Province, Argentina. *Plant Dis.* 82(2): 149-152.
- Sagadin M. y Truol G. 2005. Determinación de la incidencia y severidad de aislamientos Argentinos del *Wheat streak mosaic virus* (WSMV). *Fitopatología* 40(2): 84.
- Sagadin M. y Truol G. 2007. Maíz como reservorio del *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) que afecta al trigo en Argentina. 2007. *Fitopatol. Brasil.* 32: 249.

- Sagadin M. y Truol G. 2008. Detección de malezas y especies cultivadas de crecimiento espontáneo reservorios del *Wheat streak mosaic virus* (WSMV). En: 1er Congreso Argentino de Fitopatología. Córdoba, p. 272.
- Sagadin M., Rodríguez S. y Truol G. 2008 Transmisión por semillas de *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) en infecciones naturales y experimentales. Resúmenes y Resumen expandido en CD. VII Congreso Nacional de Trigo, V Simposio Nacional de Cereales de Siembra Otoño. Invernal. I Encuentro de MERCOSUR, 2,3 y 4 de julio del 2008, La Pampa, Argentina.
- Sagadin M. y Truol G. 2003. Caracterización Sintomatológica del *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) aislamiento Marcos Juárez en transmisiones experimentales de trigo. *Fitopatol. Bras.* (28): 394-395.
- Sagadin M., Alemandri V. y Truol G. 2006. Detección del *Cereal yellow dwarf virus-RPV* (CYDV-RPV) en el cultivo de trigo. *Fitopatología Brasileira* (31): 148.
- Salm S.N., Rey M.E.C. and Rybicki E.P. 1996. Phylogenetic justification for splitting the *Rymovirus* genus of the taxonomic family Potyviridae. *Arch. Virol.* 141: 2237-2242.
- Sánchez-Sánchez H., Henry M., Cárdenas-Soriano E. and Alvizo-Villasana H. 2001. Identification of *Wheat streak mosaic virus* and its vector *Aceria tosichella* Keifer in Mexico. *Plant Dis.* 85: 13-17.
- Seifers D.L., Harvey T.L., Louie R., Gordon D.T. and Martin T.J. 2002. Differential transmission of isolates of the High Plains virus by different sources of wheat curl mites. *Plant Dis.* 86: 138-142.
- Seifers D.L., Harvey T.L., Martin J. and Jensen S.G. 1997. Identification of the wheat curl mite as the vector of the High Plains virus of corn and wheat. *Plant Dis.* 81: 1161-1166.
- Seifers D.L., Martin T.J., Harvey T.L., Fellers J.P., Stack J.P., Ryba-White M., Haber S., Krokhin O., Spicer V., Lovat N., Yamchuk A. and Standing K.G. 2008. *Triticum mosaic virus*: A new virus isolated from wheat in Kansas. *Plant Dis.* 92: 808-817.
- SENASA, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. 2003. Sanidad Vegetal. Resolución 248/2003. Boletín Oficial de la Republica Argentina N° 30.274, 1ª Sección. p. 14. Versión electrónica del Boletín Oficial Publicado en Internet, disponible en <https://www.boletinoficial.gob.ar/#!DetalleNormaBusquedaAvanzada/7257650/20031111>. Activo Julio 2017.
- Skare J.M., Wijkamp I., Denham I., Rezende J.A.M., Kitajima E.W., Park J.W., Desvoyes B., Rush C.M., Michels G., Scholthof K.B.G. and Scholthof H.B. 2006. A new eriophyid mite-borne membrane enveloped virus-like complex isolated from plants. *Virology* 347: 343-353
- Skoracka A. and Dabert M. 2009. The cereal rust mite *Abacarus hystrix* (Acari: Eriophyoidea) is a complex of species: evidence from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Bull. Entomol. Res.* 100: 263-272.
- Skoracka A., Kuczynski L., Santos de Mendonca R., Dabert M., Szydło W., Knihinicki D., Truol G. and Navia D. 2012. Cryptic species within the wheat curl mite *Aceria tosichella* (Keifer) (Acari: Eriophyoidea), revealed by mitochondrial, nuclear and morphometric data. *Invertebr. Syst.* 26: 417-433.

- Slykhuis J.T. 1955. *Aceria tulipae* Keifer (Acarina, Eriophyidae) in relation to the spread of wheat streak mosaic. *Phytopathology* 45: 116-128.
- Slykhuis J.T. and Bell W. 1963. New evidence on the distribution of *wheat streak mosaic virus* and relation of isolates from Romania, Jordan, and Canada. *Phytopathology* 53:236-237.
- Sonnenberg R., Nolte A.W. and Tautz D. 2007. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Front Zool.* 4: 6.
- Stenger D.C., Hall J.S., Choi I.R. and French R. 1998. Phylogenetic relationships within the family Potyviridae: *Wheat streak mosaic virus* and *Brome streak mosaic virus* are not members of the genus *Rymovirus*. *Phytopathology* 88: 782-787.
- Stenger D.C., Hein G.L. and French R. 2006. Nested deletion analysis of *Wheat streak mosaic virus* HC-Pro: mapping of domains affecting polyprotein processing and eriophyid mite transmission. *Virology* 350: 465-474.
- Stenger D.C., Hein G.L., Gildow F.E., Horken K.M. and French R. 2005. Plant virus HC-Pro is a determinant of eriophyid mite transmission. *J. Virol.* 79: 9054-9061.
- Stenger D.C., Seifers D.L. and French R. 2002. Patterns of polymorphism in *Wheat streak mosaic virus*: sequence space explored by a clade of closely related viral genotypes rivals that between the most divergent strains. *Virology* 302: 58-70.
- Stenger D.C., Young B.A., Qu F., Morris T. and French R.C. 2007. *Wheat streak mosaic virus* P1, not HC-Pro, facilitates disease synergism and suppression of post-transcriptional gene silencing. *Phytopathology* 97: S111.
- Tatineni S., Graybosch R.A., Hein G.L., Wegulo S.N. and French R. 2010. Wheat cultivar-specific disease synergism and alteration of virus accumulation during co-infection with *Wheat streak mosaic virus* and *Triticum mosaic virus*. *Phytopathology* 100(3): 230-238.
- Tatineni S., McMechan A.J., Wosula E.N., Wegulo S.N., Graybosch R.A., French R., Hein G.L. 2014. An eriophyid mite-transmitted plant virus contains eight genomic RNA segments with unusual heterogeneity in the nucleocapsid protein. *J. Virol.* 88: 11834-11845.
- Truol G. 2009. Enfermedades virales asociadas al cultivo de trigo en Argentina: reconocimiento, importancia, formas de transmisión y manejo. Editora G. Truol. Biglia Impresores. pp. 77.
- Truol G., French R., Sagadín M. and Arneodo J. 2004. First report of *Wheat streak mosaic virus* infecting wheat in Argentina. *Australas. Plant Path.* 33(2): 137-138.
- Truol G., Sagadín M., Cassol A. y Mattio M.F. 2005. Presencia de *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV) en trigo de Argentina. En: XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos, 19-22 de abril de 2005. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. p. 612, VET-32.
- Truol G., Sagadín M. and Rodriguez M. 2010. Fox tail millet (*Setaria italica* L.): a new reservoir species of the *wheat streak mosaic virus* (WSMV) in the province of Buenos Aires. *Biocell* 34: A135
- Truol G., Sagadín M., Melchiorre G., Alemandri V. y Izaurralde J. 2008. Determinación de la presencia de *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) en el cultivo de trigo y de áreas de riesgo de la enfermedad en la Argentina. En: 1er Congreso Argentino de Fitopatología. Córdoba, Argentina. p: 288.

- Truol G. y Sagadin, M. 2007. Primera mención de la presencia de High Plains virus transmitido por *Aceria tosichella* Keifer (Acarina. Popstigmata) en trigos de Argentina. *Fitopatologia Brasileira* (Suplemento) 32: 249.
- Truol G.A., Laguna I.G., Laguzzi S.M. y Rodriguez Pardina P.E. 1990. Detección de las diferentes variantes del *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) (PAV, MAV, SGV, RPV y RMV) en distintas áreas de la República Argentina. En: II Congreso Nacional de Trigo. Vol. IV. Pg. 88-96.
- Urcuqui-Inchima S., Haenni A.-L. and Bernardi F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res.* 74: 157-175.
- USDA, 2017. United States Department of Agriculture. World Agricultural Supply and Demand Estimates. WASDE – 562. S. Publicado en Internet, disponible en <https://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>. Activo Febrero 2017.
- van Dijk E.L., Auger H., Jaszczyszyn Y. and Thermes C. 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 30(9): 418-26.
- Velandia M., Rejesus R.M., Jones D.C., Price J.A., Workneh F. and Rush C.M. 2010. Economic impact of *Wheat streak mosaic virus* in the Texas High Plains. *Crop Prot.* 29: 699-703.
- Wegulo S.N., Hein G.L., Klein R.N. French R.C. 2008. Managing *Wheat streak mosaic*. University of Nebraska, Extension. EC1871. Publicado en Internet, disponible en <http://extensionpublications.unl.edu/assets/pdf/ec1871.pdf>. Activo Noviembre 2016.
- Wiese M.V. 1987. *Compendium of Wheat Diseases*, 2nd ed. APS, St. Paul, MN 80-81 pp.

CAPÍTULO 2

RELACIONES FILOGENÉTICAS DE DIFERENTES AISLAMIENTOS ARGENTINOS DEL WSMV

INTRODUCCIÓN

Wheat streak mosaic virus (WSMV) posee un genoma simple cadena en sentido positivo de 9384 nucleótidos, cuya partícula viral es filamentosa y flexuosa (Stenger *et al.*, 1998). WSMV pertenece a la familia *Potyviridae*. Originalmente WSMV fue clasificado en el género *Rymovirus*, el cual incluía a especies con genomas monopartitos, que infectan a monocotiledóneas y son transmitidos por eriófidos, con *Ryegrass mosaic virus* (RGMV) designado como especie tipo (Zagula *et al.*, 1992; Van Regenmortel *et al.*, 2000). Mediante estudios filogenéticos se reveló que determinados virus transmitidos mediante ácaros eriófidos constituían un grupo parafilético dentro de la familia *Potyviridae* (Salm *et al.*, 1996; Stenger *et al.*, 1998), por lo que WSMV y *Brome streak mosaic virus* (BrSMV) fueron removidos de *Rymovirus* y colocados en el nuevo género *Tritimovirus*, con WSMV designado como especie tipo (Stenger *et al.*, 1998; Mayo, 1999). La familia *Potyviridae* está dividida en ocho géneros, cuyos criterios taxonómicos se basan en rango de hospedantes, características genómicas y filogenia. El criterio de demarcación de especies se basa en un valor <76% de identidad de nucleótidos y <83% de identidad de amino ácidos para el marco de lectura largo o sus productos génicos. Si no se cuenta con el marco de lectura largo completo, criterios similares se utilizan para la región que codifica la cápside proteica y su producto (Wylie *et al.*, 2017).

El trabajo de Stenger y col. (2002) sobre filogenia de la secuencia de la cápside proteica de 49 aislamientos de WSMV, más los reportados hasta ese momento en la base de datos del GenBank, determinó cuatro clados o grupos monofiléticos diferentes para WSMV denominados A, B, C y D. El Clado A agrupa el aislado El Batán, originario de México; el Clado B aislados originarios de Europa y Russia; el Clado C de Iran; y el Clado

D contiene aislados de EEUU, Canadá, Turquía, Argentina y Australia. (Stenger *et al.*, 2002; Rabenstein *et al.*, 2002; Stenger y French 2009).

El objetivo del presente capítulo fue establecer las relaciones filogenéticas entre las secuencias nucleotídicas del gen que codifica para la cápside proteica de 13 aislados argentinos de WSMV provenientes de diferentes hospedantes y origen geográfico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del genoma completo del WSMV de trigo y hospedantes alternativos

A partir de muestreos dirigidos, correspondientes a otros estudios, se seleccionaron 10 muestras de hojas infectadas con WSMV y con alta concentración viral, pertenecientes a distintas regiones productoras de trigo y los hospedantes alternativos, *Digitaria sanguinalis*, *Avena fatua* y Triticale, para la amplificación del genoma del WSMV. Los muestreos se realizaron en la provincia de Buenos Aires, Entre Ríos y Córdoba durante el período 2009-2011 incluyendo las principales subregiones trigueras: II Sur, III, IV, V Norte y V Sur. Las muestras con síntomas característicos del virus se analizaron mediante DAS-ELISA con antisueros específicos para WSMV (Agdia) para confirmar su infección, las cuales se almacenaron a -80°C para su posterior análisis. En la Tabla 2.1 y Fig. 2.1 se detallan los datos de los aislamientos estudiados. Se realizó la extracción de RNA total de planta empleando un kit comercial Macherey-Nagel (MN). Se diseñaron iniciadores para la amplificación del genoma completo de WSMV a partir de secuencias disponibles en GenBank utilizando el software Geneious versión 4.8.3. Se ajustaron las condiciones de reacción de RT-PCR, cuyos parámetros optimizados fueron: concentración de magnesio (1.6, 1.8 y 2 mM); iniciadores (0.05, 0.1 y 0.2 µM), enzima (1 y 2 µl) y cDNA (1 y 2 µl); la temperatura de hibridación de los iniciadores (55, 57, 60, 63 y 64°C) y número de ciclos de la reacción (25, 30 y 35). Luego, se amplificó el genoma completo de los 13 aislamientos de WSMV seleccionados mediante RT-PCR optimizado. Se probaron tres kits de extracción de DNA desde gel: GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE

Healthcare) kit, Real Biotech Corp (RBC) HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit y QIAEX II® Gel Extraction Kit. El producto de PCR de cada aislamiento se corrió en un gel de agarosa 1% y la banda obtenida de aproximadamente 9384 pb se purificó del gel de agarosa con el kit seleccionado (GFX PCR DNA and Gel Band Purification, GE Healthcare). Se realizó una PCR con iniciadores específicos para WSMV a partir de los productos amplificados de 9384 pb para confirmar la identidad del genoma de WSMV. Por último, se secuenció mediante la tecnología 454/Roche GS FLX (INDEAR) cada genoma completo de los 13 aislamientos de WSMV amplificados. Los datos de secuenciación del genoma completo se utilizarán para la concreción de este capítulo y subsiguiente.

Tabla 2.1. Datos de los trece aislamientos de WSMV

Aislamiento	Año	Provincia	Localidad	Hospedante	Cultivar
WSMV01	2009	Buenos Aires	25 de Mayo	Trigo	Baguette 19
WSMV02	2009	Buenos Aires	Energía	Trigo	Baguette 10
WSMV03	2009	Entre Ríos	Paraná	Trigo	BioINTA 1007
WSMV04	2009	Córdoba	Manfredi	Trigo	nd
WSMV05	2009	Buenos Aires	Bordenave	Trigo	nd
WSMV06	2009	Córdoba	Marcos Juárez	<i>Digitaria sanguinalis</i>	-
WSMV07	2009	Buenos Aires	Tandil	Trigo	Baguette 11
WSMV08	2009	Buenos Aires	General Madariaga	Trigo	Baguette 31
WSMV09	2009	Córdoba	Salguero	Trigo	Baguette 13
WSMV10	2010	Buenos Aires	Necochea	Trigo	Baguette 9
WSMV11	2010	Buenos Aires	Necochea	<i>Avena fatua</i>	-
WSMV12	2011	Córdoba	Las Perdices	Triticale	-
WSMV13	2010	Córdoba	Marcos Juárez	Trigo	nd

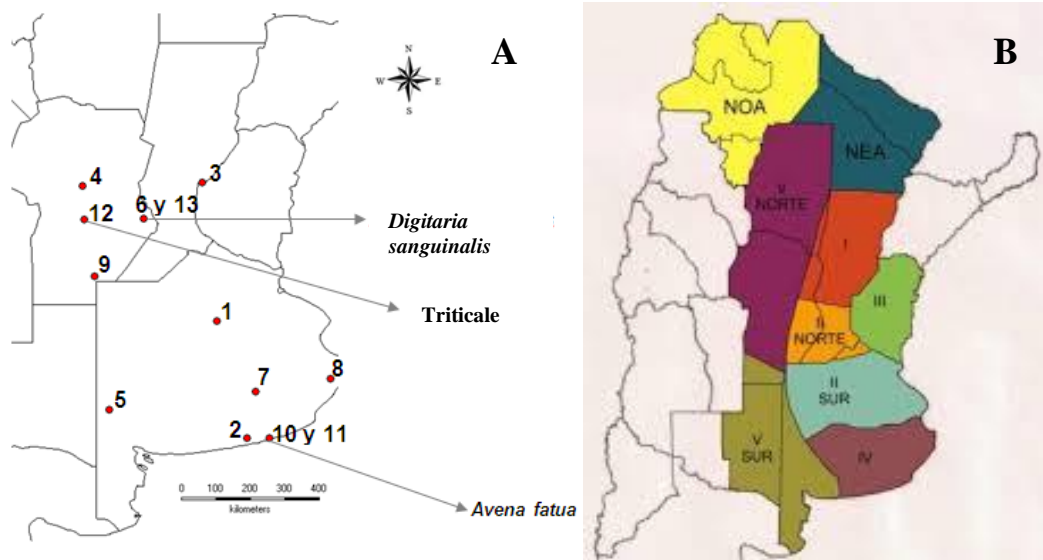


Fig. 2.1. A: Ubicación geográfica de los 13 aislamientos de WSMV estudiados provenientes de las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos y Córdoba durante el período 2009-2011. B: subregiones trigueras II Norte, II Sur, III, IV, V Norte y V Sur de Argentina.

Análisis de recombinación y filogenéticos

El análisis filogenético se realizó con un fragmento de 1047 pb correspondiente a la cápside proteica (CP), debido a que es la proteína con mayor cantidad de secuencias depositadas en el GenBank y es la que se utiliza para discriminar especies en potyvirus. A partir de las secuencias consenso de los genomas completos de los 13 aislamientos se cortaron las secuencias correspondientes de CP y se alinearon con 86 secuencias correspondientes a la CP de WSMV disponibles en GenBank. Se alinearon todas las secuencias de la CP empleando Muscle (Multiple Sequence Comparison, Edgar, 2004). La secuencia de *Oat necrotic mottle virus* (ONMV), con número de acceso NC_005136, fue utilizada como outgroup. Se realizó un análisis filogenético en red para examinar evidencia de recombinación utilizando el programa SplitsTree4 (Huson y Bryant 2006). Se realizó el análisis filogenético con los algoritmos de Maximum Likelihood (ML) y Neighbor-Joining (NJ) empleando PhyML y MEGA 5.05 respectivamente. Para seleccionar el modelo más adecuado se empleó jModelTest. Se utilizó el modelo GTR + I + G para ML y Tamura-Nei para NJ. Del mismo modo, se realizaron los análisis filogenéticos utilizando solo las 13

secuencias argentinas generadas en este trabajo. La confiabilidad de cada nodo en la topología de los árboles obtenida por máxima verosimilitud se evaluó por re-muestreo mediante *bootstrap* no paramétrico con 1000 réplicas. Los árboles se visualizaron con FigTree v1.3.1 y MEGA 5.05.

RESULTADOS

Obtención de genoma completo del WSMV en trigo y hospedantes alternativos de diferentes regiones de Argentina

Se detallan en la Tabla 2.2 las secuencias de los iniciadores diseñados para la amplificación del genoma completo de WSMV. Los mismos hibridaran en los extremos del genoma por fuera de la región codificante de la poliproteína de WSMV.

Tabla 2.2. Iniciadores diseñados para la amplificación del genoma completo de WSMV

Nombre Iniciador	Secuencia
WSMV 3'	ACCAACCCMAATCGATCTGACAACG
WSMV 5'	GCGTCGCCCTAACCCACACA

A continuación, se detalla el protocolo optimizado resultante de probar todas las condiciones descritas en materiales y métodos. Se prepararon dos mezclas de reacción de RT para obtener un volumen final de 20 µl. La primer mezcla consistió de 1 µg de RNA total, 1 µl de mezcla de dNTP (10 mM), 0.4 µl del iniciador WSMV 5' (10 µM) y cantidad suficiente de agua para lograr un volumen de 12 µl. Se calentó la mezcla a 65°C durante 5 min e incubó en hielo por lo menos 1 min. Se agregó la segunda mezcla de reacción que consistió en: 4 µl de 5x First-strand buffer, 1 µl de DTT (0.1 M), 1 µl de RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor (40 units/µl) y 2 µl de SuperScript III RT 400 units/µl. Se incubó a 55°C por 60 minutos y a 70°C por 15 minutos. Se removió el RNA complementario al cDNA agregando 1µl RNaseH de *E. coli* (2 units). Se incubó a 37°C durante 20 min. Para la reacción de PCR se realizó la siguiente mezcla: 1 µl de cDNA, 5

μl de Buffer High fidelity PCR 10X, 1 μl de mezcla de dNTPs (10 mM), 2 μl de SO₄Mg (50 mM), 0.5μl de iniciador WSMV 3' (5 μM), 0.5μl de iniciador WSMV 5' (5 μM), 39.8 μl de agua y 0.2 μl de la enzima Platinum Taq High Fidelity. Las condiciones del ciclado fueron: 30 segundos a 94°C, 25 ciclos de 15 segundos a 94°C, 10 segundos a 63°C y 10 minutos a 68°C, y finalmente 10 minutos a 68°C.

Se logró amplificar los genomas completos de los 13 aislamientos de WSMV utilizando los iniciadores diseñados y las condiciones seleccionadas para RT-PCR. Se purificaron los productos de PCR de cada aislamiento desde gel (Fig. 2.2), con el kit seleccionado (GFX PCR DNA and Gel Band Purification, GE Healthcare), el cual se optó por lograr concentraciones superiores a 1000 ng, requeridas para la secuenciación mediante la tecnología 454/Roche GS FLX (INDEAR). En la Tabla 2.3 se detallan las concentraciones y purezas obtenidas para cada producto de PCR purificado desde gel.

Tabla 2.3. Concentraciones, purezas y volúmenes obtenidos de los productos de PCR purificado desde gel de agarosa para cada uno de los 13 aislamientos de WSMV.

Aislamiento	ng/ml	ml	ng	260/280
WSMV01	55,46	44	2440,2	1,86
WSMV02	39,79	44	1750,8	1,8
WSMV03	48,36	44	2127,8	1,82
WSMV04	24,44	44	1075,4	1,74
WSMV05	21,25	76	1615,0	1,82
WSMV06	30,1	44	1324,4	1,65
WSMV07	30,16	44	1327,0	1,9
WSMV08	30,86	44	1357,8	1,85
WSMV09	27,81	44	1223,6	1,85
WSMV10	27,55	44	1212,2	1,76
WSMV11	25,83	44	1136,5	1,74
WSMV12	57,42	44	2526,5	1,85
WSMV13	46,71	44	2055,2	1,93

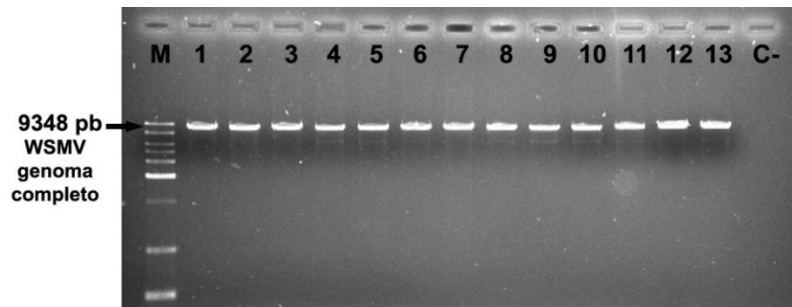


Fig. 2.2. Gel de agarosa al 1,5% con los productos de PCR de aproximadamente 9384 pb correspondientes a la amplificación del genoma completo de los 13 aislamientos de WSMV estudiados.

Análisis de recombinación y filogenéticos de la CP del WSMV

Detectar si hubo recombinación es fundamental para el análisis filogenético. La ausencia de dicho evento es una condición para este estudio. Aquí, no se observó conflictos en el árbol de red no enraizado construido con el programa SplitsTree4. Asimismo, el test phi arrojó un valor de $p = 0.1298$, demostrando que no hay evidencia estadísticamente significativa de recombinación entre las secuencias estudiadas.

Las 13 secuencias de la CP de los aislamientos argentinos de WSMV de diferentes regiones trigueras y hospedantes agruparon en el clado denominado D en el árbol filogenético de ML. Además, los aislamientos argentinos compartieron un ancestro común reciente con los aislamientos de Australia y con los aislamientos ID96 (Idaho), MON96 (Montana), WA99 y WA94 de Washington de la región del Pacífico noroeste de Estados Unidos (APNW). Ningún aislado argentino se agrupó con los aislados de Europa Central, México y Rusia (Fig. 2.3). La topología general de los árboles filogenéticos inferidos por Maximum-Likelihood y Neighbor-Joining resultó similar.

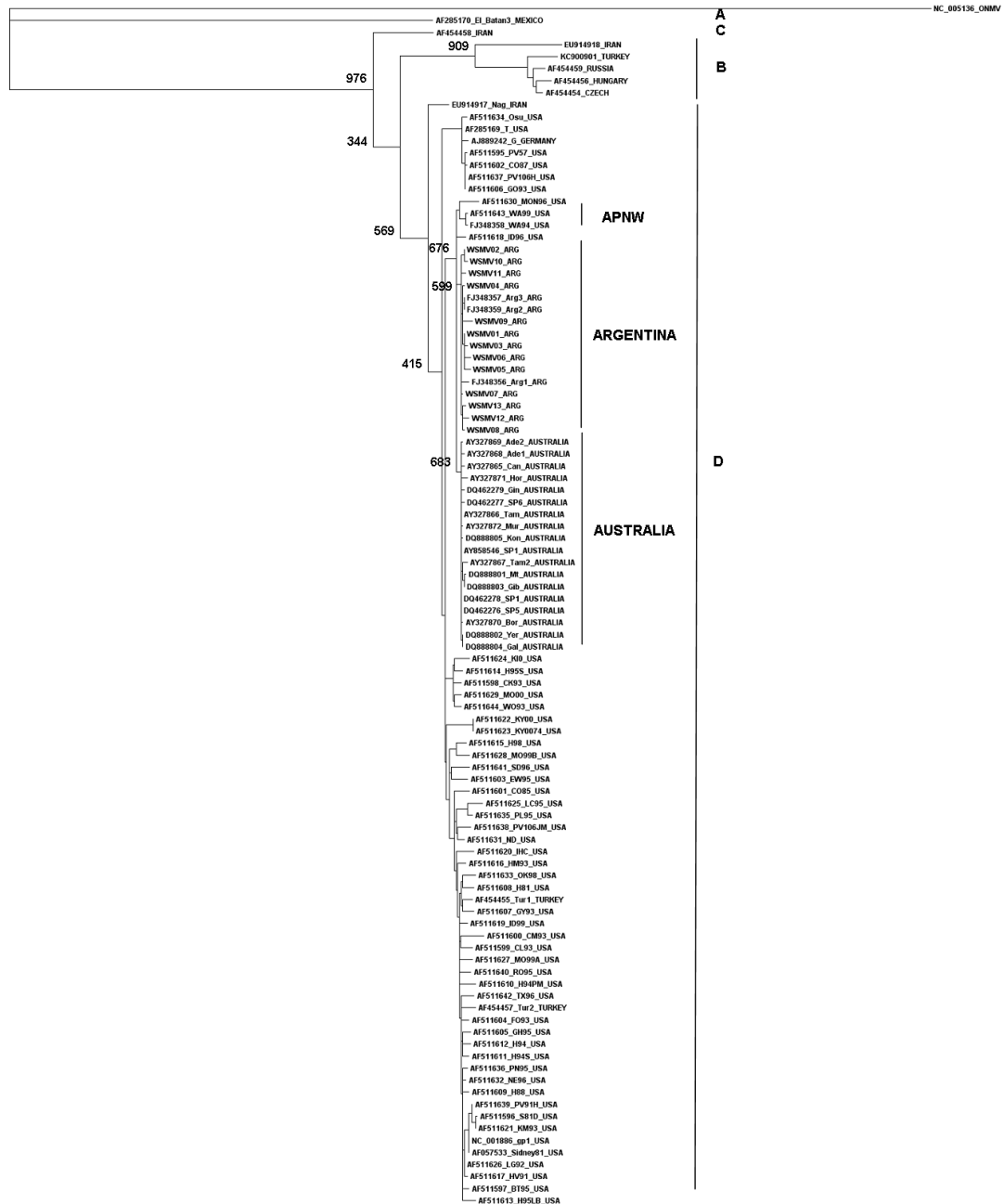


Fig. 2.3. Árbol filogenético Maximum-likelihood (ML) realizado con modelo GTR+I+G construido a partir de 99 secuencias correspondientes a la CP de WSMV. Solo se muestran los valores de bootstrap >500.

El árbol realizado sólo con las secuencias de la CP del WSMV generadas en este trabajo para analizar relaciones filogenéticas entre ellos, mostró que los aislamientos de WSMV provenientes de trigo y recolectados de la Región triguera IV y V Norte están más

relacionados entre sí que con los del grupo correspondientes a los aislamientos de la región II Sur, III y V Sur de la Argentina. No se observó que los aislamientos del WSMV se agruparan de acuerdo a la región geográfica, ni por hospedante (Fig. 2.4).

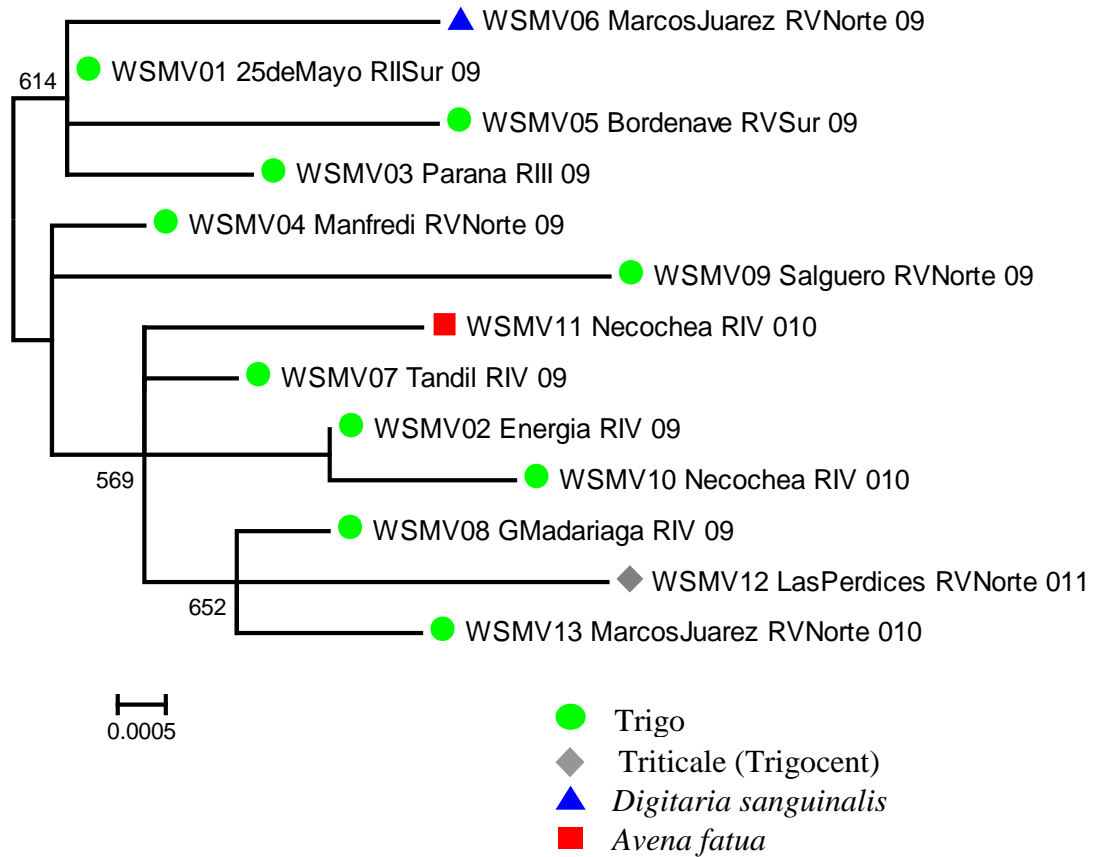


Fig. 2.4. Árbol filogenético Maximum-likelihood (ML) realizado con modelo Tamura-Nei construido a partir de 13 secuencias correspondientes a la CP de aislamientos argentinos de WSMV. Solo se muestran los valores de bootstrap >500.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos y presentados en este capítulo permitieron establecer las relaciones filogenéticas entre las secuencias nucleotídicas del gen que codifica para la cápside proteica de los 13 aislados argentinos de WSMV estudiados, provenientes de diferentes hospedante y abarcando una amplia región geográfica de Argentina, y de la totalidad de secuencias de aislados provenientes de otros países descriptas a nivel mundial.

Las estrechas relaciones filogenéticas de la totalidad de los aislados argentinos de WSMV, sugieren que la presencia de esta virosis en nuestro país se originó a partir de una única introducción del virus, cuya fuente aparentemente sería la región del Pacífico noroeste de Estados Unidos (APNW). Los aislados argentinos conformaron, junto con los aislados australianos, un grupo monofilético denominado Clado D. Los resultados obtenidos aquí concuerdan con los encontrados en el trabajo de Stenger y French (2009), basado en análisis filogenéticos de varios aislados de WSMV detectados en el mundo, el cual involucró a un solo aislado argentino, proveniente de trigo del área central del país, específicamente de Marcos Juárez en la provincia de Córdoba. Ese trabajo determinó que ese aislado argentino de WSMV está estrechamente relacionado a aislados del APNW de Estados Unidos y Australia.

Este escenario, descrito para los aislados de WSMV argentinos, es similar al documentado en Australia. El trabajo de Dwyer y col. (2007) muestra, mediante análisis de secuencias de la CP, que 17 aislados australianos de WSMV están estrechamente relacionados entre sí, así como también agrupados todos en el Clado D, junto a los aislados de la región del APNW. También, se postula que la introducción del WSMV en Australia fue a partir de una única introducción desde APNW. La enfermedad fue comunicada formalmente y declarada de interés en ambos países en forma simultánea en los años 2002 y 2003 (Ellis *et al.*, 2003; Truol *et al.*, 2004). Mientras que en la región APNW, el WSMV Clado D se halla presente desde 1994, 8 años antes de la detección de WSMV en Australia y Argentina (Stenger y French, 2009). Se sugirió que esta invasión recientemente del mismo linaje de WSMV en Argentina y Australia, dos continentes separados, se debió a una introducción desde una misma fuente desde los EEUU. Posiblemente, dicha introducción ocurrió mediante semilla infectada con WSMV por ambos países. Además, se postula que el Clado D del WSMV podría poseer un mayor porcentaje de transmisión por semilla que otros linajes (Stenger y French, 2009). Tanto en Australia, como en Argentina se determinaron porcentajes de transmisión de WSMV por semilla de hasta 1,5% (Jones *et al.*, 2005; Sagadin *et al.*, 2008). Estos porcentajes son mayores al 0,1% reportado por Hill y col. (1974), aunque éste fue detectado en maíz y cuestionado dado que el virus se detectó solamente en una plántula y no se controló la presencia de ácaros (Jones *et al.*, 2005). Por

lo expuesto anteriormente, no se podría concluir que un mayor porcentaje de transmisión por semilla del Clado D fue el responsable de las epidemias en Argentina y Australia. Sin embargo, Dwyer y col. (2007) concluyeron que el brote de WSMV en Australia se debe a una única introducción, desde la región APNW de EEUU, la cual sería mediante semillas de trigo importadas. Éstas habrían pasado los sistemas de cuarentena donde fueron multiplicadas y que posteriormente el virus fue dispersado a largas distancias en todo el continente australiano a través de los centros de mejoramiento de trigo, responsabilizando a la red de distribución de semillas. Halliday (2004) sugirió que la posterior propagación de WSMV dentro de Australia habría ocurrido tanto por transmisión a través de semilla, como por el ácaro vector.

Por otra parte, el agrupamiento de dos aislados de Turquía (Tur1_TURKEY y Tur2_TURKEY) con aislados de EEUU. en el mismo Clado D (Fig. 2.3) soporta que la introducción de WSMV en América del Norte fuera desde Turquía. La misma habría sido favorecida mediante un importante intercambio de germoplasma durante el siglo pasado, debido a la popularidad de ciertas variedades de trigo originarias de la región del Mar Negro (Rabenstein y col. 2002). Durante la década de 1880, se habría incentivado el cultivo de trigo en Dakota del Sur, Nebraska y Kansas influenciada por los inmigrantes desde Crimea (Reitz y Heyne, 1944; Ross, 1969).

Al igual que ocurrió en Argentina, Australia y EEUU, en Europa también se menciona la introducción de WSMV a partir de un único foco. Se mostró que 17 aislados provenientes de diferentes países de Europa (República Checa, Eslovaquia, Francia, Italia y Turquía), presentaron limitada variación de secuencias, y se agruparon en un grupo monofilético bien definido (Gadiou *et al.*, 2009). Dicho grupo, denominado WSMV- ΔE , se caracteriza por una delección de 3 nucleótidos, dando como resultado la falta del codón Gly₂₇₆₁ dentro de la región de la CP. Estos autores mostraron que el grupo WSMV- ΔE se encuentra ampliamente disperso por todo el continente europeo, y que la estrecha relación de sus aislados implica un único ancestro común. Así mismo, mencionan que la ocurrencia del mismo genotipo en todo el continente europeo sugiere un medio eficaz de dispersión, probablemente a través de traslado de material infectado con WSMV, y una posterior

diseminación mediante el ácaro vector. En este estudio no se incorporaron todas las secuencias estudiadas por Gadiou y col. (2009), debido a que varias de ellas son más cortas y no comprenden la CP completa, criterio que se utilizó al momento de seleccionar las secuencias obtenidas desde la base de datos, y que corresponde a los criterios taxonómicos propuestos para los potyvirus. Además, se menciona que la secuencia AJ889242, obtenida desde la base de datos referida como proveniente de Alemania de 2007 y utilizada en el análisis filogenético, sería la cepa pv57 de WSMV de EEUU (Chen *et al.*, 2001; Gadiou *et al.*, 2009). Schuber y col. (2015) demostraron que recién en 2013 fue detectado WSMV en Alemania. Asimismo, no se incluyeron las secuencias de WSMV obtenidas en Brasil, debido a que éstas no se encontraban disponibles en las bases de datos al momento de realizar el estudio. Sin embargo, Mar y col. (2013) demostraron que todos los aislados brasileros también están estrechamente relacionados entre sí, y que igualmente se agruparon en el Clado D, junto con los aislados de APNW, Australia, y Argentina. Estos autores sugieren que el virus ingresó a su país desde una fuente común y/o directamente mediante el ácaro vector desde Argentina.

Por otra parte, a pesar de que en nuestro análisis en red no demostró evidencia de recombinación entre las secuencias de la CP utilizadas hay antecedentes de recombinación en WSMV (Robinson y Murray, 2013).

Las descripciones presentadas en esta discusión, respecto a la introducción y dispersión de WSMV en varios países, manifiestan la importancia de la transmisión por semilla de WSMV. Se menciona el intercambio de semillas entre programas de mejoramiento como práctica común en todo el mundo. Además, es importante considerar el riesgo de introducir, mediante la semilla, formas más virulentas del virus en áreas donde WSMV ya esté presente (Navia *et al.*, 2013). Cabe aclarar que, Coutts y col. (2014) encontraron que la transmisión por semilla de WSMV fue solo en trigo, y no en cinco gramíneas estudiadas en Australia, lo cual no favorecía la dispersión de esta virosis. Además, Lanoiselet y col. (2008), manifestaron que no se correlaciona dicha transmisión con el tamaño de la semilla, alertando al productor que, aunque éstas presenten un tamaño normal, podrían estar infectadas. Si bien, los porcentajes de transmisión por semilla de

WSMV parecieran bajos, éstos logran proporcionar una importante fuente de dispersión del virus. Por ejemplo, si se considera un porcentaje de transmisión por semillas de 0,1% y una densidad de 100 plantas de trigo/m², significaría un potencial de 1000 plántulas infectadas con WSMV por hectárea distribuidas al azar en todo el cultivo (Coutt *et al.*, 2014).

La estrecha relación de los 13 aislados argentinos de WSMV estudiados, provenientes de diferentes hospedante y abarcando una amplia región geográfica del país, incentivan a los programas de mejoramiento a buscar tolerancia o resistencia al Clado D del WSMV. No obstante, dada la capacidad evolutiva de los virus podría surgir una nueva raza que quiebre la resistencia desarrollada.

CONCLUSIONES

Los aislados de WSMV presentes en diferentes regiones trigueras de Argentina provenientes de trigo y otras gramíneas están estrechamente relacionados filogenéticamente entre sí y comparten un ancestro en común con los aislamientos de Pacífico noroeste de Estados Unidos (APNW) y Australia. El ingreso de este virus a nuestro país se habría originado a partir de una única introducción, desde la región del APNW al igual que lo sucedido en Australia.

BIBLIOGRAFÍA

- Chen J., Chen J. and Adams M.J. 2001. A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Arch. Virol.* 146: 757-766.
- Coutts B.A., Banovic M., Kehoe M.A., Severtson D.L. and Jones R.C. 2014. Epidemiology of *Wheat streak mosaic virus* in wheat in a Mediterranean-type environment. *Eur. J. Plant Pathol.* 140: 797-813.
- Dwyer G.I., Gibbs M.J., Gibbs A.J. and Jones R.A.C. 2007. *Wheat streak mosaic virus* in Australia: relationship to isolates from the Pacific Northwest of the USA and its dispersion via seed transmission. *Plant Dis.* 91:164-170.
- Edgar, Robert C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32(5): 1792-97.

- Ellis M.H., Rebetzke G.J., Mago R. and Chu P. 2003. First report of *Wheat streak mosaic virus* in Australia. *Australas Plant Pathol.* 32: 551-553.
- Gadiou S., Kudela O., Ripl J., Rabenstein F., Kundu J.K. and Glasa M. 2009. An amino acid deletion in *Wheat streak mosaic virus* capsid protein distinguishes a homogeneous group of European isolates and facilitates their specific detection. *Plant Dis.* 93:1209-1213.
- Halliday R.B. 2004. The occurrence of *Aceria tulipae* (Keifer) and *Aceria tosichella* Keifer in Australia. *Int. J. Aracol.* 30: 113-118.
- Hill J.H., Martinson C.A. and Russell W.A. 1974. Seed transmission of *maize dwarf mosaic* and *wheat streak mosaic* viruses in maize and response of inbred lines. *Crop Science* 14: 232-235.
- Huson D.H. and Bryant D. 2006 Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23: 254-267.
- Jones R.A.C., Coutts B.A., Mackie A.E. and Dwyer G.I. 2005. Seed transmission of *Wheat streak mosaic virus* shown unequivocally in wheat. *Plant Dis.* 89: 1048-1050.
- Lanoiselet V.M., Hind-Lanoiselet T.L. and Murray G.M. 2008. Studies on the seed transmission of *Wheat streak mosaic virus*. *Australas Plant Path.* 37: 584-588.
- Mar T.B., Lau D., Schons J., Pereira P.R.V. da S. and Carminatti A.J. 2013. Identification and characterization of *Wheat Streak Mosaic Virus* isolates in wheat-growing areas in Brazil. *International Journal of Agronomy*. DOI:10.1155/2013/983414.
- Mayo M.A. 1999. Developments in plant virus taxonomy since the publication of the 6th ICTV report. *Arch. Virol.* 144: 1659-1666.
- Navia D., de Mendonca R.S., Skorachka A., Knihinicki D., Hein G.L., Pereira P.R.V., Lau D. and Truol G. 2013. Wheat curl mite, *Aceria tosichella*, and transmitted viruses: An expanding pest complex affecting cereal crops. *Exp. Appl. Acarol.* 59: 95-143.
- Rabenstein F., Seifers D.L., Schubert J., French R. and Stenger D.C. 2002. Phylogenetic relationships, strain diversity and biogeography of tritimoviruses. *J. Gen. Virol.* 83: 895-906.
- Reit I.P. and Heyne E.G. 1944. Wheat planting and wheat improvement in Kansas. Thirty-Third Biennial Report of the Kansas State Board of Agriculture, KS, USA.
- Robinson M.D. and Murray T.D. 2013. Genetic variation of Wheat streak mosaic virus in the United States Pacific Northwest. *Phytopathology* 103: 98-104.
- Ross J.G. 1969. With interest repaying a debt to Turkey. *South Dakota Farm & Home Research* 20: 24-26.
- Sagadin M.B., Rodríguez S.M. y Truol G. 2008. Transmisión por semillas de *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) en infecciones naturales y experimentales. INTA/IFFIVE, Córdoba (Informe No.8). p. 28.
- Salm S.N., Rey M.E.C. and Rybicki E.P. 1996. Phylogenetic justification for splitting the Rymovirus genus of the taxonomic family Potyviridae. *Arch. Virol.* 141: 2237-2242.
- Schubert J., Ziegler A. and Rabenstein F. 2015. First detection of *wheat streak mosaic virus* in Germany: molecular and biological characteristics. *Arch Virol.* 160(7): 1761-6.
- Stenger D.C., Seifers D.L. and French R. 2002. Patterns of polymorphism in *Wheat streak mosaic virus*: sequence space explored by a clade of closely related viral genotypes rivals that between the most divergent strains. *Virology* 302: 58-70.

- Stenger D.C. and French, R. 2009. *Wheat streak mosaic virus* genotypes introduced to Argentina are closely related to isolates from the American Pacific Northwest and Australia. *Archiv. Virol.* 154: 331-336.
- Stenger D.C., Hall J.S., Choi I.-R. and French, R. 1998. Phylogenetic relationships within the family Potyviridae: *wheat streak mosaic virus* and *brome streak mosaic virus* are not members of the genus *Rymovirus*. *Phytopathology* 88: 782–787.
- Truol G., French R. Sagadín M. and Arneodo J. 2004. First report of *Wheat streak mosaic virus* infecting wheat in Argentina. *Australas. Plant Path.* 33(2): 137-138.
- Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R. and Wickner, R.B. 2000. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego: Academic Press.
- Wylie S.J., Adams M., Chalam C., Kreuze J., López-Moya J.J., Ohshima K., Praveen S., Rabenstein F., Stenger D., Wang A. and Zerbini F.M. 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Potyviridae. *J Gen Virol.* 98(3): 352-354.
- Zagula K.R., Niblett C.L., Robertson N.L., French R. and Lommel S.A. 1992. Potyviridae: genus *Rymovirus*. *Arch. Virol.* supplement 5: 269-276.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN INTRA-HOSPEDANTE DEL *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) MEDIANTE ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN MASIVA DE SU GENOMA COMPLETO

INTRODUCCIÓN

Los potyvirus constituyen la familia de virus de planta que contienen RNA como material genético más abundante e importante económicamente en agricultura. Los virus con genoma RNA se caracterizan por poseer altas tasas de replicación y mutación, y potenciado por la recombinación, establecen poblaciones altamente polimórficas (Elena y Sanjuan 2007). La tasa de mutación elevada se debe a que la polimerasa viral no cuenta con la función de corrección de errores (reparación del DNA) (Steninhauser *et al.*, 1992). Dichas características hacen que los virus RNA existan dentro de sus hospedantes como grandes poblaciones heterogéneas y complejas, comprendiendo un espectro de secuencias genómicas no idénticas, pero si estrechamente relacionadas entre sí, sometidas a un proceso continuo de variación genética (mutación y recombinación), competencia y selección (Eigen, 1971; Domingo, 1999; Holmes y Moya 2002; Orton *et al.*; 2013).

Un concepto comúnmente utilizado, y ampliamente debatido, para describir dicha dinámica evolutiva de los virus RNA, es el de modelo de cuasiespecie (Eigen, 1971; Domingo *et al.*, 1985; Eigen, 1996; Domingo *et al.*, 2001; Domingo, 2002). Este modelo difiere de otros de genética de poblaciones en varios aspectos claves (French y Stenger, 2005). Predicciones respecto al mismo han sido probadas experimentalmente, con resultados coherentes con las expectativas teóricas (Miralles *et al.*, 1999; Burch y Chao 2000; Codoñer *et al.*, 2006; Sanjuán *et al.*, 2007). Sin embargo, varias de las suposiciones del modelo original fueron consideradas no válidas para poblaciones virales reales (Eigen, 1996). Debido a que tal concepto resulta controvertido, se ha sugerido utilizar el término de nube o conjunto de mutantes, cuando se refiere a la replicación de poblaciones virales (Cuevas *et al.*, 2015).

Los primeros estudios sobre poblaciones virales se basaron principalmente en las secuencias obtenidas por el método Sanger, que resultaba en una secuencia consenso de los virus circulantes dominantes. La secuenciación masiva de nucleótidos, también conocida como de alto rendimiento o de nueva generación (Next Generation Sequencing, NGS), es capaz de producir millones de lecturas de secuencias permitiendo caracterizar la nube poblacional viral y la detección de mutaciones con frecuencias extraordinariamente bajas a un nivel de detalle sin precedentes y superando las limitaciones del método anterior (Bimber *et al.*, 2010; Bordería *et al.*, 2010; Beerenwinkel y Zagordi, 2011; Domingo *et al.*, 2012). En dicha tecnología se supone que las lecturas alineadas a una posición genómica dada proceden de un replicón individual, dando a conocer así una representación de la diversidad genética de la población viral en su conjunto (McElroy *et al.*, 2014).

Los antecedentes sobre aspectos de estructura poblacional y evolución de WSMV se realizaron con tecnología de secuenciación convencional de Sanger y principalmente comprendiendo solo algunas de las regiones del genoma (Choi *et al.*, 2001; Hall *et al.*, 2001a, 2001b; Stenger *et al.*, 2002; French y Stenger, 2003). En nuestro país, no hay antecedentes sobre estudios de diversidad y estructura de las poblaciones del WSMV. Del mismo modo, no se han realizado hasta el momento estudios sobre poblaciones de WSMV mediante secuenciación de nueva generación a nivel mundial.

Es fundamental comprender la diversidad intra e inter-hospedante de un virus para poder entender los mecanismos y las interacciones ocurridas en la enfermedad con miras a establecer estrategias de manejo efectivas basadas en la utilización de cultivares con resistencia. Por lo anterior, se planteó como objetivo del presente capítulo caracterizar la población intra-hospedante del *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) mediante análisis de secuenciación masiva de su genoma completo a partir de muestras de diferentes regiones trigueras de la Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del genoma completo del WSMV de trigo y hospedantes alternativos

Se utilizaron las secuencias completas del WSMV obtenidas mediante pirosecuenciación del genoma completo de 13 aislamientos argentinos descritos en el Capítulo 2 de esta Tesis. Para la caracterización de la población del WSMV se utilizaron dos metodologías, una mediante la reconstrucción de haplotipos y la otra mediante el análisis de polimorfismos de nucleótido simple (SNP, Single Nucleotide Polymorphisms) del genoma completo del WSMV.

Reconstrucción de haplotipos virales de genoma completo del WSMV

En primer lugar, las lecturas de las 13 secuencias del genoma completo del WSMV obtenidas mediante pirosecuenciación se procesaron para filtrar por calidad y eliminación de códigos específicos (barcodes) y adaptadores. Se convirtieron los archivos .ssf en archivos .fastq. A continuación, se utilizaron la herramienta FlexBar (Dodt *et al.*, 2012) y el paquete R para realizar los pasos de procesamiento. Se calcularon las distribuciones de la longitud de las lecturas. Aquellas con una longitud por fuera del rango de los percentiles 0,05 y 0,95 fueron eliminadas. Posteriormente, se realizó el filtrado de las lecturas con al menos una base no identificada y se recortaron los extremos derecho e izquierdo de las lecturas con calidad inferior a un valor de PHRED 30 (Q30). Además, se identificaron y separaron las lecturas según un barcode, incorporado durante el proceso de secuenciación, y se eliminaron los adaptadores. Para la reconstrucción de haplotipos virales del genoma completo del WSMV se emplearon las siguientes cuatro programas: QuasQ (Poh *et al.*, 2013), QuRe (Prosperi y Salemi, 2012), QuasiRecomb (Töpfer *et al.*, 2013) y PredictHaplo (Prabhakaran *et al.*, 2013). Debido a que las dos últimas herramientas necesitan alineamientos como archivos de entrada, se utilizó el algoritmo Bowtie2 con las lecturas filtradas para el conjunto de datos de las 13 muestras. El algoritmo Bowtie2 fue seleccionado debido a que es el utilizado por QuasQ, mientras que QuRe cuenta con un método propio de ensamblado. El aislamiento argentino Arg2 de WSMV (número de

acceso GenBank FJ348359, Stenger y French, 2009) se utilizó como la secuencia de genoma completo de referencia para las cuatro herramientas de ensamblado.

Análisis de Polimorfismos de nucleótido simple (SNP, Single Nucleotide Polymorphisms) del genoma completo del WSMV

Para el análisis de polimorfismos de nucleótido simple (SNP, Single Nucleotide Polymorphisms) se emplearon las lecturas obtenidas mediante la tecnología 454/Roche GS FLX filtradas mediante PrinSeq. Los pasos empleados para realizar dicho filtrado fueron, eliminar las secuencias de adaptadores y de baja calidad, estableciendo una ventana de 10 nucleótidos para el cálculo de calidad y cortando en el extremo 5', cuando la media de calidad de la ventana fuera menor a un valor de 30. Como secuencia de referencia se utilizaron secuencias del WSMV ensambladas *de novo* para cada uno de las muestras en estudio. Los ensamblados *de novo* fueron obtenidos mediante el ensamblador Newbler.

Se utilizó el software Geneious 9.1.2 para la búsqueda de los SNP. En primer lugar, se realizó un mapeado de las lecturas filtradas a la secuencia de referencia, en este caso, cada uno de las secuencias completas del genoma ensambladas *de novo* para cada uno de los 13 aislamientos del WSMV. Luego, en base a las lecturas mapeadas obtenidas, se realizó la búsqueda de SNP estableciendo los siguientes parámetros: cobertura mínima de 100, frecuencia de 0.001 y un valor de calidad de 30.

Se analizaron los SNP que provocaron o no cambios en el aminoácido (mutaciones sinónimas y no-sinónimas), con frecuencias mayores al 2% en la población, para cada aislamiento del virus. La consideración de los SNP con frecuencia mayor a la mencionada se debió a que el error promedio estimado para la tecnología 454/Roche fue de alrededor de 1% (Gilles *et al.*, 2011; Shao *et al.*, 2013).

RESULTADOS

Pre-procesamiento de las secuencias (limpieza de datos)

Se obtuvo la secuencia completa de 13 aislamientos argentinos del WSMV mediante la tecnología optimizada de amplificación por RT-PCR del genoma completo y luego pirosecuenciación de los mismos. En la Tabla 3.1 se presentan los valores totales de las lecturas obtenidas mediante la tecnología 454/Roche GS FLX para cada aislamiento de WSMV y de las lecturas después de las etapas de procesado aplicando los diferentes criterios de calidad. Después del procesado, las lecturas para todos los aislamientos, resultaron entre un 89 y 90 % de las originales.

De los 13 aislamientos de WSMV se obtuvo una cobertura del 100% del genoma completo del virus. En la Figura 3.1 se presentan las distribuciones del total de lecturas obtenidas para cada uno de los aislamientos en función de la posición de nucleótidos correspondiente al genoma completo de referencia del WSMV utilizado.

Tabla 3.1. Procesado de lecturas obtenidas mediante tecnología 454/Roche para la reconstrucción de haplotipos, correspondientes a 13 aislados de WSMV argentinos

Aislado de WSMV	Total de lecturas obtenidas por 454 Roche	Valores extremos cuartiles (99.5 y 0.05) de la distribución de la longitud de lecturas	Lecturas remanentes después de las etapas de procesado conducido por Flexbar	% de lecturas de salida
WSMV01	13649	34-531	12175	89.2
WSMV02	32427	34-532	29120	89.8
WSMV03	12706	32-529	11333	89.2
WSMV04	25777	33-531	22985	89.2
WSMV05	15752	33-530	14073	89.3
WSMV06	15585	33-532	13942	89.5
WSMV07	13399	34-530	11932	89.1
WSMV08	12592	32-531	11244	89.3
WSMV09	18101	33-529	16118	89.0
WSMV10	20292	34-531	18012	88.8
WSMV11	20962	34-531	18656	89.0
WSMV12	14130	34-532	12644	89.5
WSMV13	25113	46-547	22517	89.7

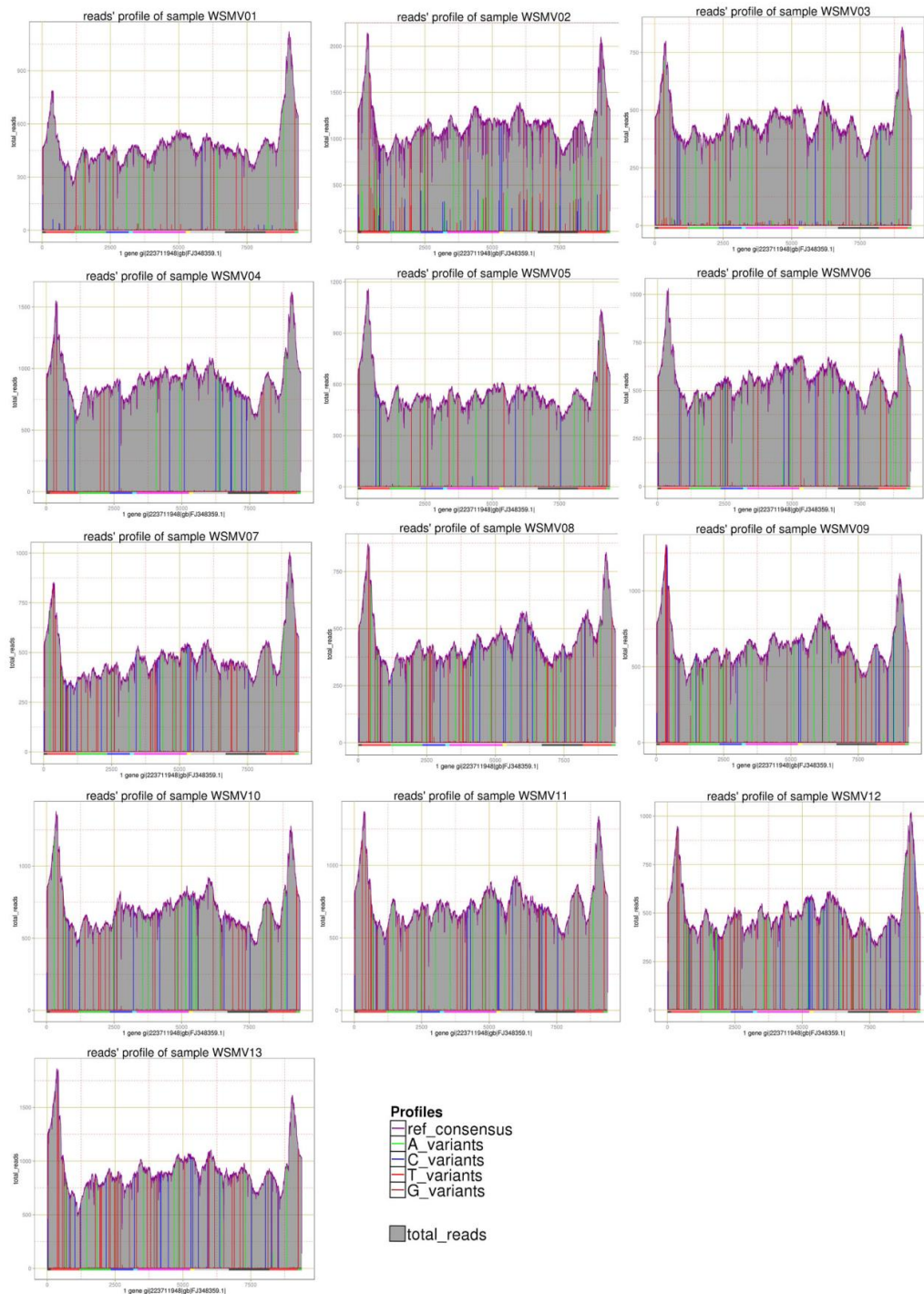


Fig. 3.1. Distribución del total de lecturas obtenidas para cada uno de los 13 aislamientos de WSMV en función de la posición de nucleótidos correspondiente al genoma completo de referencia utilizado (GenBank FJ348359).

Reconstrucción de haplotipos virales del genoma completo del WSMV

En la Tabla 3.2 se presenta el número y frecuencia de haplotipos reconstruidos mediante los cuatro métodos empleados para cada uno de los 13 aislamientos de WSMV. Se discrimina la reconstrucción de haplotipos del genoma de WSMV completo y parcial, así como también los de mayor y menor frecuencia al 1%. Esta tabla muestra que, si bien se logró la reconstrucción de haplotipos de genoma completo con sus respectivas frecuencias, existen diferencias notables en los resultados obtenidos con los diferentes métodos de ensamblados. El QuRe solo reconstruyó haplotipos del genoma completo del WSMV en 6 aislamientos, mientras que el QuasQ, QuasiRecomb y PredicHaplo lograron la reconstrucción de haplotipos del genoma completo de los 13 aislamientos. Los cuatro métodos permitieron definir en forma conjunta, al aislamiento WSMV02 como el más diverso por poseer el mayor número de haplotipos, y al aislamiento WSMV08 como el menos diverso. Los demás aislamientos presentaron diferentes números de haplotipos dependiendo del método utilizado. Este resultado inesperado, porque la utilización de cuatro métodos fue con la finalidad de soportar tendencias de diversidad de haplotipos independientemente del número de haplotipos para los distintos aislamientos de WSMV argentinos, nos llevó a realizarnos varias preguntas. Para la selección de los cuatro métodos de reconstrucción de haplotipos empleados se consideró su aplicación para analizar secuencias generadas por tecnología 454 Roche. Se pensó como probable causa la solidez de cada método para reconstruir un haplotipo completo de aproximadamente 9000 pb, como es el genoma del WSMV. Por lo tanto, se reevaluó la bibliografía para cada método teniendo en cuenta esta aplicación. En las Tablas 3.3 y 3.4 se presenta un resumen de las características y las citas bibliográficas para cada método seleccionado. Los únicos métodos utilizados para reconstruir genomas completos de virus fueron el PredicHaplo y el QuasiRecomb. De estos dos métodos, seleccionamos los resultados obtenidos por el QuasiRecomb por resultar el método más adecuado para el análisis de nuestros datos dado que permitió diferenciar los 13 aislamientos de WSMV en comparación con los del PrediHaplo. De esta manera, se consiguió identificar a los aislados WSMV02, WSMV01 y WSMV03 como los de mayor diversidad, destacándose WSMV02 por poseer el mayor número de haplotipos reconstruidos. También se identificó un grupo de diversidad menor

conformado por los aislamientos WSMV09 y WSMV13 de trigo, y de los hospedantes alternativos WSMV12 de Triticale y WSMV11 de *A. fatua*. Entre los aislados que presentaron menor número de haplotipos, se destacan el WSMV04, WSMV07 y WSMV08 de trigo. No se encontró relación entre el número de haplotipo y el año, región triguera, cultivar u hospedante para los distintos aislamientos argentinos de WSMV.

Tabla 3.2. Número y frecuencia de haplotipos de los 13 aislamientos de WSMV reconstruidos

Aislado	Métodos de Ensamblado														
	QuasQ			QuasiRecomb			PredictHaplo			QuRe					
	Completo			Completo			Completo			Completo			Parcial		
	T	>1% Fr	<1% Fr	T	>1% Fr	<1% Fr	T	>1% Fr	<1% Fr	T	>1% Fr	<1% Fr	T	>1% Fr	<1% Fr
WSMV02	621	19	602	10000	0	10000	4	3	1	0	0	0	8	8	0
WSMV01	28	7	21	166	12	154	2	1	1	3	2	1	0	0	0
WSMV03	22	4	18	91	5	86	2	2	0	1	1	0	0	0	0
WSMV09	36	4	32	45	12	33	2	1	1	0	0	0	2	2	0
WSMV12	20	5	15	29	8	21	1	1	0	1	1	0	0	0	0
WSMV13	215	2	213	27	9	18	2	2	0	0	0	0	5	3	2
WSMV11	117	5	112	20	6	14	2	2	0	0	0	0	2	2	0
WSMV06	58	4	54	8	5	3	1	1	0	0	0	0	2	1	1
WSMV05	28	2	26	8	5	3	1	1	0	1	1	0	0	0	0
WSMV10	38	2	36	7	3	4	2	2	0	1	1	0	0	0	0
WSMV04	183	3	180	4	3	1	3	2	1	0	0	0	3	2	1
WSMV07	63	8	55	4	4	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
WSMV08	3	1	2	4	3	1	1	1	0	0	0	0	3	2	1

T: total de haplotipos. Fr: frecuencia.

Tabla 3.3. Detalles metodológicos, de aplicación y bibliográficos de los diferentes métodos para reconstrucción de haplotipos empleados en este estudio.

Método	Reconstrucción de haplotipos	Archivo de entrada	Incluye Preprocesado	Alineamiento	Aplicación	Plataforma	Referencia
QuRe	Local	Lecturas (.fasta)	SI	Algoritmo Smith–Waterman–Gotoh (Gotoh, 1982) (Gotoh, 1982).	Genoma completo, HIV. 10000 pb aprx.	454/Roche	Macalalad <i>et al.</i> , 2012
					Genes E2 1600 pb y NS5B 2600 pb. CSFV	454/Roche	Topfer <i>et al.</i> , 2013
					Genes proteinasa 300 pb y RT 700 pb aprox. HIV.	454/Roche	Jayasundara <i>et al.</i> , 2015
					80% del genoma completo de FMDV (dos fragmentos de 4000 pb aprox.)	Illumina	Jayasundara <i>et al.</i> , 2015
QuasQ	Global	Lecturas (.fasta)	SI	Bowtie2	Gen NS3 1800 pb. HCV.	Illumina	Ogishi <i>et al.</i> , 2015
					Genes Gag 500 pb aprx. y Pol 560 pb aprox. HIV	454/Roche	Lorenzo-Redondo <i>et al.</i> , 2016
					Genes Gag y Pol HIV. 1500 pb	454/Roche	Poh <i>et al.</i> , 2013
					Genes E2 1600 pb y NS5B 2600 pb, CSFV	454/Roche	Topfer <i>et al.</i> , 2013
QuasiRe comb	Global/Local	Alineamiento (.bam)	NO	Bowtie2	Genoma completo, HIV. 8600 pb	454/Roche, Illumina, PacBio	Giallonardo <i>et al.</i> , 2014
					Gen NS3 1800 pb. HCV.	Illumina	Ogishi <i>et al.</i> , 2015
					Genes Gag y Pol HIV. 1300 pb aprox.	Illumina	Wu <i>et al.</i> , 2014
					Gen NS3 WNV. 1800 pb.	Illumina	Grubaugh <i>et al.</i> , 2015
					Genoma completo EBOV. 18000 pb	Illumina	Carrol <i>et al.</i> , 2015
					Gen NS5A HCV. 250 nt	Illumina	Akamatsu <i>et al.</i> , 2015
					Gen Env HIV. 760 nt	Illumina	Chachage <i>et al.</i> , 2016
					Gen PB2 IAV. 2300 nt	PacBio	Artyomenko <i>et al.</i> , 2016
Genoma completo HRSV. 15000 pb aprox.	Illumina	Aljabr <i>et al.</i> , 2016					
Gen Env HIV. 3100 nt	Illumina	Oberle <i>et al.</i> , 2016					

Tabla 3.4. (Continuación) Detalles metodológicos, de aplicación y bibliográficos de los diferentes métodos para reconstrucción de haplotipos empleados en este estudio.

Método	Reconstrucción de haplotipos	Archivo de entrada	Incluye Preprocesado	Alineamiento	Aplicación	Plataforma	Referencia
PredictHaplo	Global/Local	Alineamiento (.sam)	NO	Bowtie2	Gen pol HIV. 1245 pb	454/Roche	Prabhakaran <i>et al.</i> , 2013
					Genoma completo, HIV. 8600 pb	454/Roche, Illumina, PacBio	Giallonardo <i>et al.</i> , 2014
					Gen proteinasa, 300 pb y gen RT 700 pb aprox.	454/Roche	Jayasundara <i>et al.</i> , 2015
					80% del genoma completo de FMDV (dos fragmentos de 4000 pb aprox.)	Illumina	Jayasundara <i>et al.</i> , 2015

Análisis de Polimorfismos de nucleótido simple (SNP, Single Nucleotide Polymorphisms)

En primer lugar, se obtuvieron las lecturas filtradas mediante PrinSeq según parámetros de calidad, las cuales representaron entre un 96 y 97% de las lecturas originales para todos los aislamientos de WSMV pirosecuenciados (Tabla 3.5). Como resultado de los análisis de los SNP del genoma completo de los 13 aislamientos de WSMV se obtuvo un archivo de salida con la siguiente información: cambio en el nucleótido, en el aminoácido, en el codón, la posición en el genoma, la cobertura, el efecto en la proteína y la frecuencia de la variante (Anexo I). En la Tabla 3.6 se presenta un resumen del número de haplotipos reconstruidos con el método seleccionado QuasiRecomb y el número de SNP con frecuencias mayores a 2% para cada aislado de WSMV estudiado. Se resaltan los tres aislados más diversos, WSMV02, WSMV01 y WSMV03, así como el aislado de menor diversidad WSMV08, detectados mediante análisis tanto de haplotipos como de SNP. El resto de los aislamientos presentaron diversidad intermedia. Se analizaron los datos para encontrar relación entre la diversidad y alguna de las características de los distintos aislamientos como región triguera, macroregión, año, hospedante, cultivar de trigo, infección mixta con el TriMV (resultados presentados en el Capítulo 4) y linaje *A. tosichella* (resultados presentados en el Capítulo 5). Los resultados obtenidos no permitieron asociar a los aislados más diversos con alguno los aspectos mencionados.

Tabla 3.5. Procesado de las lecturas obtenidas mediante tecnología 454/Roche para la búsqueda de Polimorfismos de simple nucleótido (SNP, Single Nucleotide Polymorphisms), correspondientes a los 13 aislados de WSMV argentinos secuenciados.

Aislado de WSMV	Total de N° de lecturas obtenidas mediante Roche 454	Lecturas remanentes después de las etapas de procesado conducido por PrinSeq	% de lecturas con calidad Q20	% de lecturas con calidad Q30	% de lecturas de salida
WSMV01	13649	13172	95,0	79,1	96,5
WSMV02	32427	31164	95,2	79,8	96,1
WSMV03	12706	12304	95,0	79,4	96,8
WSMV04	25777	24874	95,0	79,3	96,5
WSMV05	15752	15204	95,1	79,6	96,5
WSMV06	15585	15053	95,3	80,0	96,6
WSMV07	13399	12922	95,0	79,3	96,4
WSMV08	12592	12156	95,2	79,8	96,5
WSMV09	18101	17481	95,2	79,8	96,6
WSMV10	20292	19486	95,2	79,8	96,0
WSMV11	20962	20158	95,0	79,5	96,2
WSMV12	14130	13702	95,4	80,4	97,0
WSMV13	25113	24159	95,1	79,7	96,2

Tabla 3.6 Número de haplotipos reconstruidos mediante el método QuasiRecomb y de SNP con frecuencias mayores a 2% encontrados para cada uno de los 13 aislados de WSMV. Los datos de las infecciones mixtas con TriMV y los del linaje de *A. tosichella* corresponden a los resultados obtenidos en el Capítulo 4 y 5 respectivamente. Se resaltan los tres aislados más diversos (WSMV02, WSMV01 y WSMV03) y el de menor diversidad (WSMV08) detectados mediante análisis de haplotipos y SNP.

Región Triguera	Macroregiones	Localidad	Año	Hospedante	Cultivar	Comportamiento frente a WSMV	Aislado	N° haplotipos QuasiRecomb	N° SNP con Frecuencia >2%	Infección mixta con TriMV	Linaje <i>A. tosichella</i>
IV	Sur	Energía	2009	Trigo	Baguette 10	S ¹	WSMV02	10000	87	Negativo	WCM2
II Sur	Sur	25 de Mayo	2009	Trigo	Baguette 19	R ²	WSMV01	166	28	Positivo Ar ³ :1,4	nd
III	Central	Paraná	2009	Trigo	BioINTA 1007	S	WSMV03	91	84	Positivo Ar:1,5	WCM2
VN	Central	Salguero	2009	Trigo	Baguette 13	nd	WSMV09	45	5	Positivo Ar:1,3	WCM2
VN	Central	Las Perdices	2011	Triticale	-	nd	WSMV12	29	10	Positivo Ar:1,1	nd
II N	Central	Marcos Juárez	2010	Trigo	nd ⁴	nd	WSMV13	27	20	nr ⁵	WCM2
IV	Sur	Necochea	2010	<i>Avena fatua</i>	-	nd	WSMV11	20	2	Negativo	nd
V Sur	Sur	Bordenave	2009	Trigo	nd	nd	WSMV05	8	13	Negativo	WCM2
II N	Central	Marcos Juárez	2009	<i>Digitaria sanguinalis</i>	-	nd	WSMV06	8	3	nr	nd
IV	Sur	Necochea	2010	Trigo	Baguette 9	S	WSMV10	7	4	nr	WCM2
VN	Central	Manfredi	2009	Trigo	nd	nd	WSMV04	4	4	nr	WCM2
IV	Sur	Tandil	2009	Trigo	Baguette 11	nd	WSMV07	4	4	nr	WCM2
IV	Sur	G. Madariaga	2009	Trigo	Baguette 31	R	WSMV08	4	1	nr	WCM2

¹S: susceptible, ²R: resistente, ³Ar: Absorbancia relativa [Absorbancia de planta analizada/(Absorbancia de planta sana promedio + 3 desvíos estándar)], ⁴nd: no detectado, ⁵nr: no realizado.

Se realizaron gráficos con todas las frecuencias de las mutaciones sinónimas y no sinónimas (superiores al 2%) para cada posición variable a lo largo de toda la región codificante del WSMV de los 13 aislamientos en estudio (Fig. 3.2). Se indica la distribución de las mutaciones para todas las proteínas P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa, NIb y CP en función de cada aislado. La distribución de las mutaciones tanto sinónimas como no sinónimas fue a lo largo de todo el genoma para los aislamientos más diversos (WSMV02, WSMV01 y WSMV03) como para el WSMV13. En general, el resto presentó mutaciones en determinados sitios a lo largo del genoma. Se destacan cuatro mutaciones no sinónimas con frecuencias altas, de alrededor del 60%, en las posiciones 636 de la P1, 2214 y 2268 en la P3 y 7402 en la NIb para el aislado WSMV02. También, se destacan las mutaciones con frecuencias cercanas al 30-40%, en las posiciones 1145 de la HC-Pro y 2817 de la P3, y en 1769 de HC-Pro y 7782 de la NIb para los aislados WSMV09 y WSMV12 respectivamente (Fig. 3.2, Anexo I). Los resultados permitieron destacar a los genes HC-Pro, P1, CI, NIb, NIa y CP como los que presentaron mayor número de mutaciones. Con menor variabilidad y nombrado de mayor a menor según el número de mutaciones se encontraron los genes P3, 6K1 y 6K2 (Fig. 3.3).

Se encontraron mutaciones en el mismo sitio genómico para más de dos aislamientos. En el gen que codifica para la HC-Pro: la mutación sinónima A1404 por G la comparten los aislamientos WSMV02, WSMV04, WSMV07, WSMV011, WSMV12, la mutación no-sinónima T-1406 por C (cambio de aa M por T) es compartida por los aislamientos WSMV01, WSMV02, WSMV04, WSMV07 y WSMV12, y la mutación no-sinónima A-1411 por C (cambio de aa N por H) es compartida por los aislamientos WSMV02, WSMV04, WSMV05, WSMV07 y WSMV12. A su vez, tres de las mutaciones mencionadas fueron compartidas por cuatro de los aislamientos WSMV02, WSMV04, WSMV05, WSMV07 y WSMV12. En el gen P3, la mutación A2635 por T (cambio de aa M por L) es compartida por los aislamientos WSMV04, WSMV06, WSMV08, WSMV12 y WSMV13. En el gen NIa, los aislamientos WSMV05, WSMV09, WSM10 y WSMV13 comparten las mutaciones T6497 por G (cambio aa I por S) y A6505 por C (cambio de aa N por H).

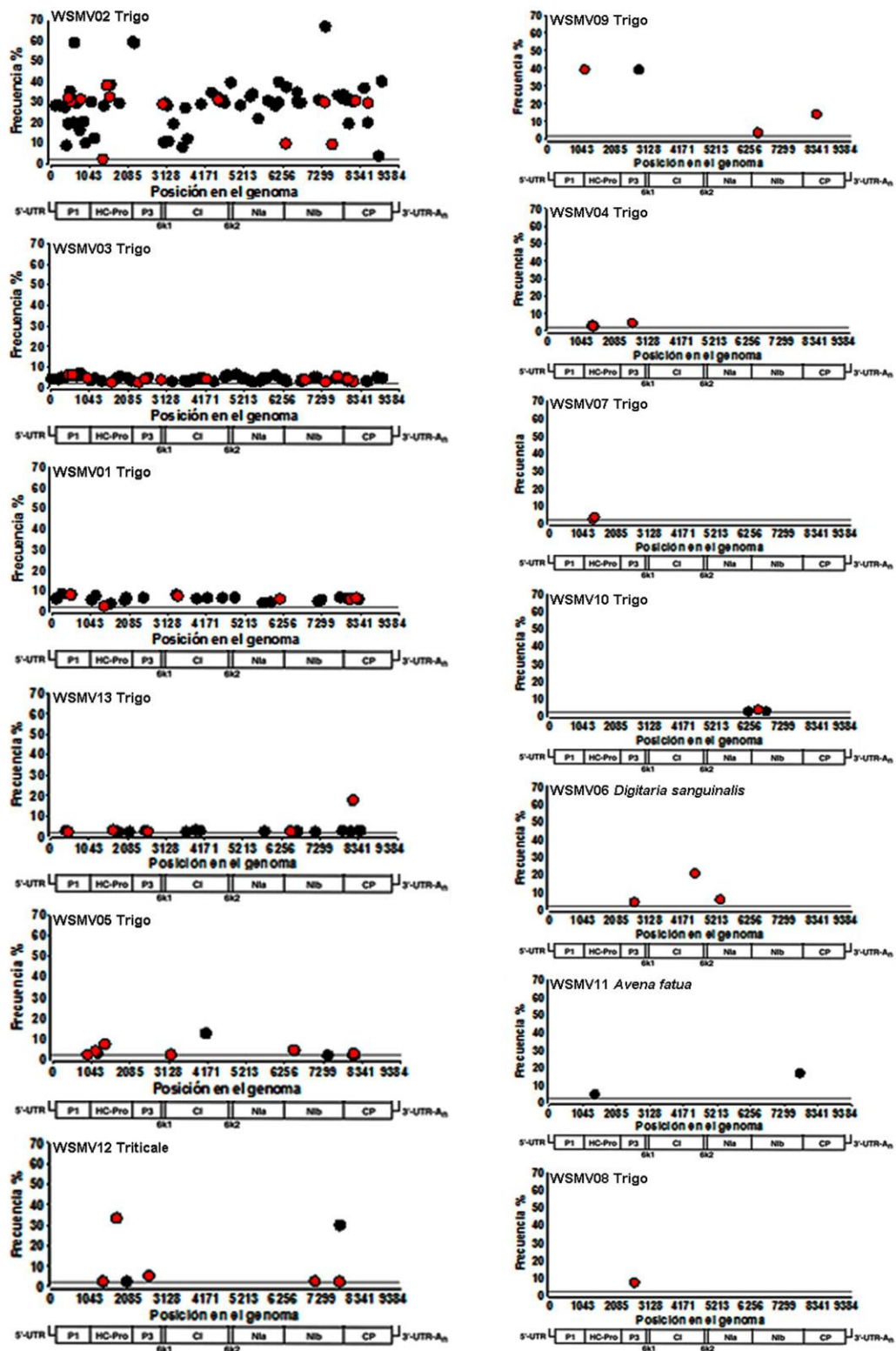


Fig. 3.2. Frecuencia de los SNP según su posición en el genoma para los 13 aislados de WSMV. En color negro se presentan las mutaciones sinónimas y en rojo las no-sinónimas.

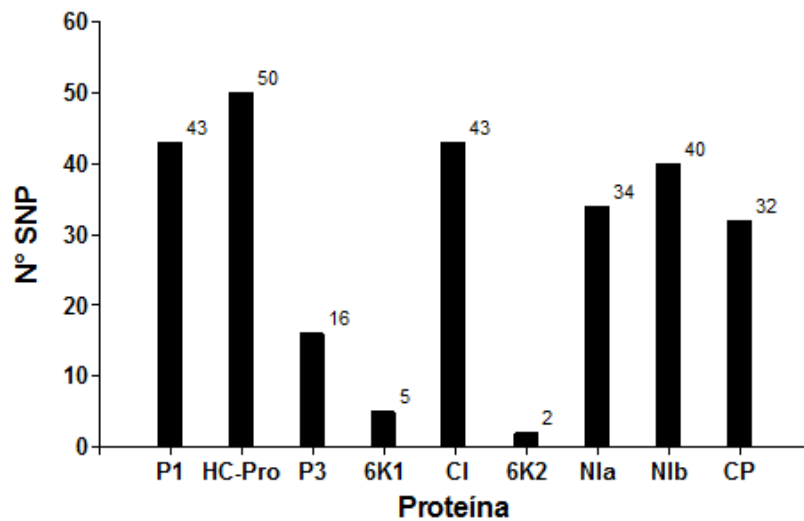


Fig. 3.3. N° total de SNP para cada proteína del WSMV correspondientes a los 13 aislados virales estudiados.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente capítulo permitieron, mediante dos metodologías diferentes, la reconstrucción de haplotipos y la búsqueda de SNP, caracterizar la población intra-hospedante del WSMV mediante análisis de secuenciación masiva del genoma completo en poblaciones naturales en Argentina.

El empleo de cuatro programas diferentes para lograr la reconstrucción de haplotipos del genoma completo del WSMV no mostró, excepto para los aislamientos con mayor y menor diversidad, una tendencia pareja entre ellos para soportar los resultados obtenidos como se intentaba al utilizar más de un método. Estudios previos (Topfer *et al.*, 2013; Giallonardo *et al.*, 2014; Jayasundara *et al.*, 2015a y b), mostraron que el obtener distinto número de haplotipos utilizando diferentes métodos de ensamblado, no imposibilita detectar una tendencia, o identificar mayor o menor variabilidad en diferentes muestras de forma equivalente, independientemente del número específico de haplotipos reconstruidos. Los resultados aquí obtenidos, mediante los cuatro métodos, permitieron definir solamente en forma análoga al aislamiento WSMV02 como el más diverso y al WSMV08 como el de menor diversidad. Una de las posibles causas de la falta de consistencia entre diferentes métodos para el resto de los aislados podría deberse a la baja

profundidad, es decir, bajo número de lecturas por base obtenidas con la tecnología de secuenciación 454 de Roche. En este trabajo se seleccionó dicha tecnología debido a que el objetivo fue reconstruir haplotipos del genoma completo del WSMV, a diferencia de otros estudios donde se enfocan generalmente en un solo gen en particular. La ventaja de la tecnología de secuenciación de 454 de Roche es el tamaño del producto secuenciado obtenido, de alrededor de 500 pb en comparación con otra tecnología, como Illumina con la que se alcanzan fragmentos más cortos, de aproximadamente 100 pb (Liu *et al.*, 2012). Considerando que QuasiRecomb fue diseñado y empleado para la reconstrucción de genomas completos, así como también mediante tecnología 454 de Roche (Tabla 3.3), condiciones semejantes a las de este trabajo, fue seleccionado como el conveniente para el análisis de los resultados obtenidos. Además, como se observa en la Tabla 3.5, permitió categorizar los aislamientos en grupos de mayor y menor diversidad en coincidencia con los resultados de los análisis de SNP. El método QuRe no fue capaz de reconstruir el genoma completo de gran parte de los aislados. Por otra parte, el QuasQ fue originalmente diseñado y utilizado solamente para reconstruir haplotipos para fragmentos cortos, implicando solamente a un gen (de aproximadamente 1500 pb) (Poh *et al.*, 2013), a diferencia de nuestros datos, los que involucraron a más de 9000 pb (Tabla 3.3). En relación a PredictHaplo, el número de haplotipos reconstruidos fue demasiado bajo, dificultando diferenciar a los distintos aislamientos.

La escasa diversidad intra-hospedante encontrada en 10 de las 13 poblaciones de WSMV pirosecuenciados (Tabla 3.5) sorprendió teniendo en cuenta que se esperan poblaciones virales altamente polimórficas debido a sus altas tasas de replicación, tasas de mutación y recombinación (Elena y Sanjuan, 2007). La tasa de mutación estimada para la CP del WSMV fue de $5,8 \times 10^{-4}$ /nt después de nueve pasajes seriales (French y Stenger, 2005). Tampoco, se encontró frecuencias de mutación diferencial asociada a los diferentes hospedantes estudiados (trigo, Triticale, *A. fatua* y *D. sanguinalis*) como se observó en otros patosistemas. El *Cucumber mosaic virus* (CMV) tiene mayor frecuencia de mutación en pimiento que en tabaco (Schneider y Roossinck, 2001). Varios factores determinan e influyen en los valores de las tasas de mutación, los cuales pueden ser clasificados en factores propios del virus, factores intrínsecos del hospedante o factores ambientales

(Combe y SanJúan, 2014). Dentro de los factores virales, el tipo de mecanismo de replicación del virus, geométrica o “sellado” (stamping machine), determina la forma en que se acumulan las mutaciones (Safari y Roossinck, 2014). El modelo de replicación propuesto para los virus con genoma RNA simple cadena y polaridad positiva es geométrica dado que el genoma parental (+) se replica a un molde de RNA (-) para una segunda ronda de replicación de genomas (+), posibilitando la acumulación exponencial de mutaciones. En tanto que en la replicación “sellado” (stamping machine), el genoma parental se replica generando los genomas de la progenie como en el caso de los virus con genoma de dsRNA (Safari y Roossinck, 2014). El WSMV, a pesar de ser un virus ssRNA de polaridad positivo, se lo propone con un mecanismo de replicación de stamping machine con acumulación de mutaciones lineal (French y Stenger, 2003).

Contar con el potencial para variar, no necesariamente llevará siempre a poblaciones más variables. Garcia-Arenal y colaboradores (2003) consideraron que el alto potencial de variación no necesariamente resulta en tasas rápidas de cambios en las poblaciones virales, mencionando datos de secuencias de estudios durante 10 años mostrando que la estabilidad genética es la regla y no la excepción en poblaciones naturales de virus de plantas. Asimismo, trabajos como los de Hall y col. (2001b) y Bartels y col. (2016) mencionan varios virus de plantas, como por ejemplo al TriMV, manifestando bajos niveles de variación. Hay antecedentes que exponen a los cuellos de botella y a la selección negativa, como las posibles razones que explicarían los bajos niveles de dicha variación (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1991; Novella *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 2001b; García-Arenal *et al.*, 2003; Li y Roossinck, 2004; French y Stenger, 2005; Acosta-Leal *et al.*, 2011). Particularmente, el estudio de French y Stenger (2003), demuestra que los cuellos de botella tienen lugar cuando el WSMV se mueve sistémicamente en la planta contribuyendo al establecimiento de poblaciones genéticamente diferentes y a la generación de poblaciones en parches (Jridi *et al.*, 2006).

Sería interesante relacionar la variabilidad del WSMV con la tolerancia de los cultivares de trigo utilizados por nuestros productores basada en genes sensibles a la temperatura y que actúan inhibiendo el movimiento del virus, en vez de por una reacción

de hipersensibilidad (Tatineni *et al.*, 2016). Esta especulación no se pudo analizar por la falta de datos sobre el origen de la tolerancia que portaban los cultivares de donde se aislaron los genomas de WSMV. La transmisión a través de vectores también provoca un cuello de botella (Ali *et al.*, 2006). La forma de transmisión del virus también puede ser importante ya que se ha observado en muchos casos que una transmisión por semilla genera tasas elevadas por lo que tal vez se podría especular que los aislamientos WSMV02, WSMV01 y WSMV03 podrían derivar de infección por semilla, mientras que el resto de los aislamientos, que presentaron baja diversidad de infección, mediante el ácaro vector.

El aislado WSMV13 presentó mayor número de haplotipos y SNP que el aislado WSMV08. Estos resultados se pueden relacionar con los obtenidos en el Capítulo 6 de esta Tesis, donde el aislado WSMV13, infectó mayor número de plantas en relación al aislado WSMV08 en los ensayos de evaluación de cultivares. Estos resultados animan a continuar con estudios sobre la importancia de seleccionar un aislamiento virulento que podría estar relacionado con presentar mayor diversidad en la evaluación de resistencia al WSMV.

Con excepción de la distribución de las mutaciones en los aislamientos WSMV02, WSMV01, WSMV03 y WSMV13 que fueron a lo largo del genoma, en el resto de los aislamientos las mutaciones fueron en determinados sitios. Hay antecedentes para el WSMV, pero solo para la CP, en el cual demuestran que las sustituciones se distribuyeron aleatoriamente respecto a la posición del genoma para esa proteína (French y Stenger, 2005). Sin embargo, estudios de tres cepas de WSMV (dos de EEUU y una de México), mostraron que las sustituciones de nucleótidos encontradas no se distribuyeron aleatoriamente en el genoma viral, encontrando más variación dentro de las proteínas P1, HC-Pro y CP, y menos dentro de la P3 (Choi *et al.*, 2001; Stenger *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los estudios antes mencionados dado que los genes P1 y HC-Pro fueron los que presentaron mayor número de mutaciones y el P3 menor. La proteína P1 modula la replicación viral y es supresora del silenciamiento génico de RNA, esta última función característica exclusiva de los

tritimovirus (Young *et al.*, 2012). Además, la región amino-terminal de las proteínas virales son clivadas autocatalíticamente por la proteasa P1 para producir la proteína madura (Choi *et al.*, 2002). Es de esperar que la proteína P1, que posee múltiples funciones con interacción con las proteínas del hospedante, presente variabilidad. Mientras que para el gen que codifica para la HC-Pro además de presentar una variabilidad alta se localizó un núcleo de 3 sitios con mutaciones sinónimas y no-sinónimas cercanas compartidas por cuatro aislamientos. La HC-Pro comparte dos funciones, una es la mediación de la transmisión por vector, en este caso, transmisión de forma semipersistente del WSMV por el ácaro; y la otra, actividad cistein proteínasa, como la HC-Pro de los potyvirus (Stenger *et al.*, 2005). Antecedentes sobre análisis de mutación sugieren que la HC-Pro del WSMV no posee un rol indispensable en la replicación, el movimiento o la encapsidación como en otros potyvirus (Stenger *et al.*, 2006). Las mutaciones aquí encontradas para la HC-Pro y localizadas en el extremo 5' proximal, donde hay antecedentes que mapean los determinantes de la transmisión por el ácaro, podrían indicar alguna presión selectiva diferencial en la transmisión por su vector. Otro gen en donde se encontró un sitio con mutaciones no-sinónimas, en la región central de la proteína, compartidas por cinco aislamientos de WSMV es el que codifica para la P3. La proteína P3 fue relacionada en cuanto a su función, con la replicación y el movimiento (Choi *et al.*, 2005). Choi y col. (2001) encontraron una región de 400 nucleótidos, correspondiente al extremo 3' de la proteína P3, sorprendentemente deficiente en sustituciones silenciosas, y propusieron que la falta de tales sustituciones se debió a un elemento RNA regulador en *cis* (Stenger *et al.*, 2002).

Otro núcleo de sitios con mutaciones no-sinónimas cercanas y compartidas por cuatro aislamientos está localizado en el gen que codifica para la proteína de inclusión nuclear menor NIa. La NIa posee dos dominios que mediante autoprotólisis produce dos productos, la proteína viral VPg en el dominio amino-terminal y la serin-proteasa (NIa-Pro) en el carboxilo terminal. VPg es una proteína multifuncional involucrada en la replicación, traducción y movimiento (Schaad *et al.*, 1997; Puustinen *et al.*, 2004; Eskelin *et al.*, 2011). VPg se une al extremo 5' del genoma viral mediante un residuo Tyr y recluta los factores iniciadores de la traducción eIF4E o su isoforma eIF(iso)4E, interacción

crucial para la infección (Robaglia y Caranta, 2005). NIa-Pro posee actividad de unión a RNA e interactúa con la polimerasa RNA dependiente de RNA (proteína NIb) en la replicación viral (Allison *et al.*, 1986; Domier *et al.*, 1987; Daròs *et al.*, 1999). Existen reportes de otros productos derivados del extremo carboxilo-terminal de NIa (Parks *et al.*, 1995). Con relación al gen que codifica para la CP, encargada de encapsidar el genoma viral y con antecedentes que el extremo carboxilo-terminal está involucrado en la determinación del rango de hospedantes mediando el movimiento a larga distancia (Tatineni *et al.*, 2014), no se encontraron sitios con mutaciones compartidas por distintos aislamientos del WSMV en este trabajo.

Los genes 6K1 y 6K2 presentaron el menor número de mutaciones para todos los aislamientos del WSMV estudiados (Fig. 3.3). 6K1 y 6K2 son las proteínas más pequeñas codificadas por el WSMV y de similar peso molecular (Stenger *et al.*, 1998). Por el momento, no tienen una función establecida para este virus, sólo se postula a la proteína 6K1 involucrada en la replicación viral. Estudios recientes sobre la función de 6K1 para el potyvirus *Plum pox virus* (PPV) demostraron que la mutación por delección de una región de la proteína o de cualquier motivo corto (desde 5 a 13 aa) impide la replicación del virus (Cui y Wang, 2016). Sobre 6K2 se demostró para el *Tabacco etch virus* (TEV), otro potyvirus, que es una proteína integral de membrana que induce la formación de vesículas derivadas del retículo endoplasmático, relacionadas con los cloroplastos para formar el complejo de replicación (Restrepo-Hartwig y Carrington, 1994). La replicación de los virus con genoma de RNA está asociada con la formación de vesículas membranosas intracelulares derivadas del virus, las cuales representan la estructura donde se ancla el complejo de replicación viral confinándolo y de esta manera protegiéndolo de los mecanismos de defensa de la planta inducidos por dsRNA, productos intermedios de la replicación viral. Para el caso de los potyvirus, se sugirió que secuencialmente recluta el retículo endoplasmático y luego el cloroplasto para la replicación del virus (Wei *et al.*, 2010). Los resultados de este trabajo sugieren que las proteínas 6K1 y 6K2 del WSMV podrían tener una función homóloga en la replicación viral, ser conservada dentro de los potyvirus y cualquier mutación podría ocasionar disminución de la replicación.

La información molecular de las proteínas virales del WSMV descritas anteriormente contribuye a entender los mecanismos de infección del virus y a desarrollar estrategias antivirales duraderas. Por ejemplo, los genes 6K1 y 6K2 se postulan como excelentes candidatos para construir eventos transgénicos resistentes al WSMV por la escasa variabilidad que presentaron. Sin embargo, las construcciones desarrolladas hasta el momento para generar plantas de trigo transgénicas al WSMV fueron: la secuencia completa de la NIB y de la CP (Sivamani *et al.*, 2000; Sivamani *et al.*, 2002), una hebilla de RNA con blanco en la secuencia NIa (Fahim *et al.*, 2010), y un ami-RNA policistrónico blanco de 5 secuencias genómicas (5'UTR, de la P3 en la región pipo y aguas arriba de la misma, P1, HC-Pro) (Fahim *et al.*, 2012). En este último caso, la selección de las secuencias blanco se realizó mediante la utilización de programas que buscan sitios adecuados para construcción de miRNA en regiones conservadas del genoma viral, sin tener en cuenta la variabilidad intra-hospedante de esas regiones. Resulta interesante incluir en tal diseño los datos de variabilidad del genoma aportados en este trabajo para generar resistencia a largo plazo evitando posibles quiebres de la misma.

CONCLUSIONES

Se encontraron diferentes grados de diversidad intra-hospedante y distribución de mutaciones sinónimas y no sinónimas a lo largo del genoma dependiendo del aislamiento de WSMV. Tres aislamientos provenientes de tres subregiones trigueras diferentes se distinguieron por su mayor diversidad y distribución de mutaciones a lo largo de su genoma. Sin embargo, diez presentaron baja diversidad intra-hospedante. Se logró identificar regiones de baja variabilidad genética que serían blancos adecuados para desarrollar plantas transgénicas resistentes al WSMV. Además, se registraron sitios con mutaciones no-sinónimas interesantes para estudios de interacción trigo-WSMV-*A. tosicHELLa*.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Leal R., Duffy S., Xiong Z., Hammond R.W. and Elena S.F. 2011. Advances in plant virus evolution: translating evolutionary insights into better disease management. *Phytopathology* 101: 1136–1148.
- Akamatsu S., Hayes C.N., Ochi H., Uchida T., Kan H., Murakami E., Abe H., Tsuge M., Miki D., Akiyama R., Hiraga N., Imamura M., Aikata H., Kawaoka T., Kawakami Y. and Chayama K. 2015. Association between variants in the interferon lambda 4 locus and substitutions in the hepatitis C virus non-structural protein 5A. *J. Hepatol.* 63: 554–563.
- Ali A., Li H., Schneider W.L., Sherman D.J., Gray S., Smith D. and Roossinck M.J. 2006. Analysis of genetic bottlenecks during horizontal transmission of *Cucumber mosaic virus*. *J. Virol.* 17: 8345-50.
- Aljabr W., Touzelet O., Pollakis G., Wu W., Munday D.C., Hughes M., Hertz-Fowler C., Kenny J., Fearn R., Barr J.N, Matthews D.A, and Hiscox J.A. 2016. Investigating the Influence of Ribavirin on Human Respiratory Syncytial Virus RNA Synthesis by Using a High-Resolution Transcriptome Sequencing Approach. *J. Virol.* 90: 4876–4888.
- Allison R., Johnston R.E. and Dougherty W.G. 1986. The nucleotide sequence of the coding region of tobacco etch virus genomic RNA: evidence for the synthesis of a single polyprotein. *Virology* 154: 9–20.
- Artyomenko A., Wu N.C., Mangul S., Eskin E., Sun R. and Zelikovsky A. 2016. Long Single-Molecule Reads Can Resolve the Complexity of the Influenza Virus Composed of Rare, Closely Related Mutant Variants. En: Singh M. (eds) *Research in Computational Molecular Biology. RECOMB 2016. Lecture Notes in Computer Science* vol 9649. Springer, Cham. pp. 164-175.
- Bartels M., French R., Graybosch R.A. and Tatineni S. 2016. *Triticum mosaic virus* exhibits limited population variation yet shows evidence of parallel evolution after replicated serial passage in wheat. *Virology* 492: 92-10.
- Beerenwinkel N. and Zagordi O. 2011. Ultra-deep sequencing for the analysis of viral populations. *Curr. Opin. Virol.* 1: 413–418. doi: 10.1016/j.coviro.2011.07.008.
- Bimber B.N., Dudley D.M., Lauck M., Becker E.A., Chin E.N., Lank S.M., Grunenwald H.L., Caruccio N.C., Maffitt M., Wilson N.A., Reed J.S., Sosman J.M., Tarosso L.F., Sanabani S., Kallas E.G., Hughes A.L. and O'Connor D.H. 2010. Whole-genome characterization of human and simian immunodeficiency virus intrahost diversity by ultradeep pyrosequencing. *J. Virol.* 84: 12087–12092.
- Bordería A.V., Lorenzo-Redondo R., Pernas M., Casado C., Alvaro T., Domingo E. and Lopez-Galindez C. 2010. Initial fitness recovery of HIV-1 is associated with quasispecies heterogeneity and can occur without modifications in the consensus sequence. *PLoS One* 5:e10319.
- Burch C.L. and Chao L. 2000. Evolvability of an RNA virus is determined by its mutational neighborhood. *Nature* 406: 625–628.
- Carroll M.W, Matthews D.A, Hiscox J.A., Elmore M.J., Pollakis G., Rambaut A., Hewson R., García-Dorival I., Bore J.A, Koundouno R, Abdellati S., Afrough B., Aiyepada J., Akhilomen P., Asogun D., Atkinson B., Badusche M., Bah A., Bate S., Baumann

- J., Becker G., Becker-Ziaja B., Bocquin A. and Borremans B. 2015. Temporal and spatial analysis of the 2014–2015 Ebola virus outbreak in West Africa. *Nature* 524: 97–101.
- Chachage M., Pollakis G., Kuffour E.O., Haase K., Bauer A., Nadai Y., Podola L., Clowe P.s, Schiemann M., Henkel L., Hoffmann D., Joseph S., Bhuju S., Maboko L., Sarfo F.S., Eberhardt K., Hoelscher M., Feldt T., Saathoff E. and Geldmacher C. 2016. CD25+ FoxP3+ Memory CD4 T Cells Are Frequent Targets of HIV Infection In Vivo. *J. Virol.* 90(20): 8954–8967.
- Choi I.R., Hall J.S., Henry M., Zhang L. and Hein G.L. 2001. Contributions of genetic drift and negative selection on the evolution of three strains of wheat streak mosaic tritivirus. *Arch. Virol.* 146: 619–28.
- Choi I.R., Horken K.M., Stenger D.C. and French R. 2002. Mapping of the P1 proteinase cleavage site in the polyprotein of *Wheat streak mosaic virus* (genus Tritivirus). *J. Gen. Virol.* 83: 443–50.
- Choi IR, Horken KM, Stenger DC and French R. 2005. An internal RNA element in the P3 cistron of *Wheat streak mosaic virus* revealed by synonymous mutations that affect both movement and replication. *J. Gen. Virol.* 86: 2605–2614.
- Codoner F.M., Daros J.A., Sole R.V. and Elena S.F. 2006. The fittest versus the flattest: experimental confirmation of the quasispecies effect with subviral pathogens. *PLoS Pathog.* 2:e136.
- Combe M. and Sanjuán R. 2014. Variation in RNA virus mutation rates across host cells. *PLoS Pathog.* 10(1):e1003855.
- Cuevas J.M., Willemsen A., Hillung J., Zwart M.P. and Elena S.F. 2015. Temporal dynamics of intrahost molecular evolution for a plant RNA virus. *Mol Biol Evol.* 32: 1132–1147.
- Cui H. and Wang A. 2016. *Plum pox virus* 6K1 protein is required for viral replication and targets the viral replication complex at the early stage of infection. *J. Virol.* 90: 5119–5131.
- Daròs J.A., Schaad M.C. and Carrington J.C. 1999. Functional analysis of the interaction between VPg-proteinase (NIa) and RNA polymerase (NIb) of tobacco etch potyvirus, using conditional and suppressor mutants. *J. Virol.* 73: 8732–40.
- Dotz M., Roehr J.T., Ahmed R. and Dieterich C. 2012. FLEXBAR—flexible barcode and adapter processing for next-generation sequencing platforms. *Biology (Basel)* 1: 895–905.
- Domier L.L., J.G. Shaw and R.E. Rhoads. 1987. Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna-, como-, and caulimoviral proteins. *Virology* 158: 20–27.
- Domingo E., Sheldon J. and Perales C. 2012. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 76(2): 159–216.
- Domingo E. 1999. Quasispecies. In: Granoff A, Webster RG, editors. *Encyclopedia of virology*. London: Academic Press. p. 1431–1436.
- Domingo E., 2002. Quasispecies theory in virology. *J. Virol.* 76: 463–465.
- Domingo E., Biebricher C.K., Eigen M. and Holland J.J. 2001. Quasispecies and RNA Virus Evolution: Principles and Consequences. Landes Bioscience, Georgetown, TX.
- Domingo E., Martinez-Salas E., Sobrino F., de la Torre J.C., Portela A., Ortin J., Lopez-Galindez C., Perez-Brena P., Villanueva N., Najera R., VandePol S., Steinhauser D.,

- DePolo N. and Holland, J. 1985. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance—A review. *Gene* 40.:1-8.
- Eigen M. 1971. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* 58(10): 465-523.
- Eigen M. 1996. On the nature of virus quasispecies. *Trends Microbiol.* 4:216–218.
- Elena S.F. and Sanjuan R. 2007. Virus evolution: insights from an experimental approach. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38: 27–52.
- Eskelin K., Hafrén A., Rantalainen K.I. and Mäkinen K. 2011. Potyviral VPg enhances viral RNA Translation and inhibits reporter mRNA translation in planta. *J. Virol.* 85: 9210-21.
- Fahim M., Ayala-Navarrete, L., Millar, A.A. and Larkin P.J. 2010. Hairpin RNA derived from viral NIa gene confers immunity to wheat streak mosaic virus infection in transgenic wheat plants. *Plant Biotechnol. J.* 8: 821-834.
- Fahim M., Millar A.A., Wood C.C. and Larkin P.J. 2012. Resistance to *Wheat streak mosaic virus* generated by expression of an artificial polycistronic microRNA in wheat. *Plant Biotechnol. J.* 2: 50–163.
- French R. and Stenger D.C. 2005. Population structure within lineages of *Wheat streak mosaic virus* derived from a common founding event exhibits stochastic variation inconsistent with the deterministic quasi-species model. *Virology* 343: 179–189.
- French R. and Stenger D.C. 2003. Evolution of *wheat streak mosaic virus*: dynamics of population growth within plants may explain limited variation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 199–214.
- García-Arenal F., Fraile A. and Malpica J.M. 2003. Variation and evolution of plant virus populations. *International Microbiology* 6(4): 225-232.
- Di Giallonardo F., Töpfer A., Rey M., Prabhakaran S., Duport Y., Leemann C., Schmutz S., Campbell N.K., Joos B., Lecca M.R., Patrignani A., Däumer M., Beisel C., Rusert P., Trkola A., Günthard H.F., Roth V., Beerenwinkel N. and Metzner K.J. 2014. Full-length haplotype reconstruction to infer the structure of heterogeneous virus populations. *Nucleic Acids Res.* 42: 1–12. pmid:24376271.
- Gilles A., Meglécz E., Pech N., Ferreira S., Malausa T. and Martin J.F. 2011. Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *BMC Genomics* 12:245.
- Grubaugh N.D., Smith D.R., Brackney D.E., Bosco-Lauth A.M., Fauver J.R., Campbell C.L., Felix T.A., Romo H., Duggal N.K., Dietrich E.A., Eike T., Beane J.E., Bowen R.A., Black W.C., Brault A.C. and Ebel G.D. 2015. Experimental evolution of an RNA virus in wild birds: evidence for host-dependent impacts on population structure and competitive fitness *PLoS Pathog.* 11: e1004874. 19p.
- Hall J.S., French R., Morris T.J., Stenger D.C. 2001b. Structure and temporal dynamics of populations within wheat streak mosaic virus isolates. *J. Virol.* 75(21): 10231-10243.
- Hall J.S., French R., Hein G.L., Morris T.J. and Stenger D.C. 2001a. Three distinct mechanisms facilitate genetic isolation of sympatric *wheat streak mosaic virus* lineages. *Virology* 282: 230–236.
- Holmes E.C. and Moya A. 2002. Is the quasispecies concept relevant to RNA viruses? *J. Virol.* 76(1): 460-465.

- Jayasundara D., Saeed I., Maheswararajah S., Chang B., Tang S.L. and Halgamuge S.K. 2015a. ViQuaS: an improved reconstruction pipeline for viral quasispecies spectra generated by next-generation sequencing. *Bioinformatics* 31(6): 886–896.
- Jayasundara D., Saeed I., Chang B., Tang S.L. and Halgamuge S.K. 2015b. Accurate reconstruction of viral quasispecies spectra through improved estimation of strain richness *BMC Bioinform.* 16(18): 1–12.
- Jridi C., Martin J.F., Marie-Jeanne V., Labonne G. and Blanc S. 2006. Distinct viral populations differentiate and evolve independently in a single perennial host plant. *J Virol.* 80(5): 2349–57.
- Li H. and Roossinck M.J. 2004. Genetic bottlenecks reduce population variation in an experimental RNA virus population. *J. Virol.* 78: 10582–10587.
- Liu L., Li Y., Li S., Hu N., He Y., Pong R., Lin D., Lu L. and Law M. 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems, *Biomed. Biotechnol.* Article ID 251364, 11 p.
- Lorenzo-Redondo R., Fryer H.R., Bedford T., Kim E.Y., Archer J., Pond S.L.K., Chung Y.S., Penugonda S., Chipman J., Fletcher C.V., Schacker T.W., Malim M.H., Rambaut A., Haase A.T., McLean A.R. and Wolinsky S.M. 2016. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature* 530(7588): 51–56.
- Macalalad A.R., Zody M.C., Charlebois P., Lennon N.J., Newman R.M., Malboeuf C.M., Ryan E.M., Boutwell C.L., Power K.A., Brackney D.E., Pesko K.N., Levin J.Z., Ebel G.D., Allen T.M., Birren B.W. and Henn M.R. 2012. Highly sensitive and specific detection of rare variants in mixed viral populations from massively parallel sequence data. *PLoS Comput. Biol.* 8(3): e1002417.
- McElroy K., Thomas T. and Luciani F. 2014. Deep sequencing of evolving pathogen populations: applications, errors, and bioinformatic solutions. *Microb. Inform. Exp.* 4:1.
- Miralles R., Gerrish P.J., Moya A. and Elena S.F. 1999. Clonal interference and the evolution of RNA viruses. *Science* 285: 1745–1747.
- Novella I.S., Elena S.F., Moya A., Domingo E. and Holland J.J. 1995. Size of genetic bottlenecks leading to virus fitness loss is determined by mean initial population fitness. *J. Virol.* 69: 2869–2872.
- Oberle C., Joos B., Rusert P., Campbell N.K., Beauparlant D., Kuster H., Weber J., Schenkel C.D., Scherrer A.U., Magnus C., Roger K, Rieder P, Niederöst B., Braun D.L., Pavlovic J., Böni J., Yerly S., Klimkait T., Aubert V., Trkola A., Metzner K. and Günthard H.F. 2016. Tracing HIV-1 transmission: envelope traits of HIV-1 transmitter and recipient pairs. *Retrovirology* 13(1): 62.
- Ogishi M., Yotsuyanagi H., Tsutsumi T., Gatanaga H., Ode H., Sugiura W., Moriya K., Oka S., Kimura S. and Koike K. 2015. Deconvoluting the Composition of Low-Frequency Hepatitis C Viral Quasispecies: Comparison of Genotypes and NS3 Resistance-Associated Variants between HCV/HIV Coinfected Hemophiliacs and HCV Monoinfected Patients in Japan. *PLoS One* 10(3): e0119145.
- Orton R.J., Wright C.F., Morelli M.J., Juleff N., Thébaud G., Knowles N.J., Valdazo-González B., Paton D.J., King D.P. and Haydon D.T. 2013. Observing micro-evolutionary processes of viral populations at multiple scales. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 368(1614): 20120203.

- Parks T.D., Howard E.D., Wolpert T.J., Arp D.J. and Dougherty W.G. 1995. Expression and purification of a recombinant tobacco etch virus NIa proteinase: biochemical analyses of the full-length and a naturally occurring truncated proteinase form. *Virology*. 210: 194-201.
- Poh W.T., Xia E., Chin-Inmanu K., Wong L.P., Cheng A.Y., Malasit P., Suriyaphol P., Teo Y.Y. and Ong R.T. 2013. Viral quasispecies inference from 454 pyrosequencing. *BMC Bioinformatics* 14(1): 355.
- Prabhakaran S., Rey M., Zagordi O., Beerenwinkel N. and Roth V. 2013. HIV Haplotype Inference Using a Propagating Dirichlet Process Mixture Model. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform.* 11(1): 182-91.
- Prosperi M.C. and Salemi M. 2012. QuRe: software for viral quasispecies reconstruction from next-generation sequencing data *Bioinformatics* 28: 132–133.
- Puustinen P. and Mäkinen K. 2004. Uridylylation of the potyvirus VPg by viral replicase N1b correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *J. Biol. Chem.* 279(37):38103-10.
- Restrepo-Hartwig M.A. and Carrington J.C. 1994. The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane-associated and involved in viral replication. *J. Virol.* 68: 2388–2397.
- Robaglia C. and Caranta C. 2006. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci.* 11: 40-5. doi:10.1016/j.tplants.2005.11.004.
- Rodriguez-Cerezo E., Elena S.F., Moya A., Gacia-Arenal F. 1991. High genetic stability in natural populations of the plant RNA virus Tobacco mild green mosaic virus. *J. Mol. Evol.* 32: 328–332.
- Safari M. and Roossinck M.J. 2014. How does the genome structure and lifestyle of a virus affect its population variation? *Curr Opin. Virol.* 9: 39-44.
- Sanjuan R., Cuevas J.M., Furio V., Holmes E.C. and Moya A. 2007. Selection for robustness in mutagenized RNA viruses. *PLoS Genet.* 3:e93.
- Schaad M.C., Lellis A.D. and Carrington J.C. 1997. VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J. Virol.* 71: 8624-31.
- Schneider W.L. and Roossinck M.J. 2001. Genetic Diversity in RNA Virus Quasispecies Is Controlled by Host-Virus Interactions *J. Virol.* 75(14):6566-71.
- Shao W., Boltz V.F., Spindler J.E., Kearney M.F., Maldarelli F., Mellors J. W., Stewart C., Volfovsky N., Levitsky A., Stephens R.M. and Coffin J.M. 2013. Analysis of 454 sequencing error rate, error sources, and artifact recombination for detection of Low-frequency drug resistance mutations in HIV-1 DNA. *Retrovirology* 10:18.
- Sivamani E., Brey C.W., Talbert L. E., Young M.A., Dyer W.E., Kaniewski W.K. and Qu R. 2002. Resistance to *Wheat streak mosaic virus* in transgenic wheat engineered with the viral coat protein gene. *Transgenic Res.* 11: 31-41.
- Sivamani E., Brey C.W., Dyer W.E., Talbert L.E. and Qu R. 2000. Resistance to *Wheat streak mosaic virus* in transgenic wheat expressing the viral replicase (N1b) gene. *Mol Breed.* 6: 469-477.
- Stenger D.C. and French, R. 2009. *Wheat streak mosaic virus* genotypes introduced to Argentina are closely related to isolates from the American Pacific Northwest and Australia. *Archiv. Virol.* 154: 331-336.

- Stenger D.C., Hein G.L. and French R. 2006. Nested deletion analysis of *Wheat streak mosaic virus* HC-Pro: mapping of domains affecting polyprotein processing and eriophyid mite transmission. *Virology* 350: 465-474.
- Stenger D.C., Hein G.L., Gildow F.E., Horken K.M. and French R. 2005. Plant virus HC-Pro is a determinant of eriophyid mite transmission. *J. Virol.* 79: 9054–9061.
- Stenger D.C., Seifers D.L. and French R. 2002. Patterns of polymorphism in *Wheat streak mosaic virus*: sequence space explored by a clade of closely related viral genotypes rivals that between the most divergent strains. *Virology* 302: 58-70.
- Stenger D.C., Hall J.S., Choi I.-R. and French R. 1998. Phylogenetic-relationships within the family Potyviridae: *Wheat streak mosaic virus*-and *brome streak mosaic virus* are not members of the genus Rymovirus. *Phytopathology* 88: 782-787.
- Steninhauer D.A., Domingo E. and Holland J.J. 1992. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* 122: 288-2811.
- Tatineni S., Wosula S.N., Bartels M., Hein G.L. and Graybosch R.A. 2016. Temperature-dependent Wsm1 and Wsm2 gene-specific blockage of viral long-distance transport provides resistance to *Wheat streak mosaic virus* and *Triticum mosaic virus* in wheat. *Mol. Plant Microbe Interact.* 29: 724 -738.
- Tatineni S., Kovacs F. and French, R. 2014. *Wheat streak mosaic virus* infects systemically despite extensive coat protein deletions: Identification of virion assembly and cell-to-cell movement determinants. *J. Virol.* 88: 1366-1380.
- Töpfer A., Zagordi O., Prabhakaran S., Roth V., Halperin E. and Beerenwinkel N. 2013. Probabilistic inference of viral quasispecies subject to recombination *J. Comput. Biol.* 20 (2): 113–123.
- Wei T., Huang T.S., McNeil J., Laliberte J.F., Hong J., Nelson R.S. and Wang, A. 2010. Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *J. Virol.* 84: 799-809.
- Wu N.C., De La Cruz J., Al-Mawsawi L.Q., Olson C.A., Qi H., Luan H.H., Nguyen N., Du Y., Le S., Wu T.T., Li X., Lewis M.J., Yang O.O. and Sun R. 2014. HIV-1 Quasispecies Delineation by Tag Linkage Deep Sequencing. *PLoS ONE* 9(5): e97505.
- Young B.A., Stenger D.C., Qu F., Morris T.J., Tatineni S. and French R. 2012. Tritimovirus P1 functions as a suppressor of RNA silencing and an enhancer of disease symptoms. *Virus Res.* 163: 672–677.

CAPÍTULO 4

DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DEL *Triticum mosaic virus* (TriMV) EN EL CULTIVO DE TRIGO EN ARGENTINA

INTRODUCCIÓN

Durante el año 2006, líneas de trigo con resistencia termo-sensible a *Wheat streak mosaic virus* (WSMV), entre ellas la denominada RonL, presentaron síntomas sistémicos de mosaico característicos de virosis en el estado de Kansas en EEUU. Sin embargo, esas plantas no estaban infectadas con WSMV sino con un nuevo virus cuyo nombre propuesto fue *Triticum mosaic virus* (TriMV) (Seifers *et al.*, 2008). El mismo grupo de investigadores luego demostró que TriMV es transmitido por el ácaro eriófido *Aceria tosichella* (Seifers *et al.*, 2009), el mismo vector de WSMV (Slykhuis, 1955) y *High Plains wheat mosaic virus* (HPWMoV) (Seifers *et al.*, 1997). Desde entonces, se comenzó a referir a *A. tosichella* como el vector de un complejo viral conformado por WSMV, HPWMoV y TriMV (de Oliveira, 2013; Navia *et al.*, 2013; McMechan *et al.*, 2014).

La presencia de TriMV se ha reportado hasta el momento solamente en EEUU. Después de su primera descripción, TriMV se ha identificado en varias zonas de ese país incluyendo los estados de Nebraska, Oklahoma, Dakota del Sur, Wyoming, Texas, Colorado, Dakota del Norte, Montana y Kansas (Seifers *et al.*, 2011; Byamukama *et al.*, 2013). Se han reportado pérdidas de rendimiento de hasta el 70%, ocasionada por esta virosis dependiendo del cultivar de trigo en ese país (Seifers *et al.*, 2011; Byamukama *et al.*, 2014). TriMV infecta a trigo y también hay reportes de infección a cebada, centeno, avena, triticale y ciertas especies de malezas como hospedantes alternativos de este virus (Seifers *et al.*, 2010; Tatineni *et al.*, 2010). Por el contrario, se ha demostrado que TriMV no infecta maíz (Seifers *et al.*, 2010). Por otra parte, hasta el momento, no se conoce si TriMV se transmite por semilla.

Se ha caracterizado molecularmente al TriMV, ubicándolo como la especie tipo del género *Poacevirus* en la familia *Potyviridae* (Fellers *et al.*, 2009; Tatineni *et al.*, 2009; Adams *et al.*, 2011). TriMV está constituido por un segmento de RNA simple cadena de sentido positivo, de 10266 nucleótidos con organización genómica similar a otras especies de potyvirus (Fig. 4.1) (Fellers *et al.*, 2009; Tatineni *et al.*, 2009).

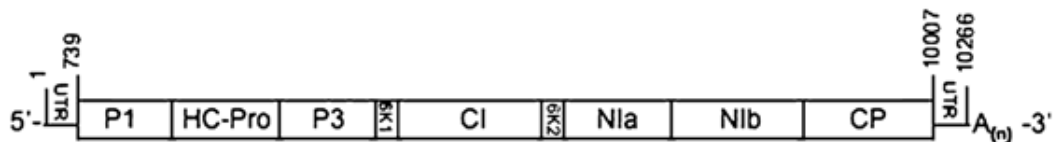


Fig. 4.1. Representación esquemática de la organización del genoma del *Triticum mosaicus virus* (TriMV) y las proteínas virales.

TriMV induce síntomas que resultan indistinguibles a los de WSMV los cuales incluyen principalmente mosaico, moteado y rayas cloróticas, haciendo dificultosa la identificación de ambos virus basados en la sintomatología (Seifers *et al.*, 2008; Tatineni *et al.*, 2013). Predominantemente, TriMV se presenta en trigos de EEUU en infecciones dobles con WSMV (Byamukama *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la coinfección de WSMV y TriMV en trigo da como resultado un sinergismo con un aumento de la severidad de síntomas, una elevación en la concentración de ambos virus y consecuentemente un aumento en la pérdida de biomasa que depende del cultivar (Tatineni *et al.*, 2010; Byamukama *et al.*, 2012). En la campaña 2012, se presentó en nuestro país una epifitía de origen viral en la zona sureste de la provincia de Córdoba, específicamente en las localidades de Leones, Corral de Bustos y Monte Buey. Se observaron lotes de trigo con incidencia de hasta el 100% en el cultivar BioINTA 3005, con síntomas de mosaico intenso, enanismo y severa disminución en la producción, llegando algunos casos a no ser cosechados (Fig. 4.2). Las plantas fueron analizadas y se confirmó la presencia de WSMV y HPWMoV (Alemandri *et al.*, 2013). Debido a la intensidad de los síntomas observados y a la alta incidencia presentada, se especuló sobre la posibilidad de la presencia del tercer virus del complejo transmitido por *A. tosichella*.



Fig. 4.2. Lote de trigo, cultivar BioINTA 3005, con 100% de incidencia de WSMV en la localidad de Leones, provincia de Córdoba en la campaña 2012.

El objetivo del presente capítulo fue detectar la presencia del *Triticum mosaic virus* (TriMV) en trigo, en Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material evaluado

Se analizaron muestras de hojas de trigo, y una de Triticale, de diferentes fuentes con el fin de contar con material vegetal en condiciones que permitieran realizar análisis serológicos y moleculares.

Para las detecciones serológicas (Tabla 4.2), se utilizó material vegetal recolectado a campo correspondiente a estudios previos, infectado con WSMV y conservado a -20°C (Muestras N°1 a 9), plantas provenientes de los mismos muestreos de trigo utilizadas para caracterizar la diversidad del WSMV en los Capítulos 2 y 3 de esta Tesis (se utilizaron muestras de 7 de los 13 aislados debido a que no se contaba con material vegetal suficiente) (Muestras N°10 a 14), y muestras recolectadas a campo en la campaña 2012 en

las localidades de Leones, Corral de Bustos y Monte Buey (sureste de la provincia de Córdoba) (Muestras N°15 a 21). Estas tres localidades se seleccionaron debido a que, como se mencionó en la introducción de este capítulo, lotes de trigo presentaron en ese año una sintomatología característica de virosis muy severa y una incidencia de plantas con síntomas de hasta el 100%. Los síntomas observados en esos lotes fueron mosaico intenso, enanismo y severa disminución en la producción. También, se analizaron muestras de un ensayo a campo de transmisión de WSMV mediante el ácaro vector (Muestras N°22 a 24) correspondiente a otro estudio (Alemandri *et al.*, 2015).

Para los análisis moleculares (Tabla 4.3), se emplearon muestras conservadas a -80°C, las que incluyeron las mismas muestras recolectadas a campo en la campaña 2012 descritas anteriormente (Muestras N°1 y 2), otras correspondientes a tres de los aislados de WSMV empleados para los estudios de diversidad (Muestras N°3 a 5) y material del ensayo a campo transmitido con WSMV mediante el ácaro vector (Muestras N°6 a 8) (Alemandri *et al.*; 2015). También, se analizó material vegetal fresco, el cual incluyó plantas transmitidas mecánicamente con WSMV y TriMV (Muestras N°9 a 11) y plantas de trigo sobre las cuales se mantuvieron colonias de ácaros *A. tosichella* transmitiendo WSMV originarias de Monte Buey y Marcos Juárez (Muestras N°12 a 15) mantenidas en sala de cría bajo condiciones controladas, en el Instituto de Patología Vegetal del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, (IPAVE-INTA). Para dicha transmisión por vector, se colocaron plantas infectadas con el virus y vector sobre plántulas de trigo recién emergidas, las cuales fueron renovadas a plantas nuevas cada 15 días. A continuación, se detallan las condiciones de la transmisión mecánica de TriMV.

Transmisión mecánica del TriMV

Con el fin de obtener material vegetal fresco infectado con TriMV para poder realizar las detecciones moleculares, se inocularon mecánicamente 29 plantas de trigo Baguette Premium 11 al estado de primera hoja verdadera, con un extracto preparado a partir de plantas conservadas a -20°C, correspondientes a la muestra N°8: Tandil Premium 11, resultando positiva para el TriMV según método serológico (Tabla 4.2). El extracto se

preparó macerando las plantas infectadas con TriMV con tampón fosfato de sodio pH 7,4 en una relación 1:5 (peso/volumen), agregando una pequeña cantidad de carbón vegetal y DIECA (dietil ditiocarbamato de sodio), como agente quelante de cobre, y carborundum como abrasivo. Las plantas se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz (fotoperíodo de 16 hs. de luz) y temperatura (25 ± 3 °C), y luego se evaluaron los síntomas y se recolectaron las muestras de hoja a los 29 días después de la inoculación. Las mismas fueron almacenadas a -80°C para los posteriores análisis serológicos y moleculares, en algunos casos, y en otros fueron directamente utilizadas para la detección del virus. De ellas, se seleccionaron tres plantas con sintomatología más severa para ser analizadas por serología y molecularmente (Muestras N°9 a 11, Tabla 4.3).

Detección del TriMV mediante técnicas serológicas

Se utilizaron tres sueros diferentes para la detección de TriMV. En primer lugar, se utilizó un suero enviado por el Dr. Jacob Price (Suero Price), del Plant Pathology, Texas AgriLife Research, Amarillo, Texas, Estados Unidos. Luego, se utilizó un suero comercial de Agdia (Suero Agdia). Cabe señalar, que estos dos sueros fueron obtenidos de conejo a partir de virus purificados (Price *et al.*, 2010; Agdia, 2011). Por último, se usó un suero policlonal obtenido a partir de la expresión de una proteína recombinante correspondiente a la cápside proteica del virus, cedido por el Dr. Satyanarayana Tatineni (Suero Tatineni) del United States Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Nebraska, Estados Unidos. Las condiciones empleadas para la realización de las detecciones con el Suero Agdia fueron las sugeridas por el comerciante, y para los Sueros Price y Tatineni fueron las descritas en Price y col. (2010) y Tatineni y col. (2013) respectivamente. Se utilizó un control positivo de TriMV enviado por el Dr. Price para el Suero Price, y un control positivo comercial de Agdia cuando fueron empleados los otros dos sueros. En la Tabla 4.2 y 4.3 se presentan los valores de Absorbancia relativa (Ar), definida como $Ar = \text{Absorbancia de planta analizada} / (\text{Absorbancia de planta sana promedio} + 3 \text{ desvíos estándar})$. Las muestras con valores Ar mayores a 1 se consideraron positivas.

Detección del TriMV mediante técnicas moleculares

Se realizó la extracción de RNA total de plantas empleando un kit comercial Macherey-Nagel (MN). Se utilizaron tres juegos de iniciadores para la amplificación de TriMV detallados en la Tabla 4.1. Se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR para amplificar los fragmentos del TriMV de diferentes tamaños según los iniciadores correspondientes. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa 1.5% con tampón TAE. Además, se usaron iniciadores (RBCL-C705, RBCL-H535) que amplifican un fragmento de 171 pb, correspondiente a la subunidad mayor de ribulosa bisfosfato carboxi oxigenasa (RubiscoL), empleada como control interno de planta (Nassuth *et al.*, 2000). También, se usaron iniciadores para WSMV como control de la calidad de RNA para la amplificación de un virus vegetal en la misma muestra. Fue utilizado un control positivo para TriMV, otorgado por el Dr. Francisco M. Ochoa Corona, del Department of Entomology & Plant Pathology, Oklahoma State University. Dicho control consistió en un plásmido con un fragmento inserto correspondiente a la secuencia parcial de la proteína P1, a partir de la cual fueron diseñados los iniciadores TriMV-F1APC y TriMV-R1APC (Caasi *et al.*, 2013).

Tabla 4.1. Iniciadores utilizados para la amplificación de *Triticum mosaic virus* (TriMV), *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) y un control interno de planta.

Nombre Iniciador	Secuencia	Proteína donde hibrida	Tamaño de banda (pb)	Referencia
TriMV-F	CAGTTAATGATGGATTCACG	HC-Pro	138	Ryba-White <i>et al.</i> 2009
TriMV-R	GGGTGTAAATTCAACCATT			
TriMVcp-F	AATCTGGTGTGTTAAGGATC	CP	844	John Fellers (no publicado)
TriMVcp-R	GACACGTGTACGACCATAA			
TriMV-F1APC	AACACAACGCACGACTTTCT	P1	122	Caasi <i>et al.</i> 2013
TriMV-R1APC	GCAACCCATTCCTTCTTCC			
WSMV-F	CAATCTAATAACGTATCTGTCATGGC	CP	540	Myslik <i>et al.</i> 2001
WSMV-R	CATAATGGCTCGAAGTGATGGC	CP		
RBCL-H535	CTTCCAAGGCCCGCCTCA		171	Nassuth <i>et al.</i> 2000
RBCL-C705	CATCATCTTTGGTAAAATCAAGTCCA			

RESULTADOS

En la Tabla 4.2 se muestran los resultados obtenidos mediante análisis serológicos. De 24 muestras analizadas, 13 resultaron positivas para TriMV, lo cual representa un 54% de muestras co-infectados con WSMV y TriMV. Respecto a las muestras de campo recolectadas en la campaña 2012 al sureste de la provincia de Córdoba (muestras N°10 a 14, Tabla 4.2), donde se registró una epifitía de WSMV con lotes de hasta 100% de incidencia y con presentación de sintomatología muy severa, resultaron estar infectadas con TriMV. Las demás muestras de campo positivas fueron las provenientes de Salguero (aislado WSMV09 de 2009) y Las Perdices (aislado WSMV12 de 2011) de la provincia de Córdoba, de 25 de Mayo (aislado WSMV01 de 2009) de la provincia de Buenos Aires, y de Paraná (aislado WSMV03 de 2009) de la provincia de Entre Ríos.

En relación a la transmisión mecánica de TriMV a partir de plantas fehacientemente enfermas para lograr obtener material vegetal fresco, de las 29 plantas transmitidas con la muestra N°8 (Tandil, Premium 11), 8 presentaron síntomas acentuados de mosaico y estriado en las hojas. Las tres plantas seleccionadas por su sintomatología más severa y analizadas resultaron serológicamente positivas para TriMV, logrando así transmitir mecánicamente el virus al cultivar Baguette Premium 11 (Muestra N°9, 10 y 11, Tabla 4.3).

Respecto a los resultados obtenidos mediante métodos moleculares (Tabla 4.3), no se logró la detección de TriMV utilizando tres iniciadores diferentes en las condiciones aquí empleadas, a pesar de resultar serológicamente positivas las muestras estudiadas. Sin embargo, se logró amplificar la banda esperada correspondiente a la subunidad mayor de ribulosa bisfosfato carboxi oxigenasa (RubiscoL) utilizada como control interno de planta, y en los casos que no se realizó este control, se obtuvo amplificación para WSMV indicando que la calidad de los RNA utilizados fueron adecuados y que no hubo presencia de inhibidores. Además, se logró amplificar el control positivo de TriMV cuando fue utilizado el iniciador correspondiente a dicho control. Respecto a la transmisión de TriMV mediante el ácaro vector, si bien, las plantas de trigo sobre las cuales se mantuvieron

colonias de ácaros transmitiendo WSMV resultaron serológicamente positivas para TriMV (Muestras N°12 a 15), no fue posible la amplificación de bandas a partir de ellas.

Tabla 4.2. Muestras de trigo y Triticale analizadas para *Triticum mosaic virus* mediante métodos serológicos.

Nº	Muestra ID	Fuente	TriMV	WSMV
1	Colonia Caroya. Escorpion 2002	Campo	Negativo. Suero Price	Positivo
2	Marcos Juárez 2002	Campo	Negativo. Suero Price	Positivo
3	Jesús María WSMV	Campo	Negativo. Suero Price	Positivo
4	Marcos Juárez 2006	Campo	Negativo. Suero Price	Positivo
5	Venado Tuerto	Campo	Negativo. Suero Price	Positivo
6	G. Montaner La Fe Ing. Quatrocho	Campo	Negativo. Suero Price	Positivo
7	Miramar TE 2009	Campo	Negativo. Suero Price	Positivo
8	Tandil Premium 11, 2009	Campo	Positivo ¹ Ar:1,4. Suero Price	Positivo
9	Buenos Aires. Miramar 2009	Campo	Negativo. Suero Price	Positivo
10	M 1: Corral de Bustos 2012	Campo	Positivo Ar:1,7. Suero Agdía	Positivo
11	M 2: Leones 2012. Bionta 3005	Campo	Positivo Ar:2,9. Suero Agdía	Positivo
12	M 3: Monte Buey, B 17 J1, 2012	Campo	Positivo Ar:1,7. Suero Agdía	Positivo
13	M 4: Monte Buey, B 17 J 2, 2012	Campo	Positivo Ar:3,1. Suero Agdía	Positivo
14	M 5: Monte Buey, B 11, 2012	Campo	Positivo Ar:2,3. Suero Agdía	Positivo
15	Aislado WSMV02	Campo	Negativo. Suero Agdía	Positivo
16	Aislado WSMV03	Campo	Positivo Ar:1,5. Suero Agdía	Positivo
17	Aislado WSMV05	Campo	Negativo. Suero Agdía	Positivo
18	Aislado WSMV09	Campo	Positivo Ar:1,3. Suero Agdía	Positivo
19	Aislado WSMV12 (Triticale)	Campo	Positivo Ar:1,1. Suero Agdía	Positivo
20	Aislado WSMV01	Campo	Positivo Ar:1,4. Suero Agdía	Positivo
21	Aislado WSMV11	Campo	Negativo. Suero Agdía	Positivo
22	M 9, KS93WGRC27/P.Super	Ensayo campo con vector + WSMV y TriMV	Positivo Ar:2,3. Suero Tatineni	Positivo
23	M 42, TBIO Pionero	Ensayo campo con vector + WSMV y TriMV	Positivo Ar:1,5. Suero Tatineni	Positivo
24	M 43, Baqueano	Ensayo campo con vector + WSMV y TriMV	Positivo Ar:1,8. Suero Tatineni	Positivo

¹Ar: Absorbancia relativa [Absorbancia de planta analizada/(Absorbancia de planta sana promedio + 3 desvíos estándar)].

Tabla 4.3. Muestras de trigo y Triticale analizadas para *Triticum mosaic virus* mediante métodos moleculares.

N°	Muestra ID	Fuente	ELISA	RT-PCR				
				TriMV			WSMV	
				TriMV	Nombre iniciador		Control+	WSMV-
TriMV	TriMVp- F/TriMVp- MVR	TriMV- R	FIAPC/Tri- MV-RIAPC	TriMV	F/WSMV-R			
1	M4:Monte Buey,B17J2,2012	Campo -80°C	Positivo ² Ar:3,1. Suero Agdia	Negativo	Negativo	nr	nr	Negativo
2	M5:Monte Buey,B11,2012	Campo -80°C	Positivo Ar:2,3. Suero Agdia	Negativo	Negativo	nr	nr	Positivo
3	Aislado WSMV03	Campo -80°C	Positivo Ar:1,5. Suero Agdia	Negativo	Negativo	nr	nr	Positivo
4	Aislado WSMV09	Campo -80°C	Positivo Ar:1,3. Suero Agdia	Negativo	Negativo	nr	nr	Positivo
5	Aislado WSMV12 (Triticale)	Campo -80°C	Positivo Ar:1,1. Suero Agdia	Negativo	Negativo	nr	nr	Positivo
6	M9:KS93WGRC27/P.Super	Ensayo campo c/vector + WSMV yTriMV	Positivo Ar:2,3. Suero Tatineni	³ nr	nr	Negativo	Positivo	Positivo
7	M42:TBIO Pionero	Ensayo campo c/vector + WSMV yTriMV	Positivo Ar:1,5. Suero Tatineni	nr	nr	Negativo	Positivo	Positivo
8	M43:Baqueano	Ensayo campo c/vector + WSMV yTriMV	Positivo Ar:1,8. Suero Tatineni	nr	nr	Negativo	Positivo	Positivo
9	M3:Baguette 11	¹ TM con N°8 + WSMV y TriMV	Positivo Ar:3,6. Suero Price	Negativo	Negativo	nr	nr	Positivo
10	M12:Baguette 11	TM con N°8 + WSMV y TriMV	Positivo Ar:1,3. Suero Price	Negativo	Negativo	nr	nr	Negativo
11	M25:Baguette 11	TM con N°8 + WSMV y TriMV	Positivo Ar:1,1. Suero Price	Negativo	Negativo	nr	nr	Positivo
12	M1:Inóculo Monte Buey 2012.1	Colonia ácaros infectadas con WSMV	Positivo Ar:4,7. Suero Tatineni	nr	nr	Negativo	Positivo	Positivo
13	M2:Inóculo Monte Buey 2012.2	Colonia ácaros infectadas con WSMV	Positivo Ar:2,7. Suero Tatineni	nr	nr	Negativo	Positivo	Positivo
14	M3:Inóculo Marcos Juárez 2013.1	Colonia ácaros infectadas con WSMV	Positivo Ar:3,5. Suero Tatineni	nr	nr	Negativo	Positivo	Positivo
15	M4:Inóculo Marcos Juárez 2013.2	Colonia ácaros infectadas con WSMV	Positivo Ar:2,5. Suero Tatineni	nr	nr	Negativo	Positivo	Positivo

¹TM: transmisión mecánica; ²Ar: Absorbancia relativa [Absorbancia de planta analizada/(Absorbancia de planta sana promedio + 3 desvíos estándar)]; ³nr: no realizado.

DISCUSIÓN

Fue detectado TriMV en muestras de trigo y una de Triticale, provenientes de campo de diferentes localidades de la región triguera argentina mediante métodos serológicos. Las muestras de trigo de la región del departamento Marcos Juárez de la provincia de Córdoba recolectadas en 2012, dónde se registró una sintomatología muy severa y altos niveles de incidencia de virosis, resultaron positivas para TriMV. Debido a que dichas plantas también estaban infectadas con WSMV y HPWMoV (Alemandri *et al.*, 2013), la severidad particularmente observada en esa zona en 2012, pudo deberse a la presencia de los tres virus. Se ha demostrado que infecciones mixtas de WSMV y TriMV cobran importancia debido a que estos virus exhiben sinergismo cuando coinfectan el cultivo de trigo. Dicho sinergismo se presenta mediante un aumento en los títulos de ambos virus, una mayor expresión de síntomas y un aumento en la pérdida de rendimiento (Tatineni *et al.*, 2010; Byamukama *et al.*, 2012). Respecto a la interacción de WSMV con HPWMoV, es escaso lo que se conoce, debido a que HPWMoV no se transmite mecánicamente y es necesario utilizar *A. tosichella* como vector, lo cual hace más dificultoso los estudios de este virus en forma aislada. No obstante, se reconocieron síntomas más severos en plantas infectadas con estos dos virus en observaciones a campo e invernáculo (Mahmood *et al.*, 1998; Skare *et al.*, 2006; Truol, 2009). El 54% de las muestras positivas para WSMV que se analizaron en este estudio, también estaban infectadas con TriMV. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en EEUU, donde generalmente las muestras positivas para TriMV estaban coinfectadas con WSMV (Byamukama *et al.*, 2013).

Probablemente, TriMV esté presente en nuestro país desde, aproximadamente siete años, en tres provincias argentinas, ya que las muestras recolectadas a campo en 2009 en Salguero (Córdoba), Paraná (Entre Ríos) y 25 de Mayo (Buenos Aires) resultaron positivas para esta virosis.

Respecto a la transmisión por vector, los ácaros originarios de las localidades de Monte Buey y Marcos Juárez serían capaces de transmitir TriMV, ya que las plantas

recolectadas de las colonias de eriófidos correspondientes a cada localidad resultaron también estar infectadas con dicho virus. De esta manera se logró la transmisión de TriMV mediante su vector *A. tosicHELLa* bajo condiciones controladas.

Todas las muestras que resultaron positivas para TriMV en este estudio fueron analizadas mediante técnicas serológicas. Sin embargo, no se logró la identificación molecular. Los resultados obtenidos con los controles positivos y negativos en los análisis de ELISA y RT-PCR manifestaron la correcta ejecución de las dos técnicas empleadas. Por otra parte, se descarta la posibilidad de reacción cruzada con el suero Tatineni por tratarse de anticuerpos obtenidos mediante la expresión de proteína recombinante. Asimismo, los otros dos sueros empleados tampoco presentarían reacción cruzada con WSMV, ya que el 46% de las muestras enfermas con WSMV resultaron negativas para TriMV (Tabla 4.2). Una de las causas que podrían explicar estos resultados es que TriMV se encuentre en muy baja concentración en las muestras. También, el diseño de los iniciadores utilizados podría ser no adecuado para la detección de aislados de TriMV de Argentina. Con el fin de confirmar los resultados obtenidos por serología, se realizaron en este estudio nuevas reacciones de RT-PCR con modificaciones empleando los iniciadores correspondientes al control positivo de TriMV, presumiendo una muy baja concentración viral. Las mismas implicaron, extender el tiempo de incubación durante la transcripción reversa, así como también incrementar (duplicar y triplicar) el volumen de cDNA para entrar a la reacción de PCR. A pesar de las modificaciones realizadas, no se logró la detección molecular de TriMV en las muestras analizadas. Se deberá continuar con las modificaciones y ajustes necesarios en las reacciones de RT-PCR para poder amplificar este virus. Entre otras cosas, se podrá implementar la técnica de PCR anidada, una variante de la PCR convencional, la cual comprende dos amplificaciones con distintos pares de iniciadores con el fin de incrementar la sensibilidad en la detección, así como también se podrán diseñar iniciadores degenerados para lograr amplificación y luego secuenciación.

La detección de TriMV en nuestro país hace más compleja la comprensión de la ocurrencia de la enfermedad del mosaico estriado en el cultivo de trigo, implicando nuevos

desafíos para el establecimiento de medidas de manejo para este patosistema, señalando a su vez la necesidad de su incorporación en los planes de mejoramiento.

CONCLUSIONES

Triticum mosaic virus (TriMV) está presente en Argentina, por lo que la enfermedad del mosaico estriado está compuesta por el complejo viral conformado por WSMV-HPWMoV-TriMV.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams M.J., Zerbini F.M., French R., Rabenstein F., Stenger D.C. and Valkonen J.P.T. 2011. Potyviridae. In: Adams, Andrew M.Q., Wada, Michael J., Carstens, Eric B., Lefkowitz, Elliot J. (Eds.), Virus Taxonomy. Elsevier, Oxford pp. 1069–1090.
- Agdia 2011. Publicado en Internet, disponible en <https://orders.agdia.com/products>. Activo Junio 2011.
- Alemandri V., Mattio M.F., Dumón A.D., Argüello Caro E.B., Rodríguez S.M., Fraschina J., Bainotti C. y Truol, G. 2013. Presencia de un poacevirus, nuevo género de virus recientemente propuesto, en trigos de Argentina. En: XXII Congreso Peruano y XVII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, 1 al 5 de Octubre. Lambayeque, Perú. p. 120.
- Alemandri V., Bainotti C., Rodríguez M.S., Mattio M.F., Argüello Caro E.B., Dumón A. y Truol, G. 2015. Evaluación del comportamiento de cultivares de trigo argentinos y brasileros frente a *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) y *Wheat mosaic virus* (WMoV) en infecciones artificiales. En: Jornadas Fitosanitarias Argentinas, 7 al 9 de Octubre de 2015, Santa Fe. p. 24.
- Byamukama E., Seifers D.L., Hein G.L., De Wolf E., Tisserat N.A., Langham M.A.C., Osborne L.E., Timmerman A. and Wegulo S.N. 2013. Occurrence and distribution of *Triticum mosaic virus* in the central Great Plains. *Plant Dis.* 97: 21-29.
- Byamukama E., Tatineni S., Hein G.L., Graybosch R.A., Baenziger P.S., French R. and Wegulo S.N. 2012. Effects of single and double infections of winter wheat by *Triticum mosaic virus* and *Wheat streak mosaic virus* on yield determinants. *Plant Dis.* 96: 859-864.
- Byamukama E., Wegulo S.N., Tatineni S., Hein G.L., Graybosch R.A., Baenziger P.S. and French R. 2014. Quantification of yield loss caused by *Triticum mosaic virus* and *Wheat streak mosaic virus* in winter wheat under field conditions. *Plant Dis.* 98(1): 127-133.
- Caasi D.R.J., Arif M., Payton M., Melcher U., Winder L. and Ochoa-Corona F.M. 2013. A multi target, non-infectious and clonable artificial positive control for routine PCR-based assays. *J. Microbiol Methods* 95: 229–234.

- de Oliveira C.F. 2013. Impact of *Wheat streak mosaic virus* and *Triticum mosaic virus* on transmission by *Aceria tosichella* Keifer (Eriophyidae) and virus epidemiology in wheat. Master of Science Thesis. University of Nebraska- Lincoln, Estados Unidos, 72 pp.
- Fellers J.P., Seifers D., Ryba-White M. and Martin T.J. 2009. The complete genome sequence of *Triticum mosaic virus* a new wheat-infecting virus of the High Plains. *Arch. Virol.* 154: 1511-1515.
- Mahmood T., Hein G.L. and Jensen S.G. 1998. Mixed infection of hard red winter wheat with High Plains virus and *Wheat streak mosaic virus* from wheat curl mites in Nebraska. *Plant Dis.* 82: 311-315.
- McMechan A.J., Tatineni S., French R. and Hein, G.L. 2014. Differential transmission of *Triticum mosaic virus* by wheat curl mite populations collected in the Great Plains. *Plant Dis.* 98: 806-810.
- Myslik J.T. and Nassuth A. 2001. Rapid detection of viruses, transgenes, and mRNAs in small plant leaf samples. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19: 329-330-340.
- Nassuth A., Pollari E., Helmechy K., Stewart S. and Kofalvi, S.A. 2000. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. *J. Virol. Methods* 90: 37-49.
- Navia D., de Mendonca R.S., Skorachka A., Knihinicki D., Hein G.L., Pereira P.R.V., Lau D. and Truol G. 2013. Wheat curl mite, *Aceria tosichella*, and transmitted viruses: An expanding pest complex affecting cereal crops. *Exp. Appl. Acarol.* 59: 95-143.
- Price J.A., Smith J., Simmons A., Fellers J. and Rush C.M. 2010. Multiplex real-time RT-PCR for detection of *Wheat streak mosaic virus* and *Triticum mosaic virus*. *J. Virol Methods.* 165(2): 198-201.
- Ryba-White M., Schrum E. and Mara J.O. 2009 Multiplex PCR Method for Simultaneous Detection of Three Major Kansas Wheat Viruses. Publicado en Internet, disponible en https://www.npdn.org/system/files/public/Meeting%20Information/2009_NationalMeeting/Ryba-White_Schrum_O'Mara_POSTER.pdf. Activo Febrero 2016.
- Seifers D.L., Harvey T. L., Martin T. and Jensen, S. G. 1997. Identification of the wheat curl mite as the vector of the High Plains virus of corn and wheat. *Plant Dis.* 81: 1161-1166.
- Seifers D.L., Martin T.J., Harvey T.L., Fellers J.P., Stack J.P., Ryba-White M., Haber S., Krokhin O., Spicer V., Lovat N., Yamchuk A. and Standing, K.G. 2008. *Triticum mosaic virus*: A new virus isolated from wheat in Kansas. *Plant Dis.* 92: 808-817.
- Seifers D.L., Martin T., Harvey T.L., Fellers J.P. and Michaud J. 2009. Identification of the wheat curl mite as the vector of *Triticum mosaic virus*. *Plant Dis.* 93: 25-29.
- Seifers D.L. and Martin T.J. 2011. Occurrence and yield effects of wheat infected with *Triticum mosaic virus* in Kansas. *Plant Dis.* 95(2): 183-188.
- Seifers D.L., Martin T.J. and Fellers, J.P. 2010. An experimental host range for *Triticum mosaic virus*. *Plant Dis.* 94(9): 1125-1131.
- Skare J.M., Wijkamp I., Rezende J.A.M., Kitajima E.W., Park J.W., Desvoyes B., Rush C.M., Michels G., Scholthof K.B.G. and Scholthof H.B. 2006. A new eriophyid mite-borne membrane-enveloped virus-like complex isolated from plants. *Virol.* 347: 343-353.

- Slykhuis J.T. 1955. *Aceria tulipae* Keifer (Acarina: Eriophyidae) in relation to the spread of wheat streak mosaic. *Phytopathology* 45: 116-128.
- Tatineni S, Sarath G., Seifers D. and French R. 2013. Immunodetection of *Triticum mosaic virus* by DAS- and DAC-ELISA using antibodies produced against coat protein expressed in *Escherichia coli*: potential for high-throughput diagnostic methods *J. Virol. Methods* 189: 196–203.
- Tatineni S., Graybosch R.A., Hein G.L., Wegulo S.N. and French R. 2010. Wheat cultivar-specific disease synergism and alteration of virus accumulation during co-infection with *Wheat streak mosaic virus* and *Triticum mosaic virus*. *Phytopathology* 100(3): 230-238.
- Tatineni S., Ziem, A.D., Wegulo S.N. and French R., 2009. *Triticum mosaic virus*: a distinct member of the family Potyviridae with an unusually long leader sequence. *Phytopathology* 99: 943–950.
- Truol G. 2009. Enfermedades virales asociadas al cultivo de trigo en Argentina: reconocimiento, importancia, formas de transmisión y manejo. Biglia Press, Córdoba. 77 pp.

CAPÍTULO 5

DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE ÁCAROS ERIÓFIDOS EN TRIGO Y CEREALES Y MALEZAS ALEDAÑAS

INTRODUCCIÓN

La importancia económica de los ácaros eriófidos, fitófagos obligados, (Acari: Eriophyoidea) está aumentando en todo el mundo (Skoracka *et al.*, 2012). Un gran número de especies ha logrado establecerse como plagas para ciertos cultivos y muchas otras representan una amenaza cuarentenaria para varios países (Duso *et al.*, 2010). Algunas de las características de estas especies de eriófidos tales como son su tamaño pequeño, su simplicidad estructural y su limitado número de rasgos característicos llevan con frecuencia a diagnósticos erróneos los que pueden afectar tanto la sistemática de este grupo, así como también a las estrategias agrícolas de manejo y de mitigación de riesgo (Lindquist *et al.*, 1996; Skoracka *et al.*, 2012).

Las estimaciones sugieren que sólo menos del 8% de los eriófidos se han descrito (Amrine *et al.*, 2003). Al presente, la taxonomía de los Eriophyoidea se basa en rasgos morfológicos (referidos a idiosoma, gnatosoma, escudo prodorsal, lóbulo frontal, patas, región coxisternal, genitalia, opisthosoma, setas, etc.) (Lindquist *et al.*, 1996). Sin embargo, se están empleando otros métodos como los basados en comportamiento y principalmente los genéticos para la clasificación taxonómica de este grupo. Los métodos moleculares han comenzado a utilizarse en la sistemática de los eriófidos hace aproximadamente unos 15 años, los cuales han proporcionado avances significativos para abordar cuestiones fundamentales sobre la biología de los mismos. Mediante estos métodos se lograron aclarar dudas sobre sinónimos, probar hipótesis de especies crípticas, examinar ocurrencia de biotipos, así como también entender patrones de colonización de especies invasoras (Navajas y Navia, 2010). Se ha demostrado la importancia del empleo de más de un locus en los estudios moleculares de eriófidos, complementando información

obtenida mediante secuencias tanto nucleares como mitocondriales, implicando diferentes niveles taxonómicos. Las regiones nucleares empleadas en investigaciones con eriófidos incluyen los espaciadores transcritos internos (ITS, Internal Transcribed Spacer) del DNA ribosomal nuclear (rDNA) y genes asociados (18S, 5.8 y 28S); la región D2 (región divergente 2) de la subunidad mayor del rDNA; y la región ANT (Adenine Nucleotide Translocase). Entre los genes mitocondriales utilizados se destacan la subunidad menor ribosomal 16S del DNA mitocondrial (mtDNA) y el gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI) (Navia *et al.*, 2005; Carew *et al.*, 2009; Skoracka y Dabert 2010; Skoracka *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2013).

Respecto a los ácaros eriófidos en gramíneas en América del Sur, su conocimiento es escaso. Sólo ocho especies pertenecientes a los géneros *Aceria*, *Abacarus*, *Catarhinus* y *Schizaceae* han sido descritas o reportadas en el continente. Los géneros *Aceria* y *Abacarus* están reportados en el cultivo de trigo y asociados a la transmisión de virus (Keifer 1959, 1976, 1977, 1978; Flechtmann y Aranda 1970; Flechtmann 2000; Navia *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2009; Castiglioni y Navia 2010). En Argentina, el único eriófido descrito que afecta gramíneas es *Aceria tosichella*. A partir de la primera detección del WSMV en nuestro país en el año 2002, se comenzó con la búsqueda de su ácaro vector en cultivos de trigo. Como ocurre generalmente con los eriófidos, por su dificultad en detectarlos se logró identificarlo recién dos años después cuando se analizaron muestras de trigo con síntomas e infectadas con WSMV, provenientes de la localidad de Azul, provincia de Buenos Aires. Las muestras fueron sometidas a una inspección acarológica mediante un método de lavado, logrando obtener adultos eriófidos los cuales fueron identificados como *A. tosichella* por Navia y col. (2006).

Anteriormente, se reconocía taxonómicamente a *A. tosichella* como una simple especie. Sin embargo, ciertas características llevaron a pensar que en realidad podría tratarse de un complejo de especies crípticas. Entre las particulares de este eriófido que fomentaron dicho supuesto fue su elevado número de plantas hospedantes. Fueron registradas aproximadamente 90 especies en 48 géneros de *Poaceae* como hospedantes, posicionando de esta manera a *A. tosichella* como una excepción entre los eriófidos en esta

característica (Amrine, 2003; Navia *et al.*, 2013). Por otra parte, estudios sobre resistencia de trigo a este ácaro y la capacidad del mismo para transmitir virus evidenciaron la existencia de diferentes cepas de *A. tosichella*. En EEUU observaron que diferentes poblaciones de *A. tosichella* (de Kansas, Nebraska, Montana, Alberta, South Dakota y Texas) variaron en su comportamiento frente a diferentes fuentes de resistencia (Harvey *et al.*, 1995; Harvey *et al.*, 1999). Estudios posteriores mostraron distintas respuestas de esas mismas poblaciones a numerosas líneas de *Aegilops tauschii*, especie importante en estudios de mejoramiento genético del trigo (Malik *et al.*, 2003). También, se ha demostrado que diferentes cepas de *A. tosichella* variaron en su capacidad para transmitir WSMV y *High Plains wheat mosaic virus* (HPWMoV) (Seifers *et al.*, 2002). Investigadores australianos demostraron, mediante marcadores moleculares, que *A. tosichella* en ese país consiste de al menos dos linajes, llamados WCM1 y WCM2, los cuales podrían representar diferentes especies, aunque estrechamente relacionadas (Carew *et al.*, 2009). Asimismo, el mismo grupo de investigación mostró que solo uno de los dos linajes (WCM2) logró transmitir WSMV en condiciones controladas de laboratorio (Schiffer *et al.*, 2009). Posteriormente, investigadores estadounidenses separaron mediante técnicas moleculares, cinco colonias de ácaros provenientes de diferentes estados de su país en dos grupos genéticos diferentes (Type 1 y Type 2), los cuales se correspondieron a los dos descritos por los australianos (Hein *et al.*, 2012).

Recientemente, se realizaron dos importantes estudios sobre la caracterización molecular y morfológica de poblaciones de *A. tosichella* involucrando ácaros de diferentes continentes (Skoracka *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2013). En el trabajo de Skoracka y col. (2012), se analizaron poblaciones de cinco países, Australia, Francia, Polonia y América del Sur, incluyendo Argentina y Brasil. En Miller y col. (2013) se amplió la colaboración con investigadores de EEUU y Europa, involucrando a Siria, Turquía y EEUU, además de los cinco países mencionados anteriormente. En ambos trabajos se encontró que los análisis moleculares, utilizando marcadores independientes (nucleares y mitocondriales) no soportaron la monofilia de las poblaciones de *A. tosichella* estudiadas. Se definieron linajes, indistinguibles morfológicamente, cuyos niveles de divergencia interespecífica permitieron considerar a *A. tosichella* formando parte de un complejo de especies crípticas

reafirmando de esta manera lo que se hipotetizaba en un comienzo. Además, *Aceria tulipae*, reconocida como una especie biológicamente distinta, se posicionó filogenéticamente en medio de las poblaciones de *A. tosichella*, agrupadas éstas en dos grupos claramente definidos. Dos de las especies o linajes descritos fueron encontradas en trigo tanto en Argentina, como en Brasil. Que una especie plaga en un cultivo económicamente importante está conformando un complejo de especies crípticas puede tener implicancias enormes para su control (Bickford *et al.*, 2007). Las especies que conforman un complejo pueden diferir en características biológicas y ecológicas, como por ejemplo, el rango de hospedantes, capacidad de transmitir patógenos, resistencia a pesticidas y su potencial de invasión (Perring, 2001; Dres y Mallet 2002; Bickford *et al.*, 2007).

El manejo del patosistema WSMV-*A. tosichella* está enfocado principalmente en la prevención mediante prácticas culturales y utilización de materiales resistentes o tolerantes. Se ha demostrado que una de las prácticas más importantes es el control de los llamados puentes verdes, hospedantes alternativos reservorios del virus y vector. Resulta importante interrumpir el ciclo de vida de *A. tosichella* para reducir el potencial de propagación del virus destruyendo plantas de cereales voluntarias y malezas hospedantes que actúan como puentes verdes (Navia *et al.*, 2013). Se conoce que *A. tosichella* puede sobrevivir sin alimentos ni agua durante sólo 8 horas a 24°C y 30-40 horas a 3°C, lo cual indica su debilidad contra la deshidratación (Jeppson *et al.*, 1975). Es necesario conocer los hospedantes donde sobreviven los ácaros y el virus durante el período que no se encuentra el cultivo de trigo implantado, para predecir la epidemiología del patógeno y elaborar estrategias de control más eficaces (Navia *et al.*, 2013).

Con el fin de investigar en más detalle la variabilidad de *A. tosichella* en Argentina y considerando que identificaciones inadecuadas conlleva a seleccionar estrategias de control ineficaces para este patosistema, el objetivo del presente capítulo fue determinar las especies crípticas de *A. tosichella* y las especies de ácaros eriófididos presentes en cereales y malezas alledañas al cultivo de trigo por su rol como puentes verdes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de las especies crípticas de *Aceria tosichella* provenientes de las mismas muestras de trigo utilizadas para caracterizar la diversidad del WSMV (Capítulos 2 y 3)

*Obtención de poblaciones de *Aceria tosichella* provenientes de trigo de diferentes regiones trigueras argentinas.*

A partir de los muestreos dirigidos descritos en el Capítulo 2 para la obtención de aislamientos del WSMV de trigo y hospedantes alternativos de diferentes regiones de Argentina se establecieron poblaciones de ácaros. Para ello, se colocaron hojas infectadas (confirmado mediante DAS-ELISA con antisueros específicos para WSMV, Agdia Inc., USA) provenientes de campo en macetas con plantas de trigo cultivar Biointa 3005 asintomáticas recién emergidas. Estas hojas infectadas corresponden a las mismas plantas donde se realizó la extracción de RNA total para obtener los aislados del virus descritos y estudiados en el Capítulo 2 de esta Tesis. Éstas fueron mantenidas en sala de cría bajo condiciones de 25 ± 3 °C y fotoperíodo de 16 hs. de luz, hasta la aparición de síntomas (enrollado de hojas) que evidenciaron el establecimiento de la colonia (aproximadamente 15 días). Los adultos de *A. tosichella* fueron recogidos bajo lupa y preservados en etanol 100% para los análisis moleculares.

Extracción de DNA

Con el fin de corroborar una adecuada extracción de DNA y amplificación de las regiones estudiadas utilizando un solo ácaro por tubo, se realizó la extracción de DNA en forma individual y utilizando grupos de 10 y 25 ácaros. La extracción de DNA se realizó mediante el método de Chelex (Carew *et al.*, 2004). Para realizar la molienda de los ácaros se utilizaron tips modificados.

Amplificación y secuenciación

Se realizó PCR con iniciadores específicos para amplificar dos regiones genómicas independientes (una mitocondrial y otra nuclear), la subunidad menor ribosomal 16S del mtDNA y una región de los espaciadores transcritos internos (ITS) del rDNA. La metodología empleada fue similar a la utilizada por Navia y col. (2005) en estudios realizados con *Aceria guerreronis* Keifer. La amplificación a través de PCR de la región ITS fue realizada utilizando iniciadores localizados respectivamente en la extremidad 3' de 18rDNA y en la 5' de 28S, para amplificar un fragmento de 987 pb. El fragmento 16S de 400 pb fue amplificado utilizando los iniciadores LR-J 12887F y 16SWCMR. Reacciones de PCR fueron realizadas para cada muestra de DNA y los productos de éstas fueron reunidos y purificados utilizándose el kit QIAquick PCR® (Qiagen). Los productos fueron secuenciados directamente en ambas direcciones utilizando un secuenciador automático ABI 3130XL (Applied Biosystems).

Análisis filogenéticos

Para los análisis filogenéticos se utilizaron las secuencias generadas en este estudio y las correspondientes a ITS y 16S de poblaciones de *A. tosichella* de Australia, EEUU, Polonia, Brasil y Argentina, disponibles en GenBank y descritas en estudios previos (Hein *et al.*, 2012; Skoracka *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2013). Se utilizaron como outgroup secuencias correspondientes a *A. tulipae*, *A. eximia*, *A. guerreronis* y cuatro especies del género *Cecidophyopsis*. No se incorporaron secuencias de otras especies de *Aculodes* ya que no se encontraron disponibles al momento de realizar este estudio. Para el análisis del ITS se utilizó un fragmento menor al secuenciado, de 348 pb para poder incorporar al estudio las secuencias reportadas pero incompletas de Australia y EEUU. El estudio comprendió un total de 95 y 87 secuencias ITS1 y 16S respectivamente. Las mismas fueron alineadas utilizando el programa de alineamiento múltiple ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) implementado en Bioedit ver. 7.0.4 (Hall, 1999). Se empleó DnaSP v5 para la determinación del número de haplotipos. El análisis filogenético fue realizado con los haplotipos encontrados y mediante la utilización del programa MEGA ver. 5, con el

algoritmo de Neighbor Joining (NJ). Fueron empleados los modelos Maximum Composite Likelihood y Tamura-Nei para ITS y 16S respectivamente, tal como lo indicó el análisis de búsqueda del mejor modelo implementado en MEGA ver. 5.

Identificación de especies de eriófidos en cereales y malezas aledañas en la zona de Mar y Sierra de la provincia de Buenos Aires, por su posible rol como puentes verdes

Muestreo

Se realizó un muestreo en la Zona de Mar y Sierra en noviembre de 2013, específicamente en las localidades de Azul y Loberías. Fue seleccionada esta zona de muestreo debido a que solamente en la localidad de Azul fueron identificados, en estudios previos, los dos linajes de *A. tosichella* descritos en Argentina (Skoracka *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2013). Se recolectaron plantas de trigo, avena, maíz, ryegrass y diferentes malezas, las cuales se detallan en las Tablas 5.2, 5.3 y 5.4.

Recolección de ácaros mediante un método de lavado

Las plantas recolectadas fueron lavadas según el método descrito por Bianchin y col. (2010), para la recolección de los eriófidos.

Identificación morfológica

Los ácaros recolectados fueron montados en medio Berlese modificado (Amrine y Manson, 1996). Las láminas fueron cubiertas con cubreobjetos y llevadas a una estufa a 55°C durante 7 días para su secado. Una vez transcurrido el período de secado, las láminas fueron enviadas a Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología, Brasilia, Brasil para su identificación morfológica (Dra. Denise Navia).

Extracción de DNA, amplificación, secuenciación y análisis filogenéticos

Fueron empleadas las mismas condiciones descritas anteriormente para la determinación de las especies crípticas de *A. tosichella*. Se analizaron molecularmente solamente ácaros correspondientes a las muestras N° 15 y 26, ya que no se contó con material suficiente para el resto de las muestras (Tablas 5.2, 5.3 y 5.4).

Identificación de especie de eriófido en *Stipa* sp. en la subregión triguera IV, por su posible rol como puente verde

Muestreo

Se colectaron ácaros eriófidos sobre *Stipa* sp. en bordes de cultivos de trigo infectados con WSMV y HPWMoV en la localidad de Necochea, provincia de Buenos Aires (38° 45' 10" S; 58° 45' 25" W), en el mes de enero de 2012. Dicha recolección, formó parte de prospecciones de ácaros eriófidos en gramíneas realizadas en Argentina, llevadas a cabo en investigaciones conjuntas con otro grupo de trabajo, con el objetivo de determinar el rango de hospedantes de *A. tosichella*. Los ácaros fueron conservados en alcohol 96% hasta la realización de los preparados, para su caracterización taxonómica, y la extracción de DNA para los estudios moleculares.

Identificación morfológica

Los ácaros fueron montados en medio Berlese modificado (Amrine y Manson, 1996). Se realizaron mediciones y captura de imágenes utilizando un microscopio óptico de contraste de fase y de interferencia diferencial (DIC) (Nikon Eclipse 80i), con cámara clara acoplada a una cámara digital con objetivo de 100x. Se elaboró su descripción, utilizando la terminología de Lindquist (1996). Se midieron 70 estructuras morfológicas de 10 hembras y un macho. Las medidas se tomaron en objetivo 100x y fueron presentadas en micrómetros (μm) (Anexo II). Se elaboraron diseños de aspecto dorsal, ventral, lateral, patas, genitalia, empodio y detalles de otros caracteres importantes para el diagnóstico. En

la descripción de la hembra, cada medida del holotipo precede al rango correspondiente a los paratipos. No se pudieron tomar algunas mediciones de paratipos debido a la posición en la que se montaron los especímenes. El recuento de los anillos opisthosomales ventrales comenzó desde el primer anillo completo detrás de los genitales. Los anillos opisthosomales dorsales se contaron desde el primer anillo anular completo detrás de la mitad del borde posterior del escudo prodorsal. Cuando no se presentó la longitud de los estiletes quelicerales, significa que no fue posible medir este carácter, ya que estaba inmerso con otras estructuras gnatosomales. Las mediciones se realizaron según de Lillo y col. (2010), excepto por lo siguiente: (1) la longitud del cuerpo, la cual se midió desde la punta del lóbulo frontal hasta el extremo final del lóbulo anal, sin considerar los pedipalpos; (2) la medida del espacio de los tubérculos (distancia entre los tubérculos), no la distancia de las setas sc; (3) longitud de empodio, la cual incluye su porción basal insertada en el tarso. No se encontraron etapas inmaduras y sólo se encontró y estudió un macho. Los genitales internos femeninos no fueron visibles en los especímenes estudiados. Los especímenes tipo se depositaron montados en diapositivas en colecciones de ácaros en Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología, Brasilia, Brasil, y en el Departamento de Entomología, Fitopatología y Zoología Agrícola, de la Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), de la Universidad de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Extracción de DNA, amplificación, secuenciación y análisis filogenéticos

Fueron empleadas las mismas condiciones descritas anteriormente para la determinación de las especies crípticas de *A. tosichella*.

RESULTADOS

Determinación de las especies crípticas de *Aceria tosichella* provenientes de las mismas muestras de trigo utilizadas para caracterizar la diversidad del WSMV (Capítulos 2 y 3)

Obtención de poblaciones de Aceria tosichella provenientes de trigo de diferentes regiones trigueras argentinas.

Se establecieron 10 poblaciones de ácaros eriófididos a partir de los muestreos dirigidos, provenientes de diferentes regiones trigueras argentinas, descritos en el Capítulo 2. No se logró establecer colonias a partir de las muestras de *Digitaria sanguinalis*, *Avena fatua* y Triticale, por lo que no fue posible analizarlas molecularmente (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Poblaciones de ácaros establecidas a partir de los muestreos dirigidos provenientes de diferentes regiones trigueras argentinas.

Aislamiento	Año	Provincia	Localidad	Hospedante	Población de ácaros	ITS	16S
WSMV01	2009	Buenos Aires	25 de Mayo	Trigo	Si	No	No
WSMV02	2009	Buenos Aires	Energía	Trigo	Si	Si	Si
WSMV03	2009	Entre Ríos	Paraná	Trigo	Si	Si	Si
WSMV04	2009	Córdoba	Manfredi	Trigo	Si	Si	Si
WSMV05	2009	Buenos Aires	Bordenave	Trigo	Si	Si	Si
WSMV06	2009	Córdoba	Marcos Juárez	<i>Digitaria sanguinalis</i>	No	No	No
WSMV07	2009	Buenos Aires	Tandil	Trigo	Si	Si	Si
WSMV08	2009	Buenos Aires	General Madariaga	Trigo	Si	Si	Si
WSMV09	2009	Córdoba	Salguero	Trigo	Si	Si	Si
WSMV10	2010	Buenos Aires	Necochea	Trigo	Si	Si	Si
WSMV11	2010	Buenos Aires	Necochea	<i>Avena fatua</i>	No	No	No
WSMV12	2011	Córdoba	Las Perdices	Triticale	No	No	No
WSMV13	2010	Córdoba	Marcos Juárez	Trigo	Si	Si	Si

Identificación molecular de las especies crípticas de Aceria tosichella provenientes de las mismas muestras de trigo utilizadas para caracterizar la diversidad del WSMV, de eriófidos en cultivos y especies aledañas en la zona de Mar y Sierra, y de eriófido en Stipa sp. en la subregión triguera IV, por su rol como puentes verdes

Se corroboró una adecuada extracción de DNA y amplificación de la región ITS y 16S utilizando un solo ácaro por tubo, así como también con grupos de 10 y 25 ácaros. En todos los casos, se obtuvo la banda esperada de 987 pb y 400 pb para ITS y 16S respectivamente (Fig. 5.1). Por consiguiente, se realizó la extracción de DNA en forma individual para los ácaros recolectados de las colonias establecidas.

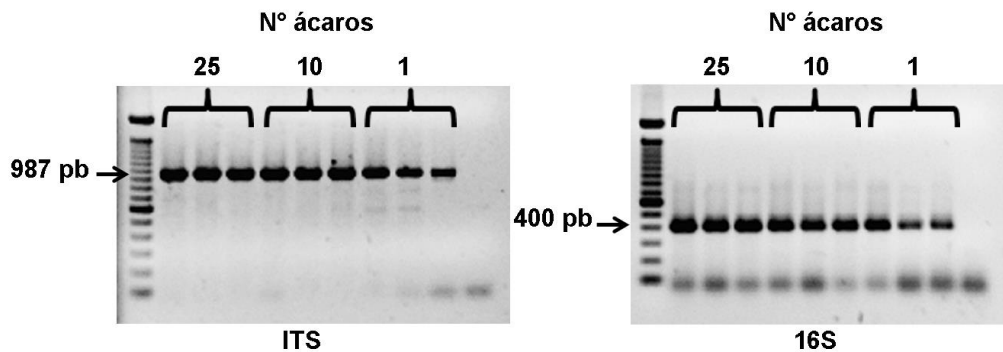


Fig. 5.1. Productos de PCR correspondientes a la amplificación de la región ITS y 16S empleando DNA de ácaros obtenido en forma individual y utilizando grupos de 10 y 25 ácaros.

Se logró la amplificación de las regiones ITS y 16S para 9 de las 10 colonias de *A. tosichella* establecidas. Del mismo modo, se logró la amplificación de ambas regiones para los eriófidos *A. tulipae*, los obtenidos mediante el método de lavado en la zona de Mar y Sierra, así como también los recolectados en *Stipa* sp. (Tablas 5.2, 5.3 y 5.4). Por el contrario, no se logró la amplificación de una sola banda a partir del DNA de los ácaros de la población de 25 de Mayo (Tabla 5.1). De esta manera, se obtuvieron 34 secuencias de ITS, de las cuales corresponden 24 a *A. tosichella*, 3 a *A. tulipae*, 4 a *Abacarus* sp y 3 a *Aculodes stipacolus*. Asimismo, se obtuvieron 32 secuencias 16S, de las cuales corresponden 25 a *A. tosichella*, 2 a *A. tulipae*, 2 a *Abacarus* sp. y 3 a *A. stipacolus*.

Para la totalidad de secuencias estudiadas, se determinaron 17 y 20 haplotipos correspondientes a ITS1 y 16S respectivamente, comprendiendo el género *Aceria* y los demás. Todas las secuencias ITS1 de *A. tosichella* aquí generadas correspondieron a un haplotipo ya descrito. Las mismas están incluidas en JF960148_Atosichella_WCM-2 x41 (ARG-BR-AUST-POL-USA), comprendidas en uno de los dos grupos filogenéticos obtenidos para *A. tosichella* (círculo rojo en Fig. 5.2). Por otra parte, las secuencias ITS1 de los ácaros provenientes de la Zona de Mar y Sierra (descrito más adelante como *Abacarus* sp.) resultaron en dos haplotipos. Uno de ellos incluye a las muestras n° 15 y 26, recolectadas sobre *Festuca* y *Phalaris* respectivamente (Tablas 5.3 y 5.4); mientras que el otro haplotipo incluye solamente eriófidos recolectados en *Phalaris*. Este último grupo de secuencias (*Abacarus* sp.), resultó en un grupo filogenético definido y marcadamente separado del género *Aceria*. Las secuencias ITS1 correspondientes a los ácaros eriófidos recolectados sobre *Stipa* (descrito más adelante como *A. stipacolus*) resultaron en un mismo haplotipo, y del mismo modo que los ácaros de la zona de Mar y Sierra, en un grupo filogenético definido y marcadamente separado del género *Aceria* (Fig. 5.2).

Por otra parte, en la Fig. 5.3 se presenta el árbol filogenético obtenido para la región 16S. En el mismo se puede observar dos grupos para *A. tosichella*, de la misma manera que lo obtenido para ITS1 (en azul y rojo Fig. 5.3). Todas las secuencias generadas en este estudio para *A. tosichella* resultaron en un haplotipo ya descrito. Estas secuencias están representadas en BRA-TA-36B-3 Atosichella WCM2 x51 (ARG-BR-AUST-POL) (círculo rojo en Fig. 5.3), comprendidas en uno de los dos grupos filogenéticos obtenidos para *A. tosichella*. Del mismo modo que para la región ITS1, las secuencias 16S de los ácaros provenientes de la zona de Mar y Sierra (descrito más adelante como *Abacarus* sp.) resultaron en dos haplotipos, los cuales incluyen la muestras n° 26, recolectada sobre *Phalaris* (Tabla 5.4). Las secuencias 16S correspondientes a los ácaros eriófidos recolectados sobre *Stipa* (descrito más adelante como *A. stipacolus*) resultaron en un mismo haplotipo. Igualmente, *A. stipacolus* y *Abacarus* sp., resultaron en grupos filogenéticos definidos y separados del género *Aceria*.

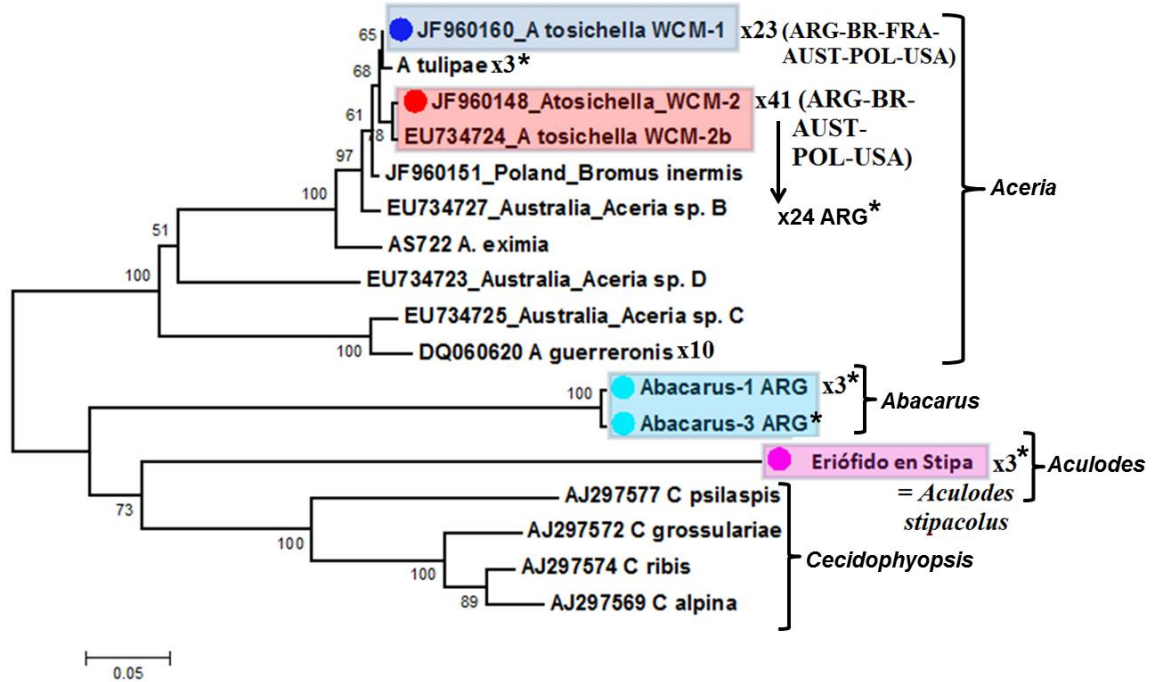


Fig. 5.2. Árbol filogenético obtenido por análisis Neighbour-Joining (NJ) con modelo Maximum Composite Likelihood correspondiente a la región ITS1, realizado con los haplotipos detectados a partir de todas las secuencias generadas en este estudio, incluyendo los géneros *Aceria*, *Abacarus* y *Aculodes*. En color azul y rojo se señalan los linajes WCM1 (o Type 1) y WCM2 (o Type 2) descritos para *Aceria tosichella* respectivamente, en celeste *Abacarus* y en rosado *Aculodes*. El haplotipo de *A. tosichella* detectado en este estudio está incluido en x41 en JF960148. El número seguido de x significa el número de secuencias utilizadas para el análisis. Se indica con asterisco (*) las secuencias generadas en este estudio.

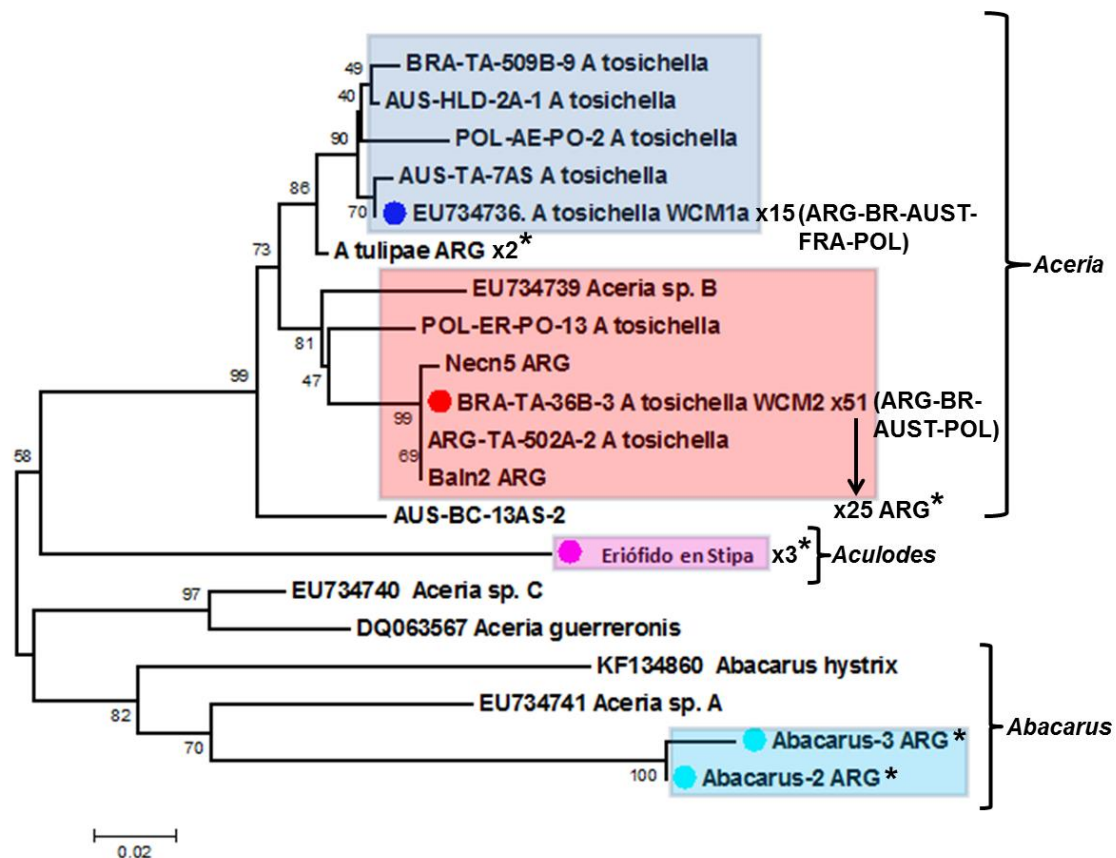


Fig. 5.3. Árbol filogenético obtenido por análisis Neighbour-Joining (NJ) con modelo Tamura-Nei correspondiente a la región 16S, realizado con los haplotipos detectados a partir de todas las secuencias generadas en este estudio, incluyendo los géneros *Aceria*, *Abacarus* y *Aculodes*. En color azul y rojo se señalan los linajes WCM1 (o Type 1) y WCM2 (o Type 2) descritos para *Aceria tosichella* respectivamente, en celeste *Abacarus* y en rosado *Aculodes*. El haplotipo de *A. tosichella* detectado en este estudio está incluido en BRA-TA-36B-3 *A. tosichella* WCM2 x51. El número seguido de x significa el número de secuencias utilizadas para el análisis. Se indica con asterisco (*) las secuencias generadas en este estudio.

Identificación de especies de eriófidos en cereales y malezas alledañas en la zona de Mar y Sierra de la provincia de Buenos Aires, por su posible rol como puentes verdes

La recolección de ácaros eriófidos mediante un método de lavado en la zona de Mar y Sierras, permitió identificar mediante caracteres morfológicos dos especies del género *Aceria*, diferentes a *A. tosichella*, en ryegrass y *Festuca*; *Abacarus hystrix* en

Festuca; y otra especie de *Abacarus* en ambas gramíneas, así como también en *Phalaris* (Tablas 5.2, 5.3 y 5.4). No fue detectada *A. tosichella* en las muestras evaluadas.

Respecto a la identificación molecular, se obtuvieron cuatro secuencias correspondientes a ITS y tres a 16S (Tablas 5.2, 5.3 y 5.4), tal como se presentó anteriormente. En el árbol filogenético obtenido con secuencias ITS, se pudo observar como las secuencias de *Abacarus* sp. resultaron en un grupo claramente separado del género *Aceria* (Fig. 5.2). Del mismo modo, en el árbol de secuencias 16S, las secuencias de *Abacarus* sp. se separaron tanto del género *Aceria* como de *Abacarus hystrix*, corroborando la detección de otra especie de *Abacarus*, diferente de *A. hystrix*, como sugirió la identificación morfológica (Fig. 5.3).

Tabla 5.2. Detalles de la identificación morfológica y molecular de ácaros recolectados en la zona de Mar y Sierra en la provincia de Buenos Aires, Argentina.

N°	Localidad	Hospedante	Slides	Identificación de ácaros	Material para DNA/N° secuencias	Fecha de slides
1	Azul	Trigo SY300	2 slides (1a y 1b)	Acaridae - ácaros asociados a detritos de materia orgánica. No fitófagos.	no	10/12/2013
2	Azul	Trigo	-	-	no	13/12/2013
3	Azul	Avena Calem	1 slide	Tarsonemidae - ácaros fungívoros o asociados a insectos. No fitófagos.	no	13/12/2013
4	Azul	Avena Calem	1 slide	Tarsonemidae e Tydeidae - ácaros fungívoros. No fitófagos.	no	05/12/2013
5	Azul	Avena	-	-	no	03/12/2013
6	Azul	Trigo ACA 303	-	-	no	06/12/2013
7	Azul	Cebada	-	-	no	16/12/2013
8	Azul	Cebada Scarlett	2 slides (8a y 8b)	8a Tydeidae - ácaros fungívoros. No fitófagos. 8b Acaridae - ácaros asociados a detritos de materia orgánica. No fitófagos.	no	06/12/2013
9	Azul	Trigo ACA 366	-	-	no	06/12/2013
10	Azul	Maíz	1 slide	Tarsonemidae - ácaros fungívoros o asociados a insectos. No fitófagos.	no	12/12/2013
11	Azul	Trigo	-	-	no	16/12/2013
12	Azul	Cebadilla Criolla	1 slide	Steneotarsonemus sp. (Tarsonemidae) - ácaros fitófagos. Una sola hembra. No fue posible identificación específica.	no	11/12/2013

Tabla 5.3. (Continuación) Detalles de la identificación morfológica y molecular de ácaros recolectados en la zona de Mar y Sierra en la provincia de Buenos Aires, Argentina.

N°	Localidad	Hospedante	Slides	Identificación de ácaros	Material para DNA/N° secuencias	Fecha de slides
13	Azul	<i>Avena fatua</i>	1 slide (1 eriófido)	Tarsonemus sp. - ácaros fungívoros. No fitófagos. Steneotarsonemus sp. (Tarsonemidae) – ácaros fitófagos. Una sola hembra. No fue posible identificación específica	1 eriófido	17/12/2013
14	Azul	Ryegrass	1 slide (14 eriófidos)	<i>Abacarus</i> sp.1 (Eriophyidae) – Diferente de <i>Abacarus hystrix</i> . Seta escapular muy corta.	no	06/12/2013
15	Azul	<i>Festuca</i>	4 slides (15a:8, 15b:6; 15c:9, 15d:11 eriófidos)	<i>Abacarus</i> sp. 1 (Eriophyidae) – Diferente de <i>Abacarus hystrix</i> . Seta escapular muy corta.	4 eriófidos/1 secuencia ITS y 1 16S	12/12/2013
16	Azul	<i>Stipa</i>	-	-	1 eriófido	13/12/2013
17	Azul	<i>Avena fatua</i>	1 slide	Tydeidae - ácaros fungívoros. No fitófagos.	no	09/12/2013
18	Azul	Trigo SY100	-	-	no	17/12/2013
20	Azul	Trigo SY100	-	-	no	11/12/2013
21	Azul	Ryegrass	1 slide (2 eriófidos)	<i>Aceria</i> sp. (Eriophyidae) – del grupo <i>tenuis</i> , próxima a <i>A. tosichella</i> .	1 eriófido	10/12/2013
22	Azul	Ryegrass	1 slide (3 eriófidos, uno solo entero)	<i>Abacarus</i> sp. 1 (Eriophyidae) – Diferente de <i>Abacarus hystrix</i> . Seta escapular muy corta.	1 eriófido	10/12/2013

Tabla 5.4. (Continuación) Detalles de la identificación morfológica y molecular de ácaros recolectados en la zona de Mar y Sierra en la provincia de Buenos Aires, Argentina.

N°	Localidad	Hospedante	Slides	Identificación de ácaros	Material para DNA/N° secuencias	Fecha de slides
23	Azul	<i>Festuca</i>	1 slide (2 eriófidos)	Aceria sp. (Eriophyidae) – muy diferente de <i>A. tosichella</i> . <i>Abacarus hystrix</i> (Eriophyidae) (un único ejemplar).	no	13/12/2013
24	Azul	Pasto ovilla	1 slide (1 eriófido)	Eriófido inmaduro – no es posible identificación	no	12/12/2013
25	Azul	Trigo Baguette 9	-	-	no	17/12/2013
26	Azul	<i>Phalaris</i>	2 slides (26a:11 y 26b: 14 eriófidos)	<i>Abacarus</i> sp.1 (Eriophyidae) – Diferente de <i>Abacarus hystrix</i> . Seta escapular muy corta.	3 eriófidos/3 secuencias ITS y 2 16S	12/12/2013
27	Lobería	Cebada	-	-	no	18/12/2013
28	Lobería	Maíz	1 slide	Tydeidae - ácaros fungívoros. No fitófagos.	1 eriófido	11/12/2013
29	Lobería	Trigo candeal	-	-	no	17/12/2013
30	Lobería	Trigo Baguette 10	-	-	no	18/12/2013

Identificación de especie de eriófido en *Stipa* sp. en la subregión triguera IV, por su posible rol como puente verde

La descripción realizada permitió clasificar a los ácaros en la Superfamilia, Eriophyoidea Nalepa 1898, familia Eriophyidae Nalepa 1898, subfamilia Phyllocoptinae Nalepa 1892, tribu Anthocoptini Amrine and Stasny 1994, Género *Aculodes* Keifer, 1966. Finalmente, el análisis al microscopio óptico y la comparación con las demás especies evidenciaron que el espécimen *Aculodes* recolectado en *Stipa* sp. corresponde a una nueva especie para la ciencia, a la que se designó *Aculodes stipacolus* Alemandri and Navia sp. nov. Esta designación se formó como una composición entre *stipa*, que se refiere al género de la planta huésped y *-colus* que refiere al lugar donde habita.

La nueva especie se comparó con las 21 especies de *Aculodes* asociadas con gramíneas (Anexo II). *Aculodes stipacolus* sp. nov. es más similar a *A. koeleriae* Sukhareva, 1985 y a *A. ponticus* Sukhareva, 1986 basado en el patrón de ornamentación del escudo prodorsal, con líneas completas admedian y subparalelas, líneas submedianas I ausentes, y las líneas submedianas II siguiendo márgenes laterales del escudo. Sin embargo, se diferencia de las dos especies en la presencia de una línea media corta en el escudo prodorsal (ausentes en *A. koeleriae* y *A. ponticus*); y en el número de rayos del empodio (9 rayos simétricos en *A. stipacolus*, 6-7 en *A. ponticus* y 6-7 en *A. koeleriae*).

Asimismo, la nueva especie es similar a *A. calamaabditus* Skorecka, 2003 basado en el aspecto general del escudo prodorsal. El mismo es puntiagudo ligeramente curvado; lóbulo frontal de base amplia; líneas admedian completas, subparalelas y admedian ligeramente curvadas; y el área antero lateral finamente granulada. Además, es similar en la seta escapular (sc), de longitud 22 (21-29) en *A. stipacolus* y 21 (12-28) en *A. calamaabditus*; así como también en el número solapado de anillos dorsales, 71 (64-74) en *A. stipacolus* y 62 (59-79) en *A. calamaabditus*. Sin embargo, *A. stipacolus* se diferencia de *A. calamaabditus* en la ausencia de líneas submedianas I (presentes en *A. calamaabditus*), y en el número de rayos en el empodio (9 rayos en *A. stipacolus*, 7-8 en *A. calamaabditus*). La nueva especie comparte el número de rayos en el empodio (9) con

Aculodes bambusae Kuang, 1997 (8-9), *Aculodes dubius* (Nalepa, 1891) y *Aculodes multitricavus* Skoracka (2004).

Se presenta a continuación la descripción de la nueva especie.

Descripción

Hembra (n = 10). Cuerpo con forma de gusano, 191 (191-223), 41 (37-46) de ancho, blanquecino.

Gnatosoma: 15 (14-17), proyectándose ligeramente hacia abajo; seta pedipalp coxal (ep) 2 (2-2), seta pedipalp dorsal genital (d) simple, 8 (7-9), estilete cheliceral 18 (14-19), estilete oral 14 (12-14).

Escudo predorsal: 37 (36-38), 28 (23-29) de ancho, subtriangular; lóbulo frontal pronunciado, acuminado, ligeramente sinuoso, de base relativamente amplia, 6 (6-8), 8 (8-9) de ancho; suave. Línea patrón de una línea mediana corta, débil, en la parte posterior 2/3 o 1/4 (más largo cuando se ve lateralmente); línea admedian completa, subparalela, ligeramente curvada en la parte final; líneas submedianas I ausente; líneas submedianas II siguiendo márgenes laterales del escudo; área externa antero lateral finamente granulada, algunos gránulos diseñando líneas cóncavas o diagonales. Tubérculos escapulares en el margen final del escudo, 16 (13-16) de separación, seta scapular (sc) 22 (21-29), direccionada hacia atrás.

Patatas: con todos los segmentos usuales y setas presentes. **Pata I** 29 (28-32); fémur 10 (9-10), seta ventral basifemoral (bv) 8 (7-10); genu 6 (6-7), seta antaxial genual (l ") 15 (15-19); tibia 7 (7-7), seta tibial paraxial (l ') 8 (7-10); tarso 8 (7-8), seta del tarso fastigial antaxial (ft ") 20 (20-24), seta del tarso fastigial paraxial (ft ') 12 (12-16), seta del tarso inguinal paraxial (u') 5 (5-6), empodio tarsal (em) 7 (7-8), simple, bilateralmente simétrico, 9 rayos, solenidion tarsal (ω) 9 (8-10), curvo, romo. **Pata II** 26 (26-29); fémur 10 (9-10), seta ventral basifemoral (bv) 10 (10-11); genu 5 (5-6), seta antaxial genual (l ")

8 (7-10); tibia 6 (5-6); tarso 7 (7-8), seta del tarso fasticial antaxial (ft ") 18 (18-23), seta del tarso fastigial paraxial (ft ') 8 (8-9), seta del tarso inguinal paraxial 5 (5-7), empodio tarsal (em) 7 (6-7), simple, bilateralmente simétrico, 8 rayos, solenidio tarsal (ω) 10 (9-10), curvo, romo.

Región coxigenital con 5 (5-5) anillos microtuberculados. **Placas coxisternas:** línea esternal (apodema interno coxisternal) 7 (6-7); coxisternum I y II densamente ornamentado con numerosas líneas curvas cortas o guiones. Seta anterior en coxisternum I (1b) 7 (7-10), 10 (9-10) aparte; seta proximal en coxisternum I (1a) 13 (12-14), 6 (5-7) aparte; seta proximal en coxisternum II (2a) 28 (27-31), 20 (15-20) aparte; **Genitalia femenina** 13 (11-13), 18 (16-19) de ancho, colgajo con una hilera transversal de 10 (10-12) cordones longitudinales, seta genital 3a 12 (10-19).

Opisthosoma redondeado uniformemente, 71 (64-74) anillos dorsales, 62 (59-67) anillos ventrales. Anillos dorsales con minúsculos microtubérculos redondeados situados en o cerca del margen último de cada anillo; anillos ventrales con microtubérculos en forma de talón situados en o cerca del margen último de cada anillo; microtubérculos más alargados en los últimos 5-7 anillos ventrales (seta posterior ventral f). Seta c2 21 (20-27), en el anillo ventral 2 (2-2); seta d 29 (29-43), en el anillo ventral 12 (12-16), 27 (19-27) separada, 20 (18-22) microtubérculos separados; seta e 10 (10-14), en el anillo ventral 31 (28-35), 12 (10-12) separado, 9 (7-10) microtubérculos separados; seta f 18 (18-26), en el anillo ventral 58 (55-63), 16 (8-16) separada, 14 (13-15) microtubérculos separados. Seta caudal h2 56 (56-85), seta accesoria h1 5 (4-6).

Macho (n = 1): Menor que la hembra, 170, 33 de ancho.

Gnathosoma 14; seta pedipalp dorsal genital (d) simple 7, otras setas y estructuras no claramente distinguibles.

Escudo predorsal 32, 26 ancho; lóbulo frontal y diseño de escudo similar al de la hembra. Lóbulo frontal 5, 8 de ancho. Tubérculos escapulares en el margen posterior, 14 separados, seta escapular (sc) 19, dirigido hacia atrás.

Patas con series habituales de setas. **Pata I** 24; fémur 9, seta ventral basifemoral (bv) 6; genu 7, seta antaxial genual (l ") 12; tibia 6, seta tibial paraxial (l ') 6; tarso 7, seta (em) (t) del tarso fastibial antaxial 18, seta (t ') 11 del tarso fastigial paraxial, seta del tarso inguinal paraxial (u') 5; empodio tarsal 6, simple, bilateralmente simétrico, 8 rayos, solenidion tarsal (ω) 8, ligeramente curvo, romo. **Pata II** 23; fémur 9, seta ventral basifemoral (bv) 8; genu 4, seta antaxial genual (l ") 8; tibia 6; tarsus 6, seta tarsal fastibial antaxial (ft ") 20, seta ftarsular fastigial paraxial (ft ') 7, seta toarsal unguinal (u') 5, empodio tarsal (em) 6, simple, bilateralmente simétrica, 8 rayos, solenidio tarsal (Ω) 9, ligeramente curvado, romo.

Región coxigenital con 4 anillos, finamente microtuberculados. **Placas coxisternas:** línea esternal (apodema interno coxisternal) 6; coxisternum I y II con líneas cortas curvadas escasas o guiones. Seta anterior en coxisternum I (1b) 5, 9 separada; seta proximal en coxisternum I (1a) 10, 5 separada; seta proximal en el coxisternum II (2a) 20, 15 separada; genitales masculinos 12, 16 de ancho, seta genital 3a 10.

Opisthosoma redondeado uniformemente, 55 anillos dorsales, 47 anillos ventrales. Microtubérculos dorsal y ventral similar al de la hembra. Seta c2 20, en el anillo ventral 2; Seta d 33, en anillo ventral 10, 21 separados, 15 microtuberculos separados; seta e 6, en el anillo ventral 22, 9 separado, 5 microtuberculos separado; seta f 14, en el anillo ventral 43, 13 separado, 13 microtuberculos separados. Seta caudal h2 rota, seta accesoria h1 3.

Tipo de material. Holotipo hembra (diapositiva / posición 1/1 indicada por un círculo rojo) y catorce hembras y un macho paratipos, de *Stipa* sp. (*Poaceae*), Necochea, Provincia de Buenos Aires, Argentina (38 ° 45.10 'S, 58 ° 45.25' W), 13 de enero de 2012, recogido por Mauro Polizzi, sobre cinco diapositivas de microscopio. Holotipo y 10 paratipos femeninos en cuatro diapositivas depositadas en la colección de ácaros en "Embrapa

Recursos Genéticos y Biotecnología", Brasília, DF, Brasil. Un macho y cuatro hembras paratipos en una diapositiva depositada en "Departamento de Entomología, Fitopatología y Zoología Agrícola, Escuela Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' (ESALQ), Universidade de São Paulo", Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Relación con el hospedante. Todos los especímenes se recolectaron en el interior de las hojas, a lo largo de la nervadura central.

Etimología. La designación específica *stipacolus* se formó como una composición entre *stipa* que se refiere al género de la planta huésped, y el Nuevo latín *-colus*, que significa morar en, habitar.

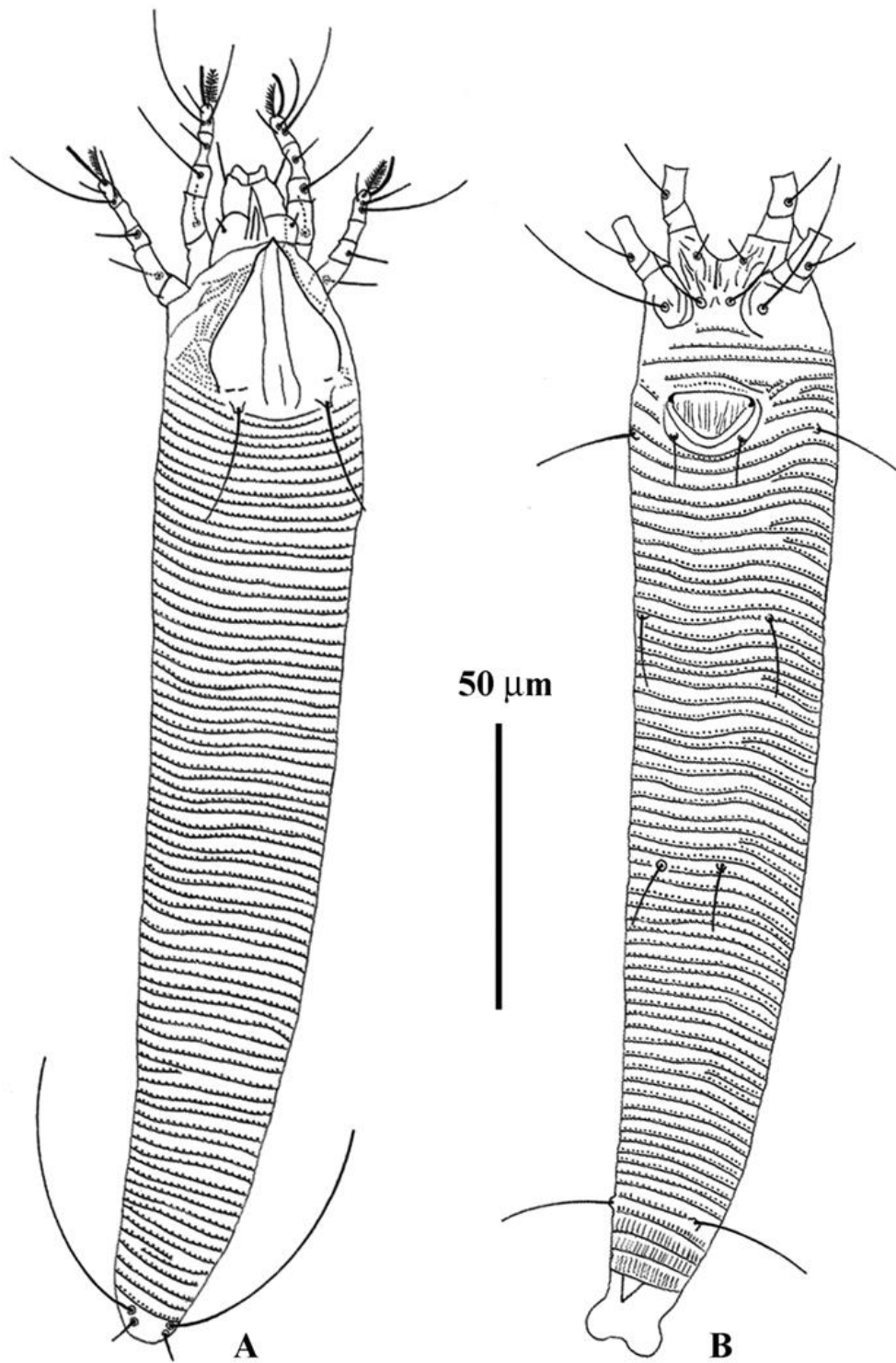


Fig. 5.4. Diseños esquemáticos de *Aculodes stipacolus* Alemandri and *Navia* sp. nov. (A) vista dorsal completa de hembra, (B) vista ventral completa de hembra.

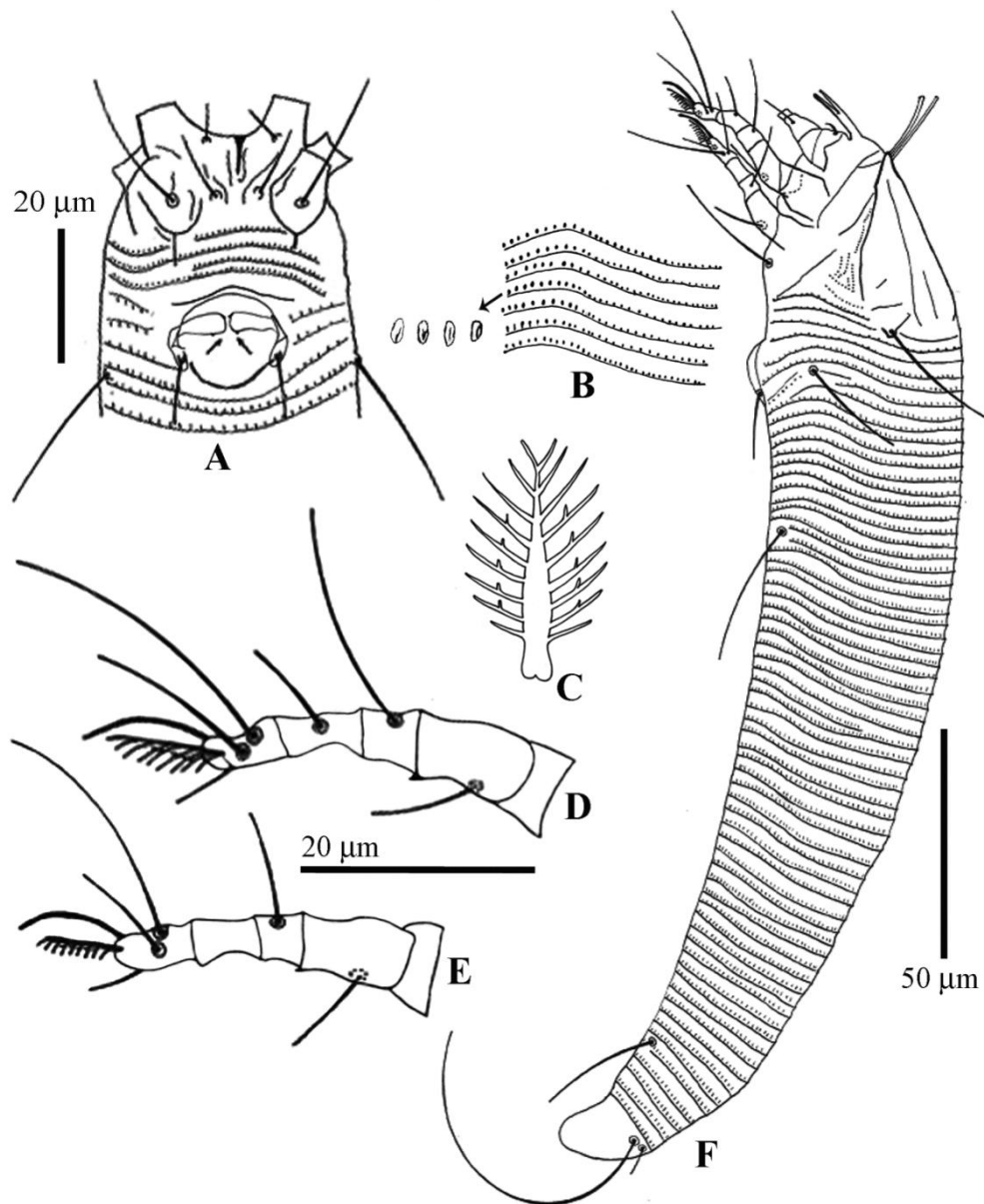


Fig. 5.5. Diseños esquemáticos de *Aculodes stipacolus* Alemandri and *Navia* sp. nov. (A) región coxigenital de hembra, (B) detalles de microtubérculos en vista lateral, (C) empodio, (D) pata 1, (E) pata 2 (F) vista lateral de hembra.

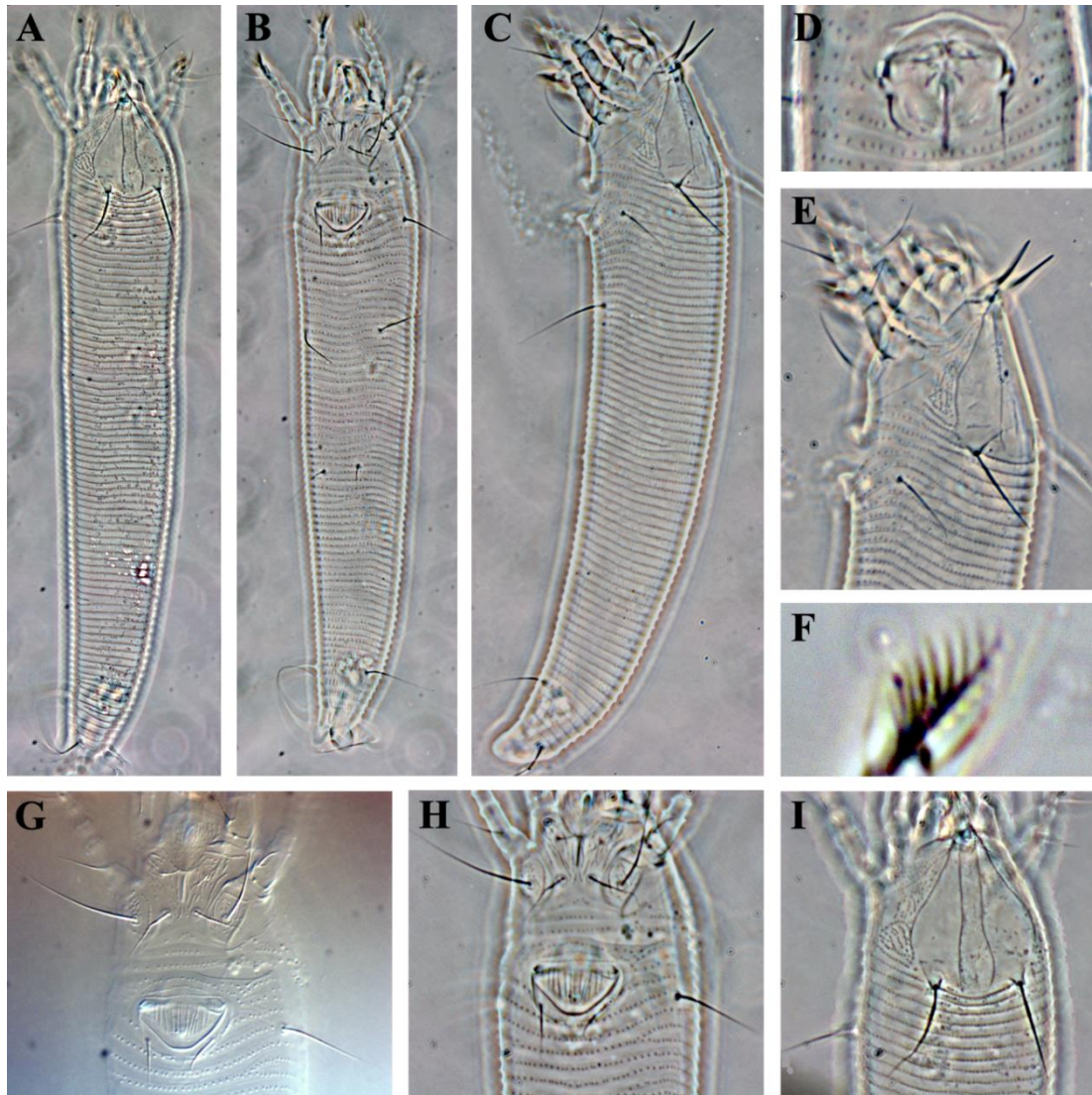


Fig. 5.6. Fotografías digitales de *Aculodes stipacolus* Alemandri and *Navia* sp. nov. (A) vista dorsal de hembra, (B) vista ventral de hembra, (C) vista lateral de hembra, (D) región coxigenital de macho, (E) vista anterolateral de hembra, (F) empodio, (G) región coxigenital de hembra bajo microscopio DIC, (H) región coxigenital de hembra bajo microscopio de contraste de fase, (I) vista anterolateral con detalles de ornamentación en escudo dorsal.

DISCUSIÓN

Todas las poblaciones de *A. tosichella*, provenientes de diferentes regiones productoras de trigo de Argentina, estudiadas en este trabajo se identificaron como uno de los dos principales linajes descritos anteriormente para este complejo de especies crípticas,

designado como WCM2 o Type 2. De acuerdo con los primeros estudios realizados en Australia, se demostró que este linaje (WCM2) es un eficiente transmisor de WSMV, en condiciones controladas de laboratorio, diferenciándose del otro linaje encontrado, incapaz de actuar como vector (Schiffer *et al.*, 2009). En concordancia, un trabajo reciente en Norte América mostró que poblaciones pertenecientes a uno de los dos linajes descritos en ese país (Type 2) transmitieron WSMV con mayor eficiencia (Wosula *et al.*, 2016). Por otra parte, recientemente, investigadores europeos y norteamericanos demostraron que el linaje llamado por ellos MT-1, el cual se correspondería con WCM2 o Type 2 (solo algunos de los marcadores moleculares utilizados en los diferentes trabajos son los mismo), es uno de los dos principales linajes descritos para *A. tosichella* que definen su estado global como plaga de cereales (Skoracka *et al.*, 2014). Las poblaciones argentinas estudiadas, las cuales estarían representadas en el linaje MT-1, comparten el mismo clado con poblaciones de Brasil, Australia, Polonia y EEUU. Estos resultados concuerdan con lo encontrado para MT-1 y MT-8, considerados como los dos linajes más invasivos y distribuidos en todo el mundo (Skoracka *et al.*, 2014).

Otra característica recientemente estudiada que complejiza los sistemas de manejo, considerando *A. tosichella* como vector de importantes virosis, es la capacidad del linaje MT-1 de ser altamente polífago. Además de estar ampliamente distribuido, se ha demostrado que MT-1 es capaz de colonizar 10 especies de plantas hospederas (trigo, Triticale, maíz, cebada, ajo, cebolla, *Bromus inermis*, *Elymus repens*, *Arhenatherum elatius* y *Tulipa gesneriana*) pertenecientes a las *Poaceae*, *Liliaceae*, *Amarylidaceae* (Skoracka *et al.*, 2014). Por otro lado, en un trabajo reciente realizado en Turquía, región histórica de domesticación y diversificación de trigo y cebada, se encontró, mediante análisis filogenéticos, una excepcionalmente alta diversidad de las poblaciones de *A. tosichella* asociadas a trigo (Szydło *et al.*, 2015). Esta alta variabilidad provee evidencia de que Turquía se encuentra dentro de la distribución original del complejo de especies de *A. tosichella*, como había sido mencionado anteriormente (Skoracka *et al.*, 2014), apoyando la hipótesis del origen de *A. tosichella* en Medio Oriente. Se ha sugerido que la mayor variación genética encontrada en las áreas nativas de una especie, respecto a las áreas invadidas, podría ser el resultado de cuellos de botella y deriva génica experimentados por

las poblaciones invasoras (de Barro y Ahmed 2011). Los resultados presentados en Szydło y col. (2015), sugieren que solamente algunos linajes se habrían dispersado desde Turquía a otras regiones del mundo, debido posiblemente a diferentes características respecto a la adaptación, dispersión y capacidad de supervivencia competitiva. La capacidad de MT-1, de ser altamente polífago, colonizando por ejemplo ajo y cebolla (Skoracka *et al.*, 2014), pudo haber permitido el movimiento de *A. tosichella*, desde su origen, probablemente en Medio Oriente, a todo el mundo.

Por otra parte, un trabajo reciente ha demostrado una alta tolerancia térmica de los linajes MT-1 y MT-8, sugiriendo que su expansión en nuevas áreas fue probablemente favorecida por el calentamiento climático, aumentando de este modo el riesgo de transmisión de virus (Kuczyński *et al.*, 2016). Del mismo modo, tanto en Australia (Coutts *et al.*, 2014) como en Europa (Schubert *et al.*, 2015) se han relacionado los niveles de WSMV con las poblaciones de *A. tosichella*, mostrando un agravio de la enfermedad con temperaturas cálidas.

En este trabajo se encontró solamente uno (WCM2, asociado a la mayor transmisión de virus), de los dos linajes encontrados en trabajos previos en Argentina, sugiriendo un predominio de tal linaje en nuestro país. Anteriormente, se había detectado solamente en la localidad de Azul, un espécimen del linaje WCM1 (Skoracka *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2013). Esto se diferencia de lo que ocurre en Australia, donde se mostró una superposición geográfica de los dos linajes registrados (Schiffer *et al.*, 2009). Lo encontrado en Argentina estaría favoreciendo el establecimiento de las virosis transmitidas por *A. tosichella*, ya que, según lo expresado anteriormente, el linaje encontrado está asociado a una mayor transmisión viral, mayor dispersión y mayor rango de hospedantes.

Por otro lado, los árboles filogenéticos obtenidos en este trabajo, mediante dos marcadores moleculares, concuerdan con los obtenidos en trabajos previos (Skoracka *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2013), mostrando claramente dos grupos definidos, con *A. tulipae* en medio de las poblaciones de *A. tosichella*, sugiriendo que ambas pertenecen al mismo complejo de especies. Anteriormente, *A. tulipae*, descrita por primera vez a partir de

bulbos de tulipán (Liliaceae), se pensaba que era morfológicamente similar a *A. tosichella*. Antecedentes históricos muestran que, durante muchos años ambas especies habían sido identificadas erróneamente. El nombre de *A. tulipae* se había aplicado al ácaro del enrollamiento de trigo (actualmente *A. tosichella*) hasta 1995 (Harvey *et al.*, 1995a, 1995b). En el trabajo de Skoracka y col. (2012) se logró demostrar que los especímenes de *A. tulipae* son más grande que *A. tosichella*. Indudablemente, se necesitan nuevas investigaciones ecológicas y moleculares que aporten más detalles diagnósticos para diferenciar ambas especies.

En relación a los eriófidos recolectados mediante un método de lavado en la zona de Mar y Sierra (provincia de Buenos Aires), no fue posible atribuir un rol de puente verde de *A. tosichella* a ninguno de los hospedantes estudiados, ya que no se detectó dicho vector en las muestras evaluadas. Tampoco se detectó *A. tosichella* en trigo, el cual es su hospedante principal (Somsen y Sill, 1970), a pesar de haberse detectado WSMV en las plantas estudiadas con porcentajes de hasta 20% de incidencia (datos no publicados). Esto indicaría que el vector pudo haber estado presente transmitiendo el virus en trigo, aunque posiblemente con baja densidad poblacional. Sin embargo, resultó interesante el hallazgo de la variedad de especies que se identificaron morfológicamente, y en los casos que fue posible, molecularmente. Por una parte, la identificación de *Abacarus hystrix* representa una advertencia sobre la posible transmisión de otros dos virus a trigo y otros cereales de grano fino, *Agropyron mosaic virus* (AgMV) y *Ryegrass mosaic virus* (RgMV), ya que se ha demostrado que este ácaro es su vector (Mulligan, 1960; Slykhuis, 1969; Guy, 1993). AgMV fue descrito en USA (McKinney, 1937; Slykhuis, 1952; Shepard, 1968), Canadá (Slykhuis, 1962), Finlandia (Bremer, 1964) y Alemania (Schumann, 1969); mientras que RgMV en USA (Bruehl *et al.*, 1957), Reino Unido (Slykhuis *et al.*, 1957) y Canadá (Slykhuis, 1964). Por otra parte, la identificación de otras dos especies de *Aceria*, diferentes de *A. tosichella*, y de otra especie de *Abacarus*, diferentes de *A. hystrix*, manifiestan una diversidad de eriófidos presentes en gramíneas en Argentina aún no exploradas, concordando con el bajo porcentaje, sólo 1,6-8%, estimado para las especies dentro de la familia Eriophyoidea descubiertas actualmente (Amrine *et al.*, 2003). Sin lugar a dudas, los resultados obtenidos manifiestan la importancia de la identificación

detallada de los ácaros eriófidos asociados a gramíneas en Argentina para poder establecer estrategias de manejo de aquellas que constituyen plagas en cultivos de interés. La descripción de nuevas especies de Eriophyoidea es un trabajo continuo, lo cual permitirá ampliar el conocimiento taxonómico de los ácaros eriófidos en nuestro país.

Por otro lado, la detección de la nueva especie de eriófido recolectado sobre *Stipa* en cercanías de lotes infectados con WSMV, indica que esta gramínea es hospedante de un eriófido perteneciente a un género hasta el momento no documentado como vector de virus, lo cual resulta ventajoso para el patosistema en estudio. La descripción de la nueva especie como *Aculodes stipacolus* constituye la primera cita de *Aculodes* en América del Sur. Hasta el momento, todas las especies de *Aculodes* fueron descritas en el hemisferio norte, en Europa, Asia y América del Norte. Sólo una especie de este género, *Aculodes mckenziei* (Keifer, 1944), ha sido reportada en el hemisferio Sur, en Australia y Nueva Zelanda (Frost *et al.*, 1990; Guy y Gould 1996). Cabe resaltar que la literatura taxonómica sobre las especies de *Aculodes* asociadas con gramíneas es escasa, y sumado a esto, la descripción de algunas de ellas no se ha publicado en inglés, dificultando su acceso. Hasta el momento se habían descrito solamente 5 especies en *Stipa*. Cuatro especies de Eriophyidae, tres del género *Aceria*: *A. stipaespunulata* Skoracka 2004 de Polonia, *A. stipaensis* Mitrofanov & Sharonov 1998 de Ucrania (Mitrofanov *et al.*, 1988) y *A. stipacea* Sukhareva, 1983 de Ucrania y también reportada en Kazajistán; y una especie de *Aculodes*, *A. fulleri* (Keifer, 1966a) de California, Merr. & Burt- Davy ex Hall. (actualmente referido como un sinónimo de *S. occidentalis* Thurb. ex S. Watson (The Plant List 2013) de California, USA. El quinto eriófido descrito en *Stipa*, pertenece a una especie de Phytoptidae, *Novophytoptus stipae* Keifer, actualmente referido como un sinónimo de *Stipa speciosa* Trin. & Rupr. (The Plant List 2013).

CONCLUSIONES

En Argentina se detectó solamente la especie críptica más invasiva de *A. tosichella*, denominada WCM2 y Type 2, en trigo. En la zona de Mar y Sierra, de la provincia de Buenos Aires, los cereales y malezas aledañas evaluados no serían hospedantes

alternativos de *A. tosichella*. Sin embargo, se identificaron otras especies pertenecientes a la misma familia Eriophyidae, como *Aculodes stipacolus* y *Abacarus hystrix*. *A. stipacolus* es la primera especie de *Aculodes* que se describe en América del Sur. *A. hystrix* presenta un potencial rol epidemiológico para *Agropyron mosaic virus* (AgMV) y *Ryegrass mosaic virus* (RgMV), dos virosis aún no detectadas en Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

- Amrine J.W.Jr. 2003. Catalog of the Eriophyoidea. A working catalog of the Eriophyoidea of the world. Ver. 1.0. Publicado en Internet, disponible en <http://insects.tamu.edu/research/collection/hallan/acari/eriophyidae>. Activo Junio 2011.
- Amrine J.W.Jr. and Manson D.C.M. 1996. Preparation, mounting and descriptive study of Eriophyoid mites. In Lindquist E.E., Sabelis M.W. and Bruin J. (eds): Eriophyoid Mites – Their Biology, Natural Enemies and Control. World Crop Pests, Vol. 6. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 383-396.
- Bianchin V., Pereira P.R.V, Lau D. e Navia D. Técnica para amostragem, coleta e triagem de ácaros Eriophyideos em poaceas. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2010. 15 p. html. (Embrapa Trigo. Comunicado técnico online, 289). Publicado en Internet, disponible en http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co289.htm. Activo Febrero 2017.
- Bickford D., Lohman D.J., Sodhi N.S., Ng P.K.L., Meier R., Winker K., Ingram K.K. and Das I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends Ecol. Evol. 22: 148–155.
- Bremer K. 1964. Agropyron mosaic virus in Finland. Ann. Agric. Fenn. 3: 324-333.
- Bruehl G.W., Toko H. and McKinney H.H. 1957. Mosaics of Italian ryegrass and orchard grass in western Washington. Phytopathology 47: 517.
- Carew M., Schiffer M., Umina P., Weeks A. and Hoffmann A. 2009. Molecular markers indicate that the wheat curl mite, *Aceria tosichella* Keifer, may represent a species complex in Australia. Bull. Entomol. Res. 99(5): 479-86.
- Carew M.E., Goodisman M.A.D. and Hoffmann, A.A. 2004. Species status and population genetic structure of grapevine eriophyoid mites. Entomol. Exp. Appl. 111: 87-96.
- Castiglioni E. and Navia D. 2010. Presence of the Wheat Curl Mite, *Aceria tosichella* Keifer (Prostigmata: Eriophyidae), in Uruguay. Agrociencia 14:19–26.
- Coutts B.A., Banovic M., Kehoe M.A., Severtson D.L. and Jones R.C. 2014. Epidemiology of *Wheat streak mosaic virus* in wheat in a Mediterranean-type environment. Eur. J. Plant Pathol. 140: 797-813.
- de Barro P. and Ahmed M.Z.. 2011. Genetic networking of the *Bemisia tabaci* cryptic species complex reveals pattern of biological invasions. PLoS ONE6: e25579.
- de Lillo E., Craemer C., Amrine Jr., J.W. and Nuzzaci G. 2010. Recommended procedures and techniques for morphological studies of Eriophyoidea (Acari: Prostigmata). Exp. Appl. Acarol. 51: 283–307.

- Dres M. and Mallet J. 2002. Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 357: 471-492.
- Duso C., Castagnoli M., Simoni S. and Angeli G. 2010. The impact of eriophyoids on crops: recent issues on *Aculus schlechtendali*, *Calepitrimerus vitis* and *Aculops lycopersici*. *Exp. Appl. Acarol.* 51: 151-168.
- Flechtmann C.H.W. and Aranda B.R.C. 1970. New records and notes on Eriophyid mites from Brazil and Paraguay, with a list of Eriophyidae from South America. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 72: 94-98.
- Flechtmann C.H.W. 2000. Two new species of *Aceria* (Acari: Eriophyidae) on grass from Brazil. *Int. J. Acarol.* 26: 335-338.
- Frost W.E., Eagling D.R. and Manson D.C.M. 1990. *Abacarus hystrix* (Nalepa) (Acarina: Eriophyidae) newly recorded in Australia. *Aust. J. Entomol.* 29: 182.
- Guy P.L. and Gould D.M. 1996. *Aculodes mckenziei* (Acari: Eriophyidae) newly recorded in New Zealand and its association with other eriophyids in South Island pastures. *New Zealand Entomol.* 19: 61-64.
- Guy P.L. 1993. First record of *ryegrass mosaic virus* and its mite vector *Abacarus hystrix* (Nal.) in New Zealand. *N. Z. J. Agric. Res.* 36:377-379.
- Hall T.A. 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Harvey T.L., Martin T.J., Seifers D.L. and Sloderbeck P.E. 1995. Adaptation of wheat curl mite (Acari: Eriophyidae) to resistant wheat in Kansas. *J. Agric. Entomol.* 12: 119-125.
- Harvey T.L., Seifers D.L., Martin T.J., Brown-Guedira F.L. and Gill B.S. 1999. Survival of wheat curl mites on different sources of resistance in wheat. *Crop Sci.* 39: 1887-1889.
- Harvey T.L., Martin T.J. and Seifers D.L. 1995b. Survival of five wheat curl mite *Aceria tosichella* Keifer (Acari: Eriophyidae) strains on mite resistant wheat. *Exp. Appl. Acarol.* 19: 459-463.
- Harvey T.L., Martin T.J., Seifers D.L. and Sloderbeck P.E. 1995a. Adaptation of wheat curl mite (Acari: Eriophyidae) to resistant wheat in Kansas. *J. Agric. Entomol.* 12: 119-125.
- Hein G.L., French R., Siriwetwivat B. and Amrine J. W. 2012. Genetic characterization of North American populations of the wheat curl mite and dry bulb mite. *J. Econ. Entomol.* 105:1801-1808. 10.1603/EC11428.
- Hein G.L., French R., Siriwetwivat B. and Amrine J.W. 2012. Genetic characterization of North American populations of the wheat curl mite and dry bulb mite. *J. Econ. Entomol.* 105: 1801-1808.
- Jeppson L.R., Keifer H.H. and Baker E.W. 1975. *Mites injurious to economic plants.* University of California Press, Los Angeles.
- Keifer H.H. 1944. Eriophyid Studies XIV. *Bulletin of the California Department of Agriculture* 33: 18-38.
- Keifer H.H. 1959. Eriophyid studies XXVII. *Bulletin of the California Department of Agriculture.*
- Keifer H.H. 1966a. Eriophyid studies B-20. Sacramento (CA): California Department of Agriculture.

- Keifer H.H. 1976. Eriophyid studies C-12. Sacramento (CA): California Department of Agriculture.
- Keifer H.H. 1977. Eriophyid studies C-13. Sacramento (CA): California Department of Agriculture.
- Keifer H.H. 1978. Eriophyid studies C-15. Sacramento (CA): California Department of Agriculture.
- Kuczyński L, Rector B.G., Kiedrowicz A., Lewandowski M., Szydło W. and Skoracka A. 2016. Thermal Niches of Two Invasive Genotypes of the Wheat Curl Mite *Aceria tosichella*: Congruence between Physiological and Geographical Distribution Data. PLoS ONE 11(4): e0154600. doi:10.1371/journal.pone.0154600.
- Lindquist E.E., Sabelis M.W. and Bruin J. 1996. Eriophyoid Mites –Their Biology, Natural Enemies and Control. (Elsevier Science Publishers: Amsterdam).
- Malik R, Smith C.M, Brown-Guedira G.L, Harvey T.L. and Gill B.S. 2003. Assessment of *Aegilops tauschii* for resistance to biotypes of wheat curl mite (Acari: Eriophyidae). J Econ. Entomol. 96(4): 1329-1333.
- McKinney H.H. 1937. Mosaic diseases of wheat and related cereals. US Department of Agric.Circ. 442: 1-23.
- Miller A.D., Skoracka A., Navia D., Santos de Mendonca R., Szydło W., Schultz M.B., Smith C.M., Truol G. and Hoffmann A.A. 2013. Phylogenetic analyses reveal extensive cryptic speciation and host specialization in an economically important mite taxon. Mol. Phylogenet. Evol. 66: 928–940.
- Mitrofanov V.I., Sharonov A.A. and Badulin A.V. 1988. New species of mites of the genus *Aceria* (Acariformes, Eriophyoidea). Zoologicheskii Zhurnal 67: 790–794.
- Mulligan T.E. 1960. The transmission by mites, host-range and properties of *ryegrass mosaic virus*. Ann. Appl. Biol. 48: 575–579.
- Navajas M. and Navia D. 2010. DNA-based methods for eriophyoid mite studies: review, critical aspects, prospects and challenges. Exp. Appl. Acarol. 51: 257–271.
- Navia D., Truol G., Mendonça R.S. and Sagadín M. 2006. *Aceria tosichella* Keifer (Acari: Eriophyidae) from *Wheat Streak Mosaic Virus*-infected wheat plants in Argentina. I. J. Acarol. 32:189–193.
- Navia D., de Mendonca R.S., Skoracka A., Szydło W.,Knihinicki D., Hein G.L., da Silva Pereira P.R.V., Truol G. and Lau D. 2013. Wheat curl mite, *Aceria tosichella*, and transmitted viruses: an expanding pest complex affecting cereal crops. Exp. Appl. Acarol. 59: 95–143.
- Navia D., de Moraes G.J., Roderick G. and Navajas M. 2005. The invasive coconut mite, *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae): origin and invasion sources inferred from mitochondrial (16S) and nuclear (ITS) sequences. Bull. Entomol. Res. 95: 505-516.
- Pereira P.R.V.S, Navia D., Salvadori J.R and Lau D. 2009. Occurrence of *Aceria tosichella* in Brazil. Pesq. Agropec. Bras. 44: 539–542.
- Perring T.M. 2001. The *Bemisia tabaci* species complex. Crop Prot. 20: 725-737.
- Schiffer M., Umina P., Carew M., Hoffmann A., Rodoni B. and Miller A. 2009. The distribution of wheat curl mite (*Aceria tosichella*) lineages in Australia and their potential to transmit wheat streak mosaic virus. Ann. Appl. Biol. 155: 371–379.
- Schubert J., Ziegler A. and Rabenstein F. 2015. First detection of *wheat streak mosaic virus* in Germany: molecular and biological characteristics. Arch. Virol. 160: 1761–1766.

- Schumann K. 1969. Untersuchungen zur Charakterisierung des Queckenmosaikvirus (*agropyron mosaic virus*). J. Phytopathol. 64(3): 258-275.
- Seifers D.L., Harvey T.L., Louie R., Gordon D.T. and Martin T.J. 2002. Differential transmission of isolates of the High Plains virus by different sources of wheat curl mites. Plant Dis. 86: 138-142.
- Shepard J.F. 1968. Occurrence of *Agropyron mosaic virus* in Montana. Plant Dis. Rep. 25: 139-141.
- Skoracka A. 2004. Eriophyid mites from grasses in Poland (Acari: Eriophyoidea). Genus 13:1–205.
- Skoracka A. and Dabert M. 2010. The cereal rust mite *Abacarus hystrix* (Acari Eriophyoide) is a complex of species: evidences from mitochondrial and nuclear DNA sequences. Bull. Entomol. Res. (3): 263-272.
- Skoracka A., Rector B., Kuczyński L., Szydło W., Hein G. and French R. 2014. Global spread of wheat curl mite by its most polyphagous and pestiferous lineages. Ann. Appl. Biol. 165(2): 222-35.
- Skoracka A., Kuczynski L., de Mendonça R.S., Dabert M., Szydło W., Knihinicki D., Truol G. and Navia D. 2012. Cryptic species within the wheat curl mite *Aceria tosichella* (Keifer) (Acari, Eriophyoidea) revealed by mitochondrial, nuclear and morphometric data. Invertebrate Systematics 26: 417-433.
- Slykhuo J.T. 1969. Transmission of agropyron mosaic virus by the eriophyid mite, *Abacarus hystrix*. Phytopathology 59: 29-32.
- Slykhuis J.T., Watson M.A. and Mulligan T. 1957. Report of The Rothamsted Experiment Station for 1956: 105 p.
- Slykhuis J.T. 1952. Virus diseases of cereal crops in South Dakota. S. Dakota. Agr. Expt. Sta. Tech. Bull. 11. 29 pp.
- Slykhuis J.T. 1962. *Agropyron mosaic virus* as a disease of wheat in Canada. Can. J. Bot. 40: 1439-1447.
- Slykhuis J.T. 1964: Noteworthy and new records of grass viruses in Canada in 1964. Canadian plant disease survey 44: 242-243.
- Somsen H.W. and Sill W.H. 1970. The Wheat Curl Mite, *Aceria tulipae* Keifer, in Relation to Epidemiology and Control of *Wheat Streak Mosaic*. Research Publication 162. Agricultural Experiment Station, Kansas State University of Agriculture and Applied Science, Manhattan, NY.
- Szydło W., Hein G., Denizhan E. and Skoracka A. 2015. Exceptionally high levels of genetic diversity in wheat curl mite (Acari: Eriophyidae) populations from Turkey. J. Econ. Entomol. 108(4): 2030±9.
- The Plant List 2013. Version 1.1. Publicado en Internet, disponible en <http://www.theplantlist.org/>. Activo Marzo 2016.
- Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through weighting position-specific gap penalties and weight matrix. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680.
- Wosula E.N., McMechan A.J., Oliveira-Hofman C., Wegulo S.N. and Hein GL. 2016. Differential transmission of two isolates of *Wheat streak mosaic virus* by five wheat curl mite populations. Plant Dis. 100(1): 154-8.

CAPÍTULO 6

EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE CULTIVARES DE TRIGO FRENTE AL WSMV Y SU VECTOR *Aceria tosichella* EN TRANSMISIONES EXPERIMENTALES CON EL VECTOR

INTRODUCCIÓN

Como cualquier enfermedad de origen viral, el control para disminuir las pérdidas ocasionadas por WSMV está enfocado en la prevención. Una vez que las plantas se enfermaron, no hay medidas curativas que se puedan establecer. Entre las principales medidas de manejo para el patosistema en estudio, WSMV, el cual se transmite por semilla, y su vector, *A. tosichella* (wheat curl mite, WCM) se destacan las prácticas culturales y la utilización de materiales resistentes o tolerantes (Wegulo *et al.*, 2008; McMullen y Waldstein, 2010). El control químico del vector es ineficiente y costoso debido a que el ácaro se instala principalmente en las zonas enrolladas de las hojas (Harvey *et al.*, 1998; Hein, 2010).

Entre las prácticas culturales se destaca la eliminación de los hospedantes alternativos reservorios de virus y vector llamados puentes verdes. Por lo tanto, se recomienda la eliminación de malezas gramíneas, trigos y maíces espontáneos. Otras medidas son evitar siembras tempranas de trigo cercanas a la cosecha del maíz (puente verde de virus y vector) y la no utilización de semillas provenientes de lotes enfermos (Thomas *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2005; Coutts *et al.*, 2014).

Como medida primordial, en conjunto con las prácticas anteriormente mencionadas, se considera la utilización de materiales genéticos tolerantes o resistentes. Se han descrito dos tipos diferentes de resistencia o tolerancia a esta enfermedad, una vinculada al virus y otra al vector. Fueron descritos tres genes que confieren resistencia al virus denominados *Wsm1* (Friebe *et al.*, 1991; Gill *et al.*, 1995), *Wsm2* (Haley *et al.*, 2002) y *Wsm3* (Friebe *et al.*, 2011), y cuatro que confieren resistencia al vector denominados

Cmc1 (Thomas y Conner 1986), *Cmc2* (Whelan y Hart 1988), *Cmc3* y *Cmc4* (Malik *et al.*, 2003). Solamente *Wsm2* se encuentra en trigos convencionales. *Wsm1* y *Wsm3* provienen del trigo silvestre, *Thinopyrum intermedium*. Los genes *Wsm1*, *Wsm2* y *Wsm3* son termo-sensibles, o también conocidos como TSR (Temperature-Sensitive Resistance), los cuales pierden la efectividad a temperaturas elevadas (entre 24-27°C) (Seifers *et al.*, 1995; 2006; 2007; 2013). Actualmente, en los programas de mejoramiento de trigo de Estados Unidos, Australia y Argentina donde esta enfermedad resulta de importancia se están haciendo esfuerzos en la búsqueda de nuevas fuentes y más duraderas de resistencia empleando diferentes estrategias como es la utilización de genes apilados o combinados.

Asimismo, se describieron eventos transgénicos resistentes al WSMV, cuyas construcciones desarrolladas comprendieron a las proteínas N1b (Sivamani *et al.*, 2000), N1a (Fahim *et al.*, 2010) y CP (Sivamani *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005; Rupp *et al.*, 2014), y un amiRNA policistrónico blanco de 5 secuencias genómicas (5'UTR de la proteína P3 en la región pipo y aguas arriba de la misma, P1 y HC-Pro) (Fahim *et al.*, 2012a). Todos estos genes han sido incorporados en diferentes líneas de trigo confirmando solamente una protección parcial frente a la enfermedad, o bien, no han sido completamente aceptadas por parte de los productores debido a varios factores. Entre ellos, materiales mejorados poseen menor rendimiento (Sharp *et al.*, 2002), no se adaptan a distintas zonas climáticas o nuevas poblaciones de virus y vector logran romper la resistencia (Harvey *et al.*, 1999; Hein, 2010).

Como se mencionó en la introducción general de esta Tesis, Argentina y Brasil investigaron el patosistema en estudio en forma conjunta por varios años, debido al riesgo que representa el mismo para los países productores de trigo del Cono Sur. En el marco de estas investigaciones, Argentina, con el Grupo de Mejoramiento, Biotecnología y Patología de trigo de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Marcos Juárez, junto al Grupo de investigadores de enfermedades virales de trigo del Instituto de Patología Vegetal (IPAVE) de INTA, caracterizaron y desarrollaron germoplasma de trigo con resistencia al WSMV y al ácaro vector. Se desarrolló germoplasma mediante cruzamientos utilizando diferentes fuentes de resistencia y diversos fondos genéticos con material local

adaptado e introducido. Asimismo, fueron seleccionados materiales portadores de los genes *Wsm1* y *Cmc3* en poblaciones segregantes (piramidización) mediante selección asistida por marcadores moleculares (Bainotti *et al.*, 2013a). Además, investigadores argentinos y brasileros se plantearon si el factor hospedero es el responsable de la diferencia de comportamiento de la virosis en Argentina, donde la enfermedad se presenta en forma más severa en comparación a Brasil, donde a pesar de estar presente la virosis, no se observaron epidemias. Se programaron transmisiones experimentales en ambos países. En Brasil, las evaluaciones de diferentes cultivares de trigo se realizó mediante transmisiones mecánica del WSMV. Mientras que en Argentina las evaluaciones se realizaron mediante transmisiones con el ácaro vector de manera de acercarse más a lo que acontece en condiciones de campo, e incorporar en el estudio la evaluación no solo del virus WSMV sino también del ácaro vector.

El objetivo del presente capítulo fue evaluar el comportamiento de cultivares de trigo, argentinos y brasileros, frente al complejo *Wheat streak mosaic virus-Aceria tosichella* (WSMV-A. *tosichella*) en transmisiones experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Multiplicación de inóculo y del ácaro vector

Se multiplicaron dos de los 13 aislamientos de WSMV y su colonia de ácaro vector correspondiente, estudiados en los Capítulos 2 y 3. Se seleccionó un aislamiento de la provincia de Buenos Aires (GM-2009, General de Madariaga-2009) y otro de la provincia de Córdoba (MJ-2010, Marcos Juárez-2010) por corresponder a dos subregiones trigueras diferentes en las que se presentaron epifitias regionales en 2007 y 2012 respectivamente (Tabla 6.1). Los ácaros correspondientes a los dos aislamientos de WSMV fueron identificados como linaje WCM2 de *A. tosichella* (o Type 2), como se describió en el Capítulo 5. Una vez establecidas las colonias de ácaros, provenientes de plantas enfermas de campo, éstas fueron multiplicadas a gran escala (para lograr obtener inóculo suficiente para infectar los cultivares a probar) sobre plántulas de trigo en sala de cría bajo

condiciones de 25 ± 3 °C y fotoperíodo de 16 hs. de luz (Fig. 6.1 C y F). Se corroboró la infección de las plantas de trigo con síntomas característico de mosaico estriado mediante DAS-ELISA con antisueros comerciales específicos (Agdia). La detección viral se realizó a los 15 días post-infección para obtener mayor concentración viral y densidad poblacional del ácaro. Asimismo, las plantas fueron observadas bajo lupa para registrar la presencia del vector y determinar la presión de inóculo para realizar las transmisiones.

Tabla 6.1. Aislados de *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) y de *A. tosichella* utilizados para evaluar cultivares de trigo.

Complejo WSMV-A. <i>tosichella</i>	Origen geográfico	WSMV				WCM
		Nombre del aislado correspondiente a los Capítulos 2 y 3	Año del aislado	Hospedante	Relación filogenética ^a	Linaje de <i>A. tosichella</i> ^b
GM-2009	General de Madariaga, (Buenos Aires)	WSMV08	2009	Trigo	Clado D	WCM2
MJ-2010	Marcos Juárez, (Córdoba)	WSMV13	2010	Trigo	Clado D	WCM2

^aAislamientos asignado a clados basados en la comparación de secuencias consenso de la proteínas de la cubierta (Stenger *et al.*, 2002 y Capítulo 2 de esta Tesis). ^bLinaje de *A. tosichella* basado en la comparación de secuencias consenso de las regiones 16S de mtDNA y una región de los espaciadores transcritos internos (ITS) del rDNA (Skoracka *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2013 y Capítulo 5 de esta Tesis).

Transmisión del complejo WSMV-A. *tosichella* bajo condiciones de invernáculo

Los ensayos de transmisión en condiciones de invernáculo se realizaron en el IPAVE-INTA. Las condiciones controladas fueron: temperatura de 25 ± 3 °C, y luz con fotoperíodo de 16 hs. Los experimentos se realizaron empleando un diseño experimental con tres repeticiones, infectando 3 plantas por cada cultivar en cada repetición. Los ensayos fueron sembrados e inoculados al estado de tercera hoja (aproximadamente 21 días), considerando una presión de inóculo de aproximadamente 10 ácaros infectados con WSMV por planta (Stenger *et al.*, 2005). Se sujetaron con pinzas las plantas infectadas sobre las sanas por un período de 4 días (Orlob, 1966) (Fig. 6.1 D y E). Se evaluaron un

total de 32 cultivares, de los cuales Baguette 11 y 21 son utilizados en Argentina y 27 cultivares en Brasil. Además, se evaluó el cruzamiento KS93WGRC27/ProINTA Super, obtenido por el Grupo de Mejoramiento de Argentina. El cultivar KS93WGRC27 posee el gen *Wsm1* (Gill *et al.*, 1995) y ProINTA Super el gen *Cmc3*, translocación 1A/1R de *Secale cereale* L (Bainotti *et al.*, 2009). También, se evaluaron dos cultivares de Estados Unidos, MACE y CO9602930-2, los cuales poseen los genes *Wsm1* (Graybosch *et al.*, 2009) y *Wsm2* (Lu *et al.*, 2011), respectivamente. Las plantas transmitidas se conservaron en condiciones de invernáculo. Se evaluó de severidad de síntomas a los 21 días pos-inoculación utilizando la metodología de Langham (2009), la cual propone una escala de seis clases, descritas en la Tabla 6.2. Conjuntamente con la evaluación de síntomas, se colectó una hoja recién emergida y completamente expandida de cada planta inoculada. Las muestras de hojas colectadas se conservaron a -20°C para luego ser analizadas mediante DAS-ELISA con antisueros comerciales específicos (Agdia) para la detección y cuantificación viral.

Tabla 6.2. Escala de seis clases según la metodología de Langham (2009) para la evaluación de severidad de síntomas

Clasificación	Descripción de síntomas
0	Sin síntomas visibles
1	Síntomas muy leves, pequeñas zonas con mosaicos aislados, sin retraso del crecimiento
2	Síntomas leves, áreas pequeñas con mosaico de color verde claro o amarillo, estrías menores a una pulgada de largo, atrofia leve
3	Síntomas moderados, áreas con mosaico predominantemente amarillo, coalescencia de las áreas aisladas de estrías que se extienden al largo de la longitud de la hoja, retraso del crecimiento moderado
4	Síntomas severos, mosaico severo amarillo que cubre la mayor parte de la hoja, algunas áreas pequeñas con necrosis, atrofia severa
5	Síntomas muy severos; amarillamiento extremo, necrosis, retraso del crecimiento muy grave, algunas plantas presentan hojas muertas o muerte de la planta entera

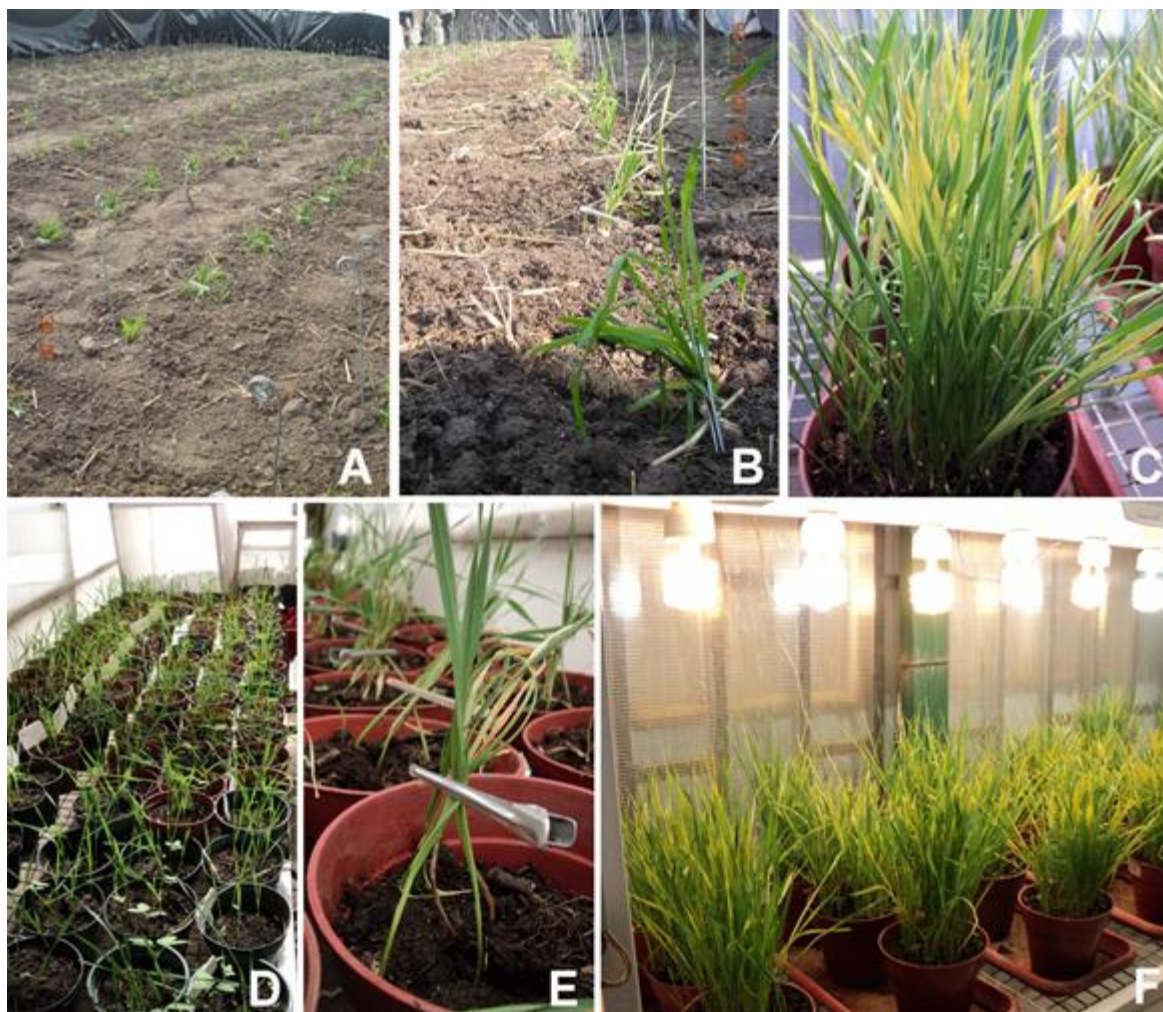


Fig. 6.1. Ensayos de transmisión del complejo WSMV-*A.tosichella* bajo condiciones de campo (A y B) e invernáculo (D y E). Multiplicación de inóculo viral y del ácaro vector bajo condiciones controladas (C y F).

Transmisión del complejo WSMV-*A. tosichella* bajo condiciones de campo

Se realizaron los experimentos con tres repeticiones usando parcelas tipo Hill-plots en la EEA Marcos Juárez (32°42'S, 62°06'O), infectando 1 planta por cada cultivar en cada repetición. Los ensayos fueron sembrados e inoculados al estado de tercera hoja (aproximadamente 21 días). Se consideró una presión de inóculo de aproximadamente 10 ácaros infectados con WSMV por planta (Stenger *et al.*, 2005). Se sujetaron con pinzas las plantas infectadas sobre las sanas por un período de 4 días (Orlob, 1966) (Fig. 6.1 A y B). Se transmitieron 40 materiales, de los cuales 4 se emplean en Argentina (BioINTA 1006,

2004, 3003 y SY200) y 30 en Brasil. También, se evaluaron los cruzamientos KS93WGRC27/ProINTA Super, KS93WGRC27/Baguette 20, KS93WGRC27/Baguette 21 y KS93WGRC27/Baguette Premium 11, obtenidos por el Grupo de Mejoramiento de Argentina. Del mismo modo que en condiciones de invernáculo, se evaluaron los dos cultivares de Estados Unidos, MACE y CO9602930-2. Se evaluó la severidad de síntomas utilizando la metodología de Langham (2009), como se describió anteriormente. Se colectó la hoja bandera de cada planta inoculada, las cuales fueron conservadas a -20°C para luego ser analizadas mediante DAS-ELISA con antisueros comerciales específicos (Agdia) para la detección y cuantificación viral.

Análisis estadístico

Para ambos ensayos, en condiciones de invernáculo y de campo, se emplearon los mismos análisis estadísticos que se describen a continuación. Se trabajó con absorbancias relativas para comparar los valores obtenidos en las diferentes placas de DAS-ELISA. Se empleó un modelo generalizado binomial para el cálculo de los valores de Absorbancia relativa ($\text{Absorbancia de planta transmitida} / \text{Absorbancia de planta sana promedio} + 3 \text{ desvíos}$), considerando como criterio de clasificación al aislamiento del virus (año) y el cultivar, y realizando prueba de comparaciones múltiples DGC. Se utilizó el programa InfoStat para los análisis estadísticos. Se analizó el grado de asociación entre Absorbancia relativa y grado de severidad mediante Análisis de Correlación de Spearman. Asimismo, se categorizaron los cultivares empleando el criterio descrito en Fahim y col. (2012b). Este criterio considera como susceptibles a los cultivares con una puntuación por arriba de 2 en los valores de Absorbancia relativa. Los cultivares susceptibles, tolerante y los no infectados fueron resaltados en color rojo, amarillo y verde respectivamente en las Tablas 6.3 y 6.4.

RESULTADOS

Transmisión del complejo WSMV-A. *tosichella* bajo condiciones de invernáculo

El comportamiento de los cultivares frente a la infección de WSMV-A. *tosichella* en condiciones de invernáculo mostró que hubo diferencias estadísticamente significativas (los tres valores $p < 0.001$) entre los aislamientos evaluados, entre cultivares, y que conjuntamente hay interacción significativa entre estas dos variables.

En la Figura 6.2 se presentan los valores de Absorbancia relativa para cada cultivar evaluado en función de los dos inóculos, GM-2009 y MJ-2010, en condiciones de invernáculo. Utilizando el inóculo GM-2009, se infectaron 27 cultivares, a diferencia de los siguientes cinco, CD 119, BRS208, CD 114, Campeiro y Mirante, los cuales resultaron negativos para WSMV. Mientras que, con el inóculo MJ-2010 se infectaron los 32 cultivares evaluados. Todos los cultivares presentaron mayores valores de absorbancia relativa, y por lo tanto acumulación del WSMV, con el inóculo MJ-2010 que con el inóculo GM-2009, excepto Safira que presentó valores similares de absorbancia para ambos inóculos. Además, se presentan en la Figura 6.2, los valores de porcentajes de plantas enfermas sobre cada una de las barras, en color rojo y azul, correspondientes a los inóculos GM-2009 y MJ-2010 respectivamente. De la misma manera, todos los cultivares presentaron mayores valores de porcentajes de plantas enfermas con el inóculo MJ-2010 que con el inóculo GM-2009.

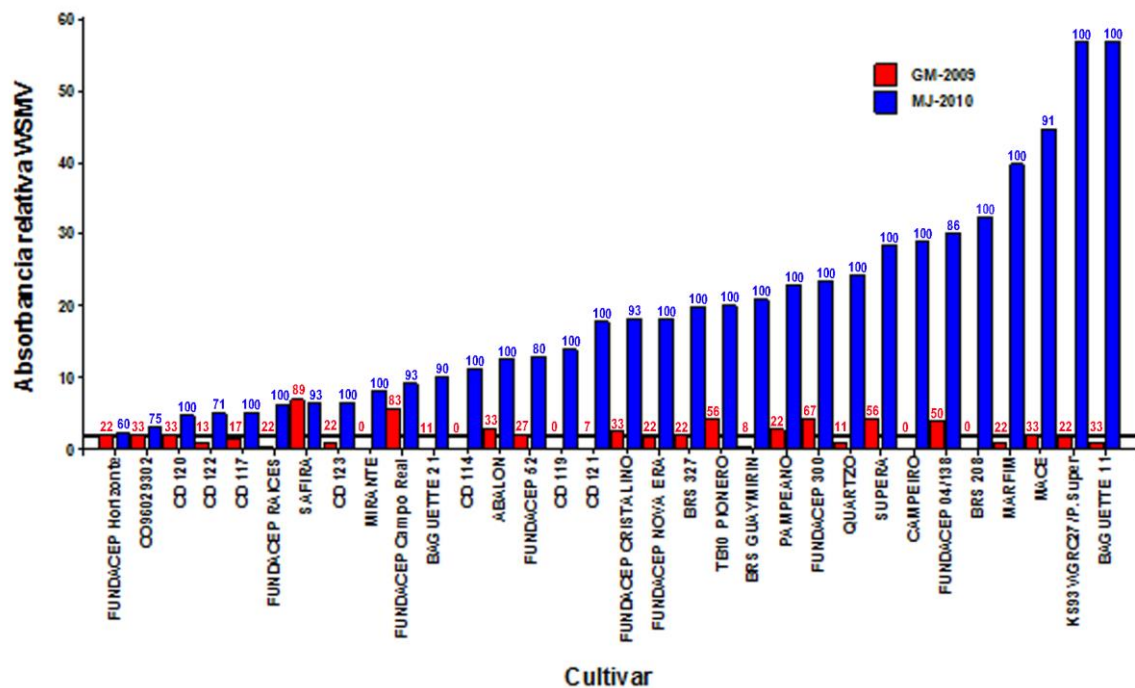


Fig. 6.2. Absorbancia relativa de WSMV en función de los dos inóculos GM-2009 y MJ-2010, para cada cultivar evaluado en condiciones de invernáculo. Los números por encima de cada barra representan el porcentaje de plantas infectadas con GM-2009 y MJ-2010 en rojo y azul respectivamente.

Los cultivares susceptibles, tolerante y los no infectados se presentan resaltados con diferentes colores en la Tabla 6.3. Asimismo, se presentan los valores de Absorbancia relativa media, significancia de la interacción, según prueba de comparaciones múltiples, y grado de severidad para cada cultivar evaluado en función de los dos inóculos diferentes en condiciones de invernáculo. También, se resaltan en color gris 9 cultivares, 8 brasileros y el cruzamiento KS93WGRC27/ProINTA Super, que se comportaron como tolerantes o no infectados tanto en condiciones de invernadero como de campo con GM-2009 (descrito más adelante y resaltados también en Tabla 6.4). Resultaron 15, 12 y 5 cultivares susceptibles, tolerante y no infectados respectivamente con el inóculo GM-2009, a diferencia de MJ-2010, con el cual resultaron susceptibles los 32 cultivares evaluados. Los grados de severidad registrados para el inóculo GM-2009 fueron 0, 1 y 2, mientras que para MJ-2010 se registró grado 2 en todos los casos. Se encontró correlación positiva alta, estadísticamente significativa (coeficiente de correlación 0,78 con valor $p > 0.001$) entre Absorbancia relativa y grado de severidad. Estos resultados muestran que el aislamiento

MJ-2010 presentó mayor acumulación viral y severidad de síntomas que cuando los cultivares estaban inoculados con el aislamiento GM-2009. KS93WGRC27/ProINTA Super se comportó como tolerante frente a la inoculación con GM-2009 en condiciones de invernáculo.

Tabla 6.3. Categorización de los cultivares evaluados en función de los inóculos GM-2009 y MJ-2010 en condiciones de invernáculo. Valores de Absorbancia relativa media, significancia de la interacción, según prueba de comparaciones múltiples DGC, y grados de severidad. Los cultivares susceptibles, tolerante y los no infectados fueron resaltados en color rojo, amarillo y verde respectivamente. Se resaltan en color gris los cultivares que se comportaron como tolerantes o no infectados en condiciones de invernadero y campo.

Cultivar	GM-2009			MJ-2010		
	Media Absorbancia relativa	Significancia de la interacción	Severidad	Media Absorbancia relativa	Significancia de la interacción	Severidad
SAFIRA	7	D	2	6,4	D	2
FUNDACEP Campo Real	5,8	D	1	9,2	D	2
FUNDACEP 300	4,2	D	1	23,4	C	2
SUPERA	4,2	D	2	28,5	C	2
TB10 PIONERO	4,2	D	1	20	C	2
FUNDACEP 04/138	4,1	D	1	30,3	C	2
PAMPEANO	2,9	E	0	23	C	2
ABALON	2,8	E	2	12,5	D	2
FUNDACEP CRISTALINO	2,6	E	2	18,2	C	2
CD 120	2,3	E	0	4,8	D	2
FUNDACEP 52	2,2	E	0	12,9	D	2
MACE	2,2	E	0	44,7	B	2
CO9602930-2	2,1	E	0	3,1	E	2
BRS 327	2	E	1	20	C	2
FUNDACEP Horizonte	2	E	0	2,4	E	2
KS93WGRC27/ProINTA Super	1,8	E	0	56,8	A	2
FUNDACEP NOVA ERA	1,6	E	0	18,2	C	2
CD 117	1,5	E	1	5,3	D	2
BAGUETTE 11	1,1	E	1	57	A	2
CD 122	1,1	E	2	5	D	2
CD 123	1	E	1	6,4	D	2
QUARTZO	0,9	E	0	24,3	C	2
MARFIM	0,8	E	0	39,8	B	2
BRS GUAYMIRIN	0,5	E	0	20,9	C	2
FUNDACEP RAICES	0,4	E	0	6,2	D	2
CD 121	0,2	E	0	17,9	C	2
BAGUETTE 21	0,1	E	0	10,2	D	2
BRS 208	0	E	1	32,5	C	2
CAMPEIRO	0	E	1	29	C	2
CD 114	0	E	1	11,3	D	2
CD 119	0	E	0	13,9	D	2
MIRANTE	0	E	0	8,4	D	2

Transmisión del complejo WSMV-A. *tosichella* bajo condiciones de campo

La evaluación del comportamiento de los cultivares seleccionados frente a la infección de WSMV-A. *tosichella* en condiciones de campo mostró que hubo diferencias estadísticamente significativas (valores $p < 0.001$) entre los aislamientos evaluados.

En la Figura 6.3 se presentan los valores de Absorbancia relativa para cada cultivar evaluado en función de los dos inóculos, GM-2009 y MJ-2010, en condiciones de campo. Los cultivares inoculados con el aislamiento MJ-2010 siempre alcanzaron mayores valores de absorbancia, y por lo tanto concentración de viral, que los inoculados con GM-2009. De los 40 materiales evaluados, los siguientes trece infectados con el aislamiento GM-2009 resultaron negativos para WSMV: Abalone, BioINTA 3003, BRS 208, BRS 327, CD 123, CO960293-2, Fundacep 04-138, Fundacep 51, Fundacep Cristalino, Fundacep Horizonte, Fundacep Nova Era, Marfin y MACE. Por el contrario, con el aislamiento MJ-2010 se infectó la totalidad de los cultivares evaluados, con excepción del cultivar MACE.

En la Tabla 6.4 se presentan los valores de Absorbancia relativa media y grado de severidad para cada cultivar evaluado en función de los dos inóculos en condiciones de campo. Se categorizaron los cultivares con diferentes colores del mismo modo que los presentados para condiciones de invernáculo. Resultaron 15, 12 y 13 cultivares susceptibles, tolerante y no infectados respectivamente con el inóculo GM-2009, a diferencia de MJ-2010, con el cual resultaron susceptibles los 39 cultivares evaluados, excepto MACE, el cual resultó no infectado. En color gris fueron resaltados los 9 cultivares que se comportaron como tolerantes o no infectados en condiciones de invernadero y campo con GM-2009. Los grados de severidad registrados para el inóculo GM-2009 fueron 0 y 1; mientras que para MJ-2010 se registraron grado 1, 2, 3 y 4. Se encontró correlación positiva moderada, estadísticamente significativa (coeficiente de correlación 0,65 con valor $p > 0.001$) entre Absorbancia relativa y grado de severidad para el inóculo GM-2009. Mientras que para el inóculo MJ-2010, no se encontró correlación estadísticamente significativa entre esas dos variables.

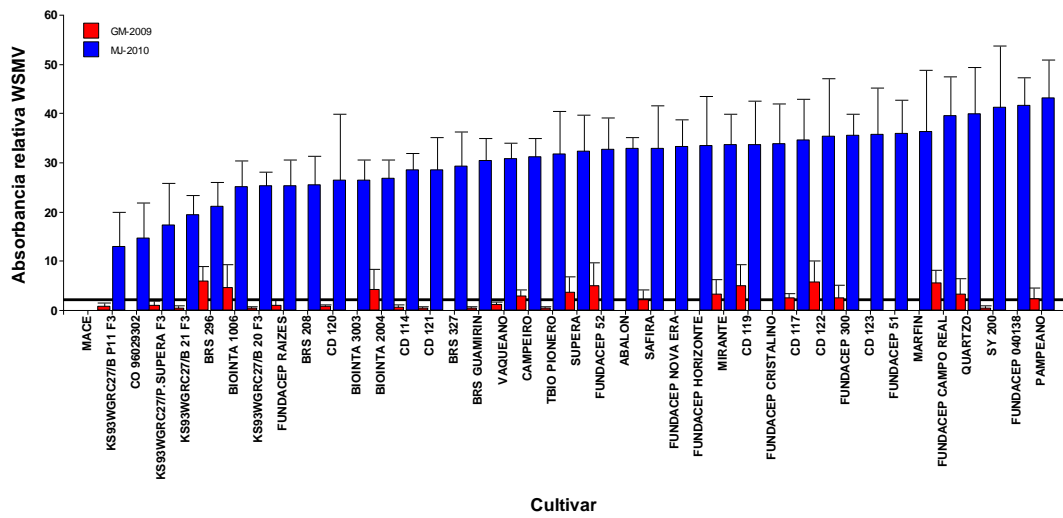


Fig. 6.3. Absorbancia relativa de WSMV para cada cultivar evaluado en función de dos inóculos diferentes, GM-2009 y MJ-2010, en condiciones de campo. Cultivares con valores de Absorbancia relativa por arriba de 2 son considerados susceptibles.

Tabla 6.4. Categorización de los cultivares evaluados según Medias de Absorbancia relativa y grado de severidad en función de dos inóculos diferentes, GM-2009 y MJ-2010 en condiciones de campo. Los cultivares susceptibles, tolerante y los no infectados fueron resaltados en color rojo, amarillo y verde respectivamente.

Cultivar	GM-2009		MJ-2010	
	Media Absorbancia relativa	Severidad	Media Absorbancia relativa	Severidad
BRS 296	5,9	1	21	4
CD 122	5,6	1	35,4	4
FUNDACEP CAMPO REAL	5,5	0	39,5	2
CD 119	5	1	33,7	4
FUNDACEP 52	4,9	1	32,7	4
BIOINTA 1006	4,6	1	25,1	3
BIOINTA 2004	4,2	1	26,9	2
SUPERA	3,7	1	32,4	2
QUARTZO	3,2	1	39,8	4
MIRANTE	3,2	1	33,6	4
CAMPEIRO	2,8	0	31,2	3
FUNDACEP 300	2,6	1	35,5	2
CD 117	2,5	0	34,5	4
PAMPEANO	2,3	1	43	4
SAFIRA	2,1	0	32,9	4
VAQUEANO	1,1	0	30,7	3
FUNDACEP RAICES	1	1	25,3	4
KS93WGRC27/ProINTASuper F3	0,9	0	17,3	2
KS93WGRC27/B P11 F3	0,8	0	13	2
CD 120	0,7	0	26,4	4
CD 114	0,6	0	28,4	4
KS93WGRC27/B 21 F3	0,4	0	19,4	2
SY 2000	0,4	0	41,2	3
KS93WGRC27/B 20 F3	0,4	0	25,3	2
CD 121	0,4	0	28,4	4
TBIO PIONERO	0,4	0	31,7	2
BRS GUAYMIRIN	0,3	0	30,5	4
ABALON	0	0	32,8	3
BIOINTA 3003	0	0	26,4	3
BRS 208	0	0	25,5	3
BRS 327	0	0	29,2	2
CD 123	0	0	35,7	4
CO 96029302	0	0	14,6	1
FUNDACEP 040138	0	0	41,6	4
FUNDACEP 51	0	0	36	3
FUNDACEP CRISTALINO	0	0	33,8	3
FUNDACEP HORIZONTE	0	0	33,3	3
FUNDACEP NOVA ERA	0	0	33,3	2
MARFIN	0	0	36,2	4
MACE	0	1	0	1

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos y presentados en este capítulo permitieron evaluar el comportamiento de cultivares de trigo, argentinos y brasileros, frente al WSMV y su vector *A. tosichella* en transmisiones experimentales, clasificándolos en: susceptibles, tolerantes y no infectados (sugiriendo estos últimos una posible resistencia). Se lograron destacar 9 cultivares, 8 brasileros y el cruzamiento KS93WGRC27/ProINTA Super, comportándose como tolerantes o no infectados tanto en condiciones de invernadero como de campo frente a uno de los aislados estudiados (GM-2009). Es importante aclarar que en este estudio se utilizó el criterio descrito en Fahim y col. (2012b) para dicha clasificación (puntuación por arriba de 2 en los valores de Absorbancia relativa). Sin embargo, los conceptos de tolerancia y resistencia generalmente son discutibles y se mencionan varios tipos de significados (Schafer, 1971; Slusarenko *et al.*, 2000; Lehnhoff *et al.*, 2015). Por otro lado, en la mayoría de los estudios similares al presente, la transmisión de WSMV se realiza en forma mecánica, evitando el uso del ácaro vector. En el presente Capítulo, la transmisión de WSMV mediante *A. tosichella* permitió evaluar la interacción de los cultivares no sólo con el virus sino también con el vector, acercándose más a lo que acontece bajo condiciones de campo.

Las diferencias estadísticas encontradas entre el comportamiento de los cultivares frente a los dos aislamientos de WSMV, tanto en invernáculo como a campo, concuerda con lo encontrado en Ito, (2011) y en Lehnhoff y col. (2015). Estos autores encontraron que la susceptibilidad de materiales varía con diferentes aislados de WSMV y sugieren que la evaluación frente a este virus se debe conducir necesariamente con varios aislamientos. Tanto en condiciones de invernáculo como de campo, los cultivares que no fueron infectados o que lo hicieron con bajos valores de absorbancia (resaltados en color verde y amarillo respectivamente en Tabla 6.3 y Tabla 6.4), considerados como tolerantes, corresponden a la inoculación con el aislamiento GM-2009. Sin embargo, esos mismos cultivares resultaron estar infectados con valores altos de absorbancia (resaltados en color rojo en las mismas Tablas) cuando se utilizó el aislamiento MJ-2010. El único material que se comportó diferente fue MACE (posee el gen *Wsm1*), que no se infectó con ninguno de

los dos aislados en condiciones de campo. Estos resultados podrían estar indicando una mayor agresividad del aislamiento viral MJ-2010, o bien una interacción hospedante-vector-virus favorable para la infección. Resulta necesario realizar estudios más minuciosos para confirmar esta suposición.

El cruzamiento KS93WGRC27/ProINTA Super, obtenido por el Grupo de Mejoramiento de Argentina, donde KS93WGRC27 posee el gen *Wsm1* (Gill *et al.*, 1995) y ProINTA Super el gen *Cmc3* (Bainotti *et al.*, 2009), si bien resultó ser tolerante con el aislamiento GM-2009, tanto en condiciones de invernáculo como de campo, resultó susceptible con MJ-2010 en ambas condiciones. Sin embargo, a campo mostró ubicarse entre los de menor valor de absorbancia con el aislamiento más agresivo. Lo contrario fue observado en invernáculo, donde este cruzamiento se encontró entre los de mayor valor de absorbancia con el aislado MJ-2010 (Fig. 6.2). Estos resultados manifiestan como las condiciones ambientales pueden afectar ampliamente la interacción virus-hospedante-vector favoreciendo o no la infección viral. Asimismo, los tres cruzamientos, KS93WGRC27/Baguette 20, KS93WGRC27/Baguette 21 y KS93WGRC27/Baguette Premium 11, evaluados solamente en condiciones de campo, mostraron el mismo comportamiento que el primer cruzamiento descrito, encontrándose entre los de menor acumulación viral (Fig. 6.3).

El gen *Wsm1* tiene la característica de ser termo-sensible, el cual pierde su efectividad a temperaturas constantes superiores a 27°C (Seifers *et al.*, 1995). Considerando que en condiciones de invernáculo la temperatura fue controlada, *Wsm1* podría haber conservado su efectividad. En condiciones de campo, los registros de las temperaturas media mensuales de la EEA Marcos Juárez durante los meses de junio y noviembre muestran un máximo de 22°C y de 21°C correspondientes a 2011 y 2012 respectivamente (Donaire *et al.*, 2012; Bainotti *et al.*, 2013b). Por lo tanto, del mismo modo que en invernáculo, este gen pudo haber conservado parte de su estabilidad. La efectividad de *Wsm1* había sido descrita y evaluada solamente con aislados de WSMV provenientes de EEUU (Friebe *et al.*, 1991; Gill *et al.*, 1995; Seifers *et al.*, 1995; Graybosch *et al.*, 2009). Estos resultados muestran la complejidad de mantener la

efectividad de estos genes de resistencia descritos para WSMV frente a diferentes aislados del virus, en este caso aislados argentinos, sumando la interacción con el ácaro vector y en diferentes condiciones ambientales.

Respecto al gen *Cmc3*, éste no fue efectivo frente a las poblaciones argentinas del ácaro *A. tosichella*, ya que se logró la transmisión del virus en ambas condiciones, mostrado en la infección del cruzamiento KS93WGRC27/ProINTA Super. Estos resultados concuerdan con las características descritas para los genes de resistencia al ácaro, ya que en este estudio se utilizaron dos poblaciones de *A. tosichella* identificadas ambas como linaje WCM2 (o Type 2), descrito en el Capítulo 5 de esta Tesis. Se ha demostrado que los genes *Cmc3*, *Cmc2* y *Cmc4* exhibieron resistencia al linaje WCM1 de *A. tosichella*, aunque susceptibilidad al linaje WCM2 (Harvey *et al.*, 1999; Chuang *et al.*, 2017). En relación al comportamiento de los cultivares frente a los ácaros vectores infectados con WSMV, los resultados mostraron una interacción más favorable entre los cultivares y el complejo WSMV-*A. tosichella* MJ-2010 que GM-2009, al presentar mayores porcentajes de plantas infectadas para todos los materiales evaluados.

Por otra parte, CO9602930-2, el cual posee el gene *Wsm2* (Lu *et al.*, 2011), si bien resultó estar infectado, se encontró dentro de los materiales con menores valores de absorbancia en invernáculo con los dos aislamientos. Del mismo modo, en condiciones de campo se encontró entre los de menor absorbancia con MJ-2010, y no resultó infectado con GM-2009. Estos resultados muestran, del mismo modo que *Wsm1*, una efectividad parcial del gen *Wsm2* frente a aislados argentinos de WSMV. Respecto a *Wsm2*, el mismo fue encontrado particularmente en la línea CO9602930-2 en el brazo corto del cromosoma 3B (Lu *et al.*, 2011), aunque el origen exacto de la resistencia es incierto debido a la susceptibilidad frente a WSMV encontrada en ambos padres (Haley *et al.*, 2002; Seifers *et al.*, 2006).

Por otro lado, el supuesto de investigadores brasileños y argentinos que se plantearon esclarecer respecto al factor hospedero como responsable de la no ocurrencia de epidemias en Brasil, a pesar de haber sido ya detectada la virosis, resulta objetado ya que

si bien algunos materiales fueron no infectados o tolerantes con el aislamiento GM-2009, resultaron todos susceptibles con MJ-2010 en ambas condiciones. Es decir que los cultivares brasileros son capaces de estar infectados con altos valores de concentración viral y no serían los responsables de la no ocurrencia de epidemias en ese país. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por el grupo de investigadores brasileros. Éstos mostraron que los mismos materiales evaluados en ambos países, transmitidos allá en forma mecánica, resultaron todos susceptibles a un aislado brasilerero de WSMV (Lau *et al.*, 2013). Es decir, que los cultivares brasileros resultaron susceptibles tanto al virus como al vector, tal como lo obtenido por ambos grupos de investigación.

Estos resultados concuerdan también con Ito, (2011), dónde los datos que obtuvieron no apoyaron sus suposiciones de que los estados de EEUU con alta frecuencia de epidemias de WSMV tenían variedades de trigo más susceptibles que los estados de baja frecuencia. Los mismos investigadores sostienen que la diferencia en la frecuencia de epidemias de WSMV en esos lugares de EEUU puede estar influenciada principalmente por las prácticas culturales, incluyendo la producción continua de trigo, donde es alta en los lugares con alta frecuencia de enfermedad. Se conoce que la producción continua de trigo favorece la supervivencia tanto del virus y como del vector (Thomas y Hein 2003; Jiang *et al.*, 2005). Otros factores que contribuyen a la frecuencia de epidemias son la virulencia de WSMV, así como también la capacidad de linajes del vector *A. tosichella* para transmitir WSMV. Como se mencionó en el Capítulo 2 de esta Tesis, Mar y col. (2013) encontraron que todos los aislados brasileros, del mismo modo que los argentinos, están estrechamente relacionados molecularmente entre sí, y que se agruparon en el Clado D, junto con los aislados de APNW, Australia, y Argentina. Es decir, los aislados brasileros no mostraron marcada diferencia con los aislados de los tres países con epidemias de WSMV. Asimismo, como se mencionó en el Capítulo 5 de esta Tesis, en Brasil están presentes los mismos dos linajes del vector, *A. tosichella*, encontrados en Argentina, Australia y EEUU, dónde uno de ellos es altamente eficiente en la transmisión de WSMV (WCM2 o Type 2). Es decir que, en Brasil, estarían dadas las condiciones, respecto al virus, al vector y a los hospedantes, como para que puedan ocurrir epidemias por WSMV. Las condiciones ambientales, y posiblemente las prácticas culturales, estarían

influyendo la no ocurrencia de epidemias provocadas por esta virosis en ese país. Estos resultados muestran un alto potencial de daño para Brasil si acontecen las condiciones epidemiológicas favorables para la enfermedad.

Respecto a la observación de síntomas y registro del grado de severidad, la correlación positiva alta entre Absorbancia relativa y grado de severidad en condiciones de invernáculo se diferenció de la correlación moderada encontrada con GM-2009 y la no correlación con MJ-2010, ambos a campo. Estos resultados concuerdan parcialmente con lo encontrado por Lau y col. (2013), quienes no encontraron relación significativa entre severidad de síntomas y valores de absorbancia de WSMV; así como también con Ito, (2011) quienes no observaron correlación entre severidad de síntomas, incidencia viral y pérdidas de rendimiento respecto a este virus. La baja correlación entre dichas variables manifiesta dificultad en una categorización de materiales mediante evaluación de sintomatología para WSMV. Los resultados muestran que la medición de la concentración viral mediante métodos serológicos continúa siendo una herramienta de importancia en los programas de mejoramiento para la búsqueda de resistencia o tolerancia a WSMV, tal como se propuso en un principio (Seifers y Martin 1988) y como actualmente se la utiliza (Fahim *et al.*, 2012a; 2012b; Rupp *et al.*, 2014; Chuang *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

Los cultivares evaluados presentaron diferentes niveles de tolerancia dependiendo de la virulencia del aislamiento de WSMV transmitido por *A. tosichella*-WCM2 tanto en invernáculo como a campo. Se lograron destacar 9 cultivares (8 brasileños y el cruzamiento KS93WGRC27/ProINTA Super), tolerantes o resistentes en condiciones de invernadero y campo frente al aislamiento menos virulento, GM-2009. Los cultivares de trigo en Brasil se infectan y no son los responsables de la ausencia de epidemias del WSMV en ese país.

BIBLIOGRAFÍA

- Bainotti C., Formica B., Helguera M., Vanzetti L., Fraschina J., Salines J., Alberione E., Gómez D., Donaire G., Pontaroli A.C., Alemandri V. y Truol G. 2013a. Mejoramiento de trigo para resistencia al *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) y High plains virus (HPV). Desarrollo y evaluación de germoplasma argentino y brasileño en infecciones naturales y artificiales. En: Workshop: Cooperação Internacional Embrapa/INTA. 17 e 18 de setembro de 2013, Passo Fundo, Brasil. Livro de Resumos. p.11-14.
- Bainotti C., Fraschina J., Salines J., Alberione E., Donaire G., Gómez D., Conde B., Masiero B., Cuniberti M., y Mir L. 2013b. Evaluación de cultivares de trigo en la EEA Marcos Juárez. Actualización Campaña 2013/14. Publicado en Internet, disponible en <http://inta.gob.ar/documentos/evaluacion-de-cultivares-de-trigo-en-la-eea-marcos-juarez.-actualizacion-campana-2013-14>. Activo Diciembre 2016.
- Bainotti C., Helguera M., Vanzetti L., Bariffi J.H., Fraschina J., Salines J., Alberione E., Gómez D., Donaire G. y Formica B. 2009. Mejoramiento de trigo para resistencia al virus del mosaico estriado del trigo (WSMV) en Argentina. En: Truol, G (Ed.) Enfermedades virales asociadas al cultivo de trigo en Argentina: reconocimiento, importancia, formas de transmisión y manejo. INTA, Córdoba, pp. 71-75.
- Chuang W.P, Aguirre Rojas L.M., Khalaf L.K., Zhang G., Fritz A.K., Whitfield A.E. and Smith C.M. 2017. Wheat Genotypes With Combined Resistance to Wheat Curl Mite, *Wheat Streak Mosaic Virus*, *Wheat Mosaic Virus*, and *Triticum Mosaic Virus*. J. Econ. Entomol. doi: 10.1093/jee/tow255.
- Coutts B.A., Banovic M., Kehoe M.A., Severtson D.L. and Jones R.C. 2014. Epidemiology of *Wheat streak mosaic virus* in wheat in a Mediterranean-type environment. Eur. J. Plant Pathol. 140: 797-813.
- Donaire G., Bainotti C., Masiero B., Gutiérrez C., Conde B., Salines J., Chiacchera S., Bertram N., Amigone M., Fraschina J., Gómez D. y Alberione E. 2012. Evaluación de cultivares de trigo para doble propósito en la EEA Marcos Juárez. Publicado en Internet, disponible en http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_trigo_doble_proposito_2012.pdf. Activo Diciembre 2016.
- Fahim M., Ayala-Navarrete L., Millar A.A. and Larkin P.J. 2010. Hairpin RNA derived from viral NIa gene confers immunity to *wheat streak mosaic virus* infection in transgenic wheat plants. Plant Biotechnol. J1.8: 821-834.
- Fahim M., Larkin P., Haber S., Shorter S., Lonegran P. and Rosewarne G. 2012b. Effectiveness of three potential sources of resistance in wheat against *Wheat streak mosaic virus* under field conditions. Australas. Plant Pathol. 41: 301-309.
- Fahim M., Millar A.A., Wood C.C. and Larkin P.J. 2012a. Resistance to *Wheat streak mosaic virus* generated by expression of an artificial polycistronic microRNA in wheat. Plant Biotechnol. J2: 50–163.

- Friebe B., Liu W., Qi L.L., Wilson D.L., Raupp W.J., Poland J., Bowden R.L., Fritz A.K., Seifers D.L. and Gill B.S. 2011. Notice of release of KS12WGGRC59 *wheat streak mosaic virus*- and *Triticum mosaic virus*- resistance wheat germplasm. *Ann. Wheat Newsletter* 57: 280.
- Friebe B., Mukai Y., Dhaliwal H.S., Martin T.J. and Gill B.S. 1991. Identification of alien chromatin specifying resistance to wheat streak mosaic and greenbug in wheat germoplasm by C-banding and in situ hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 81(3): 381-389.
- Gill B.S., Friebe B., Wilson D.L. and Cox T.S. 1995. Registration of KS93WGRC27 *wheat streak mosaic virus* resistant T4DL4Ai#2S wheat germplasm. *Crop Sci.* 35: 1236-1237.
- Graybosch R.A., Peterson C.J., Baenziger P.S., Baltensperger D.D., Nelson L.A., Jin Y., Kolmer J., Seabourn B., French R., Hein G., Martin T.J., Beecher B.S. T. and Heslop-Harrison P. 2009. Registration of ‘Mace’ hard red winter wheat. *J. Plant Regist.* 3: 51-56.
- Haley S.D., Martin T.J., Quick J.S., Seifers D.L., Stromberger J.A., Clayshulte S.R., Clifford B.L., Peairs F.B., Rudolph J.B., Johnson J.J., Gill B.S. and Friebe B. 2002. Registration of CO960293-2 wheat germplasm resistant to *Wheat streak mosaic virus* and Russian wheat aphid. *Crop Sci.* 42: 1381–1382.
- Harvey T.L., Seifers D.L., and Martin T.J. 1998. Effect of imidacloprid seed treatment on infestations of wheat curl mite (Acari: Eriophyidae) and the incidence of *Wheat streak mosaic virus*. *J. Agri. Entomol.* 15: 75– 81.
- Harvey T.L., Seifers D.L., Martin T.J., Brown-Guedira G. and Gill B.S. 1999. Survival of wheat curl mites on different sources of resistant wheat. *Crop Sci.* 39: 1887-1889.
- Hein G.L. 2010. Wheat curl mite. En: W.W. Bockus R.L. Bowden R.L. Hunger W.L. Morrill T.D. Murray and R.W. Smiley (eds.), *Compendium of Wheat Diseases and Pests*, 3rd ed. APS Press, St. Paul, MN. pp. 132–133.
- Ito D. 2011. Evaluation of susceptibility to *Wheat streak mosaic virus* among small grains and alternative hosts in the Great Plains. Master of Science. Montana State University. Bozeman, Montana. 109 pp.
- Jiang W., K.A. Garrett D.E. Peterson T.L. Harvey R.L. Bowden and Fang L. 2005. The window of risk for emigration of *Wheat streak mosaic virus* varies with host eradication method. *Plant Dis.* 89: 853-858.
- Langham M.A.C. 2009. Evaluation of Winter Wheat for Resistance to Viral Diseases. Publicado en Internet, disponible en <http://www.sdwheat2.org/files/Evaluation-WheatResistanceViralDiseases.pdf>: Activo Enero 2012.
- Lau D. and Valle da Silva Pereira P.R. 2013. Reação de cultivares brasileiras de trigo ao *Wheat streak mosaic virus*. En: *Workshop: Cooperação Internacional Embrapa/INTA*. 17 e 18 de setembro de 2013, Passo Fundo, Brasil. Livro de Resumos. p. 55-59.
- Li Z., Liu Y. and Berger P.H. 2005. Transgenic silencing in wheat transformed with the WSMV-CP gene. *Biotechnology* 4: 62-68.

- Lu H.J., Price J., Devkota R., Rush C. and Rudd J. 2011. A dominant gene for resistance to *wheat streak mosaic virus* in winter wheat line CO960293-2. *Crop Sci.* 51: 5-12.
- Malik R., Brown-Guedira G.L., Smith C.M., Harvey T.L. and Gill B.S. 2003. Genetic Mapping of Wheat Curl Mite Resistance Genes and in Common Wheat. *Crop Sci.* 43(2): 644-650.
- McMullen M. and Waldstein D. 2010. Wheat streak mosaic. Plant Disease Management, NDSU Extension Service. PP-646. Publicado en Internet, disponible en <https://www.ag.ndsu.edu/pubs/plantsci/smgrains/pp646.pdf>. Activo Noviembre 2016.
- Orlob G.B. 1966. Feeding and transmission characteristics of *Aceria tulipae* Keifer as vector of *wheat streak mosaic virus*. *Phytopathology* 55: 218-238.
- Rupp J.L.S., Cruz L.F., Trick H.N. and Fellers J.P. 2014. Stable resistance to *wheat streak mosaic virus* in wheat mediated by RNAi. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 50(6): 665-672.
- Schafer J.F. 1971. Tolerance to Plant Disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 9: 235-252.
- Seifers D.L. and Martin T.J. 1988. Correlation of low level of *Wheat streak mosaic virus* resistance in Triumph 64 wheat with low virus titer. *Phytopathology* 78:703-707.
- Seifers D.L., Martin T.J. and Haber S. 2013. Temperature-sensitive resistance to *Wheat streak mosaic virus* in CO960333 and KS06HW79wheat. *Plant Dis.* 97: 983-987.
- Seifers D.L., Martin T.J., Harvey T.L. and Haber S. 2007. Temperature-sensitive *Wheat streak mosaic virus* resistance identified in KS03HW12 wheat. *Plant Dis.* 91: 1029-10330.
- Seifers D.L., Martin T.J., Harvey T.L., Haber S. and Haley S.D. 2006. Temperature sensitivity and efficacy of *Wheat streak mosaic virus* resistance derived from CO960293 wheat. *Plant Dis.* 90: 623-628.
- Seifers D.L., Martin T.J., Harvey T.L. and Gill B.S. 1995. Temperature sensitivity and efficacy of *wheat streak mosaic virus* resistance derived from Agropyron intermedium. *Plant Dis.* 94: 766-700.
- Sharp G.L., Martin J.M., Lanning S.P., Blake N.K., Brey C.W., Sivamani E., Qu R. and Talbert L.E. 2002. Field evaluation of transgenic and classical sources of *Wheat streak mosaic virus* resistance. *Crop Sci.* 42: 105-110.
- Sivamani E., Brey C.W., Talbert L.E., Young M.A., Dyer W.E., Kaniewski W.K. and Qu R. 2002. Resistance to *Wheat streak mosaic virus* in transgenic wheat engineered with the viral coat protein gene. *Transgenic Res.* 11: 31-41.
- Sivamani E., Brey C.W., Dyer W.E., Talbert L.E. and Qu R. 2000. Resistance to *Wheat streak mosaic virus* in transgenic wheat expressing the viral replicase (N1b) gene. *Mol. Breed.* 6: 469-477.
- Slusarenko A.J., Fraser R.S.S. and Van Loon L.C. 2000. Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. Eds., Dordrecht: Kluwer.
- Stenger D.C., Hein G.L., Gildow F.E., Horken K.M. and French R. 2005. Plant virus HC-Pro is a determinant of eriophyid mite transmission. *J. Virol.* 79: 9054-61.

- Thomas J.A. and Hein G.L. 2003. Influence of volunteer wheat plant condition on movement of the wheat curl mite, *Aceria tosichella*, in winter wheat. *Exp. Appl. Acarol.* 31: 253-268.
- Thomas J.A., Lyon D.J. and Hein G.L. 2004. Spread of wheat curl mite and *Wheat streak mosaic virus* is influenced by volunteer wheat control methods. *Plant Health Progress*. doi.org/10.1094/PHP-2004-1206-01-RS.
- Thomas J.B. and Conner R.L. 1986. Resistance to colonization by the wheat curl mite in *Aegilops squarrosa* and its inheritance after transfer to common wheat. *Crop Sci.* 26(3): 527-530.
- Wegulo S.N., Hein G.L., Klein R.N. and French R.C. 2008. Managing Wheat streak mosaic. University of Nebraska, Extension. EC1871. Publicado en Internet, disponible en <http://extensionpublications.unl.edu/assets/pdf/ec1871.pdf>. Activo Noviembre 2016.
- Whelan E.D.P. and Hart G.E. 1988. A spontaneous translocation that transfers wheat curl mite resistance from decaploid *Agropyron elongatum* to common wheat. *Genome* 30(3): 289-292.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos permitieron establecer las relaciones filogenéticas entre las secuencias nucleotídicas del gen que codifica para la cápside proteica de los 13 aislados argentinos de WSMV estudiados, provenientes de diferentes hospedantes y regiones geográficas de Argentina conjuntamente con la totalidad de secuencias de aislados de otros países descriptas a nivel mundial. Las estrechas relaciones filogenéticas encontradas entre los aislados argentinos de WSMV, los australianos y los de la región del Pacífico noroeste de Estados Unidos (APNW) sugieren que la presencia del WSMV en nuestro país se podría haber originado a partir de una única introducción desde la región del APNW. Estos resultados avalan la hipótesis de que tanto en Argentina como en Australia la introducción del WSMV proviene del APNW.

Con el objetivo de caracterizar la diversidad intra-hospedante del WSMV de poblaciones naturales correspondientes a diferentes hospedantes (*Trigo*, *A. fatua*, *D. sanguinalis*) y regiones trigueras en Argentina se desarrolló una metodología para la amplificación del genoma completo y su posterior pirosecuenciación. Se logró la reconstrucción de haplotipos y la búsqueda de Polimorfismos de simple nucleótido (SNP, Single Nucleotide Polymorphisms) de las secuencias de los genomas completos de los 13 aislamientos en estudio. El establecer protocolos de análisis de las secuencias obtenidas fue un desafío debido al número de programas y herramientas que hay disponibles actualmente para cada paso. La falta de coincidencia en los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de reconstrucción de haplotipos demuestra la complejidad de establecer protocolos de análisis adecuados para cada tipo de datos y objetivos. Tres aislamientos de WSMV provenientes de trigo y de diferentes subregiones trigueras se distinguieron por su mayor diversidad y distribución de mutaciones sinónimas y no sinónimas a lo largo de su genoma. Sin embargo, diez presentaron baja diversidad intra-hospedante. Asimismo, se logró identificar regiones del genoma de WSMV que serían blancos adecuados para

desarrollar plantas transgénicas resistentes, así como también sitios interesantes por sus frecuencias de mutaciones no-sinónimas para estudios de interacción WSMV-*A. tosichella*-trigo.

Se detectó por primera vez la presencia de un nuevo virus en trigo, *Triticum mosaic virus* (TriMV). Por lo tanto, la enfermedad del mosaico estriado en Argentina está compuesta por el complejo viral WSMV-HPWMOV-TriMV transmitido por el ácaro eriófido *A. tosichella*.

Se determinaron las especies de ácaros eriófidios provenientes de trigo, cereales y malezas alledañas. Se logró la amplificación de las regiones ITS y 16S para 9 de las 10 colonias de *A. tosichella* establecidas a partir de los 13 aislamientos de WSMV en estudio. Los resultados demuestran que el linaje WCM2 de *A. tosichella* es el prevalente en todas las regiones. Este linaje posee características más invasivas y asociado a mayores transmisiones del WSMV descrito a nivel mundial. En la zona de Mar y Sierra, los cereales y malezas alledañas evaluados no son hospedantes alternativos de *A. tosichella*. No obstante, resultó interesante el hallazgo de la variedad de especies pertenecientes a la familia Eriophyidae que se identificaron morfológicamente, y algunas molecularmente, en diferentes gramíneas en la provincia de Buenos Aires. Se describió taxonómicamente la especie *Aculodes stipacolus* proveniente de *Stipa* sp. en cercanía de lotes infectados con WSMV, constituyendo la primera especie de ese género que se describe en América del Sur. También, resultó importante la identificación de *Abacarus hystrix* en *Festuca*, el cual transmite *Agropyron mosaic virus* y *Ryegrass mosaic virus*, representando una advertencia sobre la posible introducción de estos virus a trigo y otros cereales de grano fino.

La evaluación del comportamiento de cultivares de trigos, argentinos y brasileros, se realizó con dos aislamientos del WSMV de diferente virulencia en transmisiones experimentales con el ácaro vector. Los cultivares presentan diferentes niveles de tolerancia dependiendo de la virulencia del aislamiento de WSMV transmitido por *A. tosichella*-WCM2 tanto en invernáculo como a campo. Todos los cultivares resultaron susceptibles cuando se evaluaron con el aislamiento más virulento de WSMV. Mientras

que las evaluaciones con el aislamiento menos virulento permitieron destacar 8 cultivares y el cruzamiento KS93WGRC27/ProINTA Super con buen comportamiento frente al complejo. En condiciones de campo, el cultivar MACE portador del gen *Wsm1* se comportó como resistente, es decir no se infectó con ninguno de los dos aislamientos de WSMV argentinos inoculados. Sin embargo, el KS93WGRC27/ProINTA Super, portador de los genes *Wsm1* y *Cmc3*, se comportó como tolerante con el aislamiento menos virulento y como susceptible con el más virulento. También, se confirmó que los cultivares brasileros evaluados fueron susceptibles al WSMV por lo que no son los responsables de la no ocurrencia de epidemias en ese país, tal como se sospechaba. Los resultados no mostraron una relación significativa entre severidad de síntomas y concentración relativa de WSMV para todos los casos por lo que la utilización de solo la severidad de síntomas para la evaluación del comportamiento no es adecuada.

En síntesis, algunos de los resultados obtenidos en esta Tesis simplifican, mientras que otros complejizan el manejo del patosistema del WSMV en trigo. Por una parte, el haber encontrado que todos los aislados argentinos del virus están estrechamente relacionados entre sí, y que no hay hasta el momento indicios de recombinación, y que su diversidad intra-poblacional en general fue baja es alentador para el manejo. También, resulta beneficioso que todas las poblaciones de *A. tosichella* pertenezcan a la misma especie críptica WCM2. Sin embargo, la especie WCM2 es la más invasivas y asociado a mayores transmisiones del WSMV descrito a nivel mundial. La identificación de diferentes especies de ácaros eriófidos presentes en las gramíneas alledañas y la ausencia de *A. tosichella* aporta otro dato al manejo. La variedad de especies desconocidas de Eriophyidae detectadas representa una incógnita acerca de su efecto en el patosistema en estudio. La identificación del TriMV, que completa el complejo viral junto a HPWMoV y WSMV, y la detección de *A. hystrix*, vector de virosis que infectan trigo (*Agropyron mosaic virus* y *Ryegrass mosaic virus*), complejizan las estrategias de manejo al aumentar el número de componentes del patosistema. La identificación de cultivares de trigo con tolerancia a nuestros complejos de WSMV-*A. tosichella*, estimulan la selección de materiales con buen comportamiento como principal medida de control de la enfermedad.

Futuras líneas de investigación

Los resultados obtenidos en esta Tesis estimulan a continuar con investigaciones referidas a características del o los agentes virales, de especies de eriófidos vectores o no de patógenos, de los hospedantes, el ambiente, así como también las múltiples interacciones ocurridas entre los mismos. Resultan como futuras líneas de investigación, la identificación de factores que favorecen la generación de variabilidad del WSMV, otorgándole capacidad de adaptación a cambios ambientales, a nuevos hospedantes y de evadir los mecanismos de defensa de la planta; la caracterización molecular y biológica de TriMV, incluyendo su transmisión por semilla y su incorporación en los planes de mejoramiento; la identificación morfológica y molecular de las dos especies de *Aceria* y la de *Abacarus* encontradas, la identificación de gramíneas que actúen como puentes verdes del complejo WSMV-*A. tosichella*, como también continuar con la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia o tolerancia, para conseguirlas más duraderas frente a este patosistema

ANEXO I

Tabla 1. Cambios a nivel de nucleótido, aminoácido, codón, su posición en el genoma, efecto en la proteína, la cobertura y la frecuencia para cada SNP detectado en todo el genoma para los 13 aislamientos de WSMV estudiados.

Aislado	Nombre Proteína	Cambio aa	Posición genoma	Cambio nt	Cambio codón	Cober tura	Tipo de polimorfismo	Efecto en la proteína	Frecu encia
WSMV01	P1		264	T -> C	TGT -> TGC	764	SNP (transition)	Sinónimo	8,6
WSMV01	P1	I -> L	493	A -> C	ATC -> CTC	551	SNP (transversion)	No-sinónimo	8
WSMV01	P1		525	A -> G	GAA -> GAG	500	SNP (transition)	Sinónimo	8
WSMV01	HC-Pro		1074	C -> T	AAC -> AAT	315	SNP (transition)	Sinónimo	5,4
WSMV01	HC-Pro		1110	T -> C	AAT -> AAC	359	SNP (transition)	Sinónimo	6,1
WSMV01	HC-Pro		1186	C -> T	CTG -> TTG	398	SNP (transition)	Sinónimo	7,5
WSMV01	HC-Pro	M -> T	1406	T -> C	ATG -> ACG	433	SNP (transition)	No-sinónimo	2,5
WSMV01	HC-Pro		1440	T -> C	ATT -> ATC	434	SNP (transition)	Sinónimo	6,5
WSMV01	HC-Pro		1599	A -> G	AAA -> AAG	342	SNP (transition)	Sinónimo	3,8
WSMV01	HC-Pro		1971	C -> T	GGC -> GGT	436	SNP (transition)	Sinónimo	5,3
WSMV01	HC-Pro		2004	A -> G	CAA -> CAG	470	SNP (transition)	Sinónimo	6,6
WSMV01	P3		2475	G -> A	CAG -> CAA	497	SNP (transition)	Sinónimo	6,6
WSMV01	Cl		3354	A -> G	GGA -> GGG	475	SNP (transition)	Sinónimo	8
WSMV01	Cl	T -> A	3394	A -> G	ACA -> GCA	484	SNP (transition)	No-sinónimo	7,4
WSMV01	Cl		3912	A -> G	GAA -> GAG	421	SNP (transition)	Sinónimo	6,2
WSMV01	Cl		4209	C -> T	AGC -> AGT	521	SNP (transition)	Sinónimo	6,5
WSMV01	Cl		4605	C -> T	CTC -> CTT	507	SNP (transition)	Sinónimo	6,5
WSMV01	Cl		4944	C -> T	AGC -> AGT	560	SNP (transition)	Sinónimo	6,6
WSMV01	N1a		5697	G -> T	GTG -> GTT	488	SNP (transversion)	Sinónimo	4,1
WSMV01	N1a		5919	C -> T	CTC -> CTT	527	SNP (transition)	Sinónimo	4,4
WSMV01	N1a	L -> P	6161	T -> C	CTA -> CCA	456	SNP (transition)	No-sinónimo	5,9
WSMV01	N1b		7188	T -> C	TTT -> TTC	421	SNP (transition)	Sinónimo	4,8
WSMV01	N1b		7281	C -> T	CAC ->	447	SNP	Sinónimo	5,6

WSMV01	Nlb		7786	T -> C	CAT TTG -> CTG	451	(transition) SNP	Sinónimo	6,9
WSMV01	Nlb		8001	T -> C	ACT -> ACC	513	(transition) SNP	Sinónimo	6,2
WSMV01	CP	A -> T	8068	G -> A	GCC -> ACC	534	(transition) SNP	No- sinónimo	5,8
WSMV01	CP	G -> S	8209	G -> A	GGT -> AGT	499	(transition) SNP	No- sinónimo	6,4
WSMV01	CP		8295	T -> C	GGT -> GGC	509	(transition) SNP	Sinónimo	5,7
WSMV02	P1		129	T -> C	GAT -> GAC	1090	(transition) SNP	Sinónimo	28,3
WSMV02	P1		237	T -> C	CTT -> CTC	1200	(transition) SNP	Sinónimo	28,3
WSMV02	P1		381	G -> A	AAG -> AAA	1130	(transition) SNP	Sinónimo	27,4
WSMV02	P1		423	C -> T	GTC -> GTT	1350	(transition) SNP	Sinónimo	8,9
WSMV02	P1		462	G -> A	AGG -> AGA	1200	(transition) SNP	Sinónimo	30,2
WSMV02	P1		474	C -> T	TGC -> TGT	1390	(transition) SNP	Sinónimo	19,4
WSMV02	P1	A -> T	484	G -> A	GCT -> ACT	1380	(transition) SNP	No- sinónimo	32
WSMV02	P1		507	C -> T	AAC -> AAT	1280	(transition) SNP	Sinónimo	19,8
WSMV02	P1		528	C -> T	TTC -> TTT	1200	(transition) SNP	Sinónimo	35,4
WSMV02	P1	D -> G	542	A -> G	GAT -> GGT	1202	(transition) SNP	No- sinónimo	30,1
WSMV02	P1		591	A -> G	CAA -> CAG	1400	(transition) SNP	Sinónimo	31,2
WSMV02	P1		612	T -> G	CCT -> CCG	1150	(transversion) SNP	Sinónimo	20,1
WSMV02	P1		636	A -> G	GAA -> GAG	1060	(transition) SNP	Sinónimo	58,8
WSMV02	P1		660	T -> C	AAT -> AAC	1020	(transition) SNP	Sinónimo	20
WSMV02	P1		672	G -> A	GCG -> GCA	979	(transition) SNP	Sinónimo	29,8
WSMV02	P1		699	A -> G	ACA -> ACG	1170	(transition) SNP	Sinónimo	19,7
WSMV02	P1		705	C -> T	TCC -> TCT	940	(transition) SNP	Sinónimo	29,6
WSMV02	P1		789	T -> C	TAT -> TAC	1100	(transition) SNP	Sinónimo	16,2
WSMV02	P1		804	G -> A	GAG -> GAA	1170	(transition) SNP	Sinónimo	19,8
WSMV02	P1	V -> I	817	G -> A	GTA -> ATA	920	(transition) SNP	No- sinónimo	31,3
WSMV02	P1		888	C -> T	ATC -> ATT	1920	(transition) SNP	Sinónimo	20,4
WSMV02	P1		942	T -> A	CCT -> CCA	792	(transversion) SNP	Sinónimo	10,2

WSMV02	HC-Pro		1095	C -> T	CAC -> CAT	873	SNP (transition)	Sinónimo	30,1
WSMV02	HC-Pro		1185	T -> C	AAT -> AAC	990	SNP (transition)	Sinónimo	12,4
WSMV02	HC-Pro		1404	A -> G	ACA -> ACG	957	SNP (transition)	Sinónimo	2,3
WSMV02	HC-Pro	M -> T	1406	T -> C	ATG -> ACG	953	SNP (transition)	No- sinónimo	2,3
WSMV02	HC-Pro	N -> H	1411	A -> C	AAC -> CAC	937	SNP (transversion)	No- sinónimo	2,2
WSMV02	HC-Pro		1437	C -> T	ATC -> ATT	960	SNP (transition)	Sinónimo	28,2
WSMV02	HC-Pro	M -> V	1516	A -> G	ATG -> GTG	974	SNP (transition)	No- sinónimo	38,2
WSMV02	HC-Pro	K -> R	1598	A -> G	AAA -> AGA	858	SNP (transition)	No- sinónimo	32,5
WSMV02	HC-Pro		1614	T -> C	ATT -> ATC	900	SNP (transition)	Sinónimo	38,3
WSMV02	HC-Pro		1848	C -> T	TTC -> TTT	1000	SNP (transition)	Sinónimo	29,4
WSMV02	P3		2214	C -> T	TTC -> TTT	1120	SNP (transition)	Sinónimo	59,3
WSMV02	P3		2268	A -> G	GTA -> GTG	1090	SNP (transition)	Sinónimo	58,7
WSMV02	P3	E -> D	3027	A -> C	GAA -> GAC	1010	SNP (transversion)	No- sinónimo	28,8
WSMV02	6K1		3054	G -> A	GAG -> GAA	1050	SNP (transition)	Sinónimo	10,3
WSMV02	6K1		3084	A -> C	GTA -> GTC	1070	SNP (transversion)	Sinónimo	29,6
WSMV02	6K1		3138	G -> A	TCG -> TCA	1070	SNP (transition)	Sinónimo	28,4
WSMV02	6K1		3183	T -> C	AAT -> AAC	1120	SNP (transition)	Sinónimo	11,1
WSMV02	Cl		3309	A -> G	ACA -> ACG	1290	SNP (transition)	Sinónimo	19,4
WSMV02	Cl		3555	C -> T	GTC -> GTT	1150	SNP (transition)	Sinónimo	8,1
WSMV02	Cl		3636	A -> G	GCA -> GCG	1110	SNP (transition)	Sinónimo	27,2
WSMV02	Cl		3696	T -> C	CAT -> CAC	1070	SNP (transition)	Sinónimo	12
WSMV02	Cl		4056	C -> T	CAC -> CAT	1210	SNP (transition)	Sinónimo	28,8
WSMV02	Cl		4342	T -> C	TTG -> CTG	1310	SNP (transition)	Sinónimo	34,7
WSMV02	Cl		4497	G -> A	GTG -> GTA	1120	SNP (transition)	Sinónimo	32,5
WSMV02	Cl	M -> I	4524	G -> A	ATG -> ATA	1170	SNP (transition)	No- sinónimo	31,1
WSMV02	Cl		4536	A -> G	TTA -> TTG	1170	SNP (transition)	Sinónimo	30,5
WSMV02	Cl		4617	T -> C	CAT -> CAC	1200	SNP (transition)	Sinónimo	30,3
WSMV02	Cl		4638	A -> G	CAA ->	1210	SNP	Sinónimo	31

WSMV02	Cl		4686	A -> G	CAG GTA -> GTG	1200	(transition) SNP	Sinónimo	29,5
WSMV02	Cl		4854	G -> A	TTG -> TTA	1170	(transition) SNP	Sinónimo	39,4
WSMV02	Cl		5121	T -> C	GTT -> GTC	1220	(transition) SNP	Sinónimo	28,4
WSMV02	Nla		5385	G -> A	TTG -> TTA	1130	(transition) SNP	Sinónimo	32,8
WSMV02	Nla		5442	A -> G	AAA -> AAG	1070	(transition) SNP	Sinónimo	33,9
WSMV02	Nla		5601	T -> C	GAT -> GAC	1250	(transition) SNP	Sinónimo	21,8
WSMV02	Nla		5862	A -> G	AAA -> AAG	1340	(transition) SNP	Sinónimo	30,6
WSMV02	Nla		6054	T -> C	CTT -> CTC	1250	(transition) SNP	Sinónimo	28,1
WSMV02	Nla		6147	C -> T	CTC -> CTT	1130	(transition) SNP	Sinónimo	29,9
WSMV02	Nla		6159	A -> G	AGA -> AGG	1140	(transition) SNP	Sinónimo	39,7
WSMV02	Nla	V -> I	6334	G -> A	GTA -> ATA	1130	(transition) SNP	No- sinónimo	9,8
WSMV02	Nla		6357	A -> G	GGA -> GGG	1040	(transition) SNP	Sinónimo	37,3
WSMV02	Nlb		6642	C -> T	GTC -> GTT	1030	(transition) SNP	Sinónimo	34,8
WSMV02	Nlb		6645	T -> C	ATT -> ATC	1030	(transition) SNP	Sinónimo	30,5
WSMV02	Nlb		6681	T -> C	GAT -> GAC	1010	(transition) SNP	Sinónimo	29,5
WSMV02	Nlb		6747	A -> G	ACA -> ACG	1100	(transition) SNP	Sinónimo	29,5
WSMV02	Nlb		7224	T -> C	GTT -> GTC	1070	(transition) SNP	Sinónimo	31,2
WSMV02	Nlb		7248	T -> A	GGT -> GGA	1030	(transversion) SNP	Sinónimo	30,9
WSMV02	Nlb	E -> D	7389	A -> C	GAA -> GAC	982	(transversion) SNP	No- sinónimo	29,9
WSMV02	Nlb		7402	T -> C	TTG -> CTG	952	(transition) SNP	Sinónimo	66,6
WSMV02	Nlb	R -> S	7587	G -> T	AGG -> AGT	916	(transversion) SNP	No- sinónimo	9,5
WSMV02	Nlb		7752	A -> G	ACA -> ACG	1010	(transition) SNP	Sinónimo	33,2
WSMV02	Nlb		7887	C -> T	GGC -> GGT	1090	(transition) SNP	Sinónimo	31,6
WSMV02	Nlb		7902	A -> G	ACA -> ACG	1130	(transition) SNP	Sinónimo	33,6
WSMV02	Nlb		7971	A -> G	CAA -> CAG	1150	(transition) SNP	Sinónimo	30,9
WSMV02	Nlb		8034	T -> C	TGT -> TGC	1160	(transition) SNP	Sinónimo	19,6
WSMV02	CP		8064	T -> C	AGT -> AGC	1190	(transition) SNP	Sinónimo	31,1

WSMV02	CP		8145	T -> C	AGT -> AGC	1250	SNP (transition)	Sinónimo	30,7
WSMV02	CP		8148	G -> A	CTG -> CTA	1240	SNP (transition)	Sinónimo	30,2
WSMV02	CP		8157	T -> C	AGT -> AGC	1250	SNP (transition)	Sinónimo	30,1
WSMV02	CP	T -> S	8221	A -> T	ACT -> TCT	1220	SNP (transversion)	No- sinónimo	30,7
WSMV02	CP		8448	A -> G	GTA -> GTG	931	SNP (transition)	Sinónimo	36,8
WSMV02	CP		8544	C -> A	CTC -> CTA	1100	SNP (transversion)	Sinónimo	19,9
WSMV02	CP	M -> I	8556	G -> A	ATG -> ATA	1120	SNP (transition)	No- sinónimo	29,6
WSMV02	CP		8838	T -> A	CCT -> CCA	1580	SNP (transversion)	Sinónimo	3,7
WSMV02	CP		8922	A -> G	GCA -> GCG	2120	SNP (transition)	Sinónimo	40,2
WSMV02	CP		8928	C -> T	GAC -> GAT	2090	SNP (transition)	Sinónimo	39,9
WSMV03	P1		24	T -> C	CTT -> CTC	573	SNP (transition)	Sinónimo	4,2
WSMV03	P1		135	C -> T	CAC -> CAT	671	SNP (transition)	Sinónimo	4,2
WSMV03	P1		201	T -> C	TAT -> TAC	740	SNP (transition)	Sinónimo	4,2
WSMV03	P1		207	A -> T	GCA -> GCT	775	SNP (transversion)	Sinónimo	4
WSMV03	P1		243	C -> T	AAC -> AAT	768	SNP (transition)	Sinónimo	4,4
WSMV03	P1		297	C -> T	ATC -> ATT	642	SNP (transition)	Sinónimo	5,1
WSMV03	P1		417	G -> A	CAG -> CAA	617	SNP (transition)	Sinónimo	5,3
WSMV03	P1	T -> A	484	A -> G	ACT -> GCT	585	SNP (transition)	No- sinónimo	6,3
WSMV03	P1	G -> D	542	G -> A	GGT -> GAT	481	SNP (transition)	No- sinónimo	5,8
WSMV03	P1	T -> A	580	A -> G	ACG -> GCG	457	SNP (transition)	No- sinónimo	6,3
WSMV03	P1		606	T -> C	CAT -> CAC	437	SNP (transition)	Sinónimo	5,7
WSMV03	P1		720	G -> A	GTG -> GTA	389	SNP (transition)	Sinónimo	5,4
WSMV03	P1		783	C -> A	GGC -> GGA	387	SNP (transversion)	Sinónimo	7
WSMV03	P1		816	C -> T	GAC -> GAT	384	SNP (transition)	Sinónimo	6,5
WSMV03	P1	I -> V	982	A -> G	ATC -> GTC	331	SNP (transition)	No- sinónimo	4,5
WSMV03	HC-Pro		1080	T -> G	GCT -> GCG	368	SNP (transversion)	Sinónimo	3,3
WSMV03	HC-Pro		1095	T -> C	CAT -> CAC	371	SNP (transition)	Sinónimo	3,5
WSMV03	HC-Pro		1194	C -> T	TGC ->	415	SNP	Sinónimo	4,6

WSMV03	HC-Pro		1380	A -> G	TGT TTA -> TTG	423	(transition) SNP	Sinónimo	3,1
WSMV03	HC-Pro	T -> I	1631	C -> T	ACA -> ATA	358	(transition) SNP	No- sinónimo	2,5
WSMV03	HC-Pro		1641	C -> T	AGC -> AGT	389	(transition) SNP	Sinónimo	2,6
WSMV03	HC-Pro		1770	C -> T	ATC -> ATT	390	(transition) SNP	Sinónimo	4,6
WSMV03	HC-Pro		1806	A -> T	GTA -> GTT	373	(transversion) SNP	Sinónimo	4,8
WSMV03	HC-Pro		1878	T -> C	TAT -> TAC	389	(transition) SNP	Sinónimo	5,4
WSMV03	HC-Pro		2079	A -> G	AAA -> AAG	373	(transition) SNP	Sinónimo	4,8
WSMV03	HC-Pro		2172	C -> T	ACC -> ACT	400	(transition) SNP	Sinónimo	3,3
WSMV03	P3	I -> V	2362	A -> G	ATC -> GTC	440	(transition) SNP	No- sinónimo	2,5
WSMV03	P3	Q -> K	2530	C -> A	CAA -> AAA	495	(transversion) SNP	No- sinónimo	4
WSMV03	P3		2568	A -> G	GCA -> GCG	505	(transition) SNP	Sinónimo	4,2
WSMV03	P3		2616	A -> G	CGA -> CGG	430	(transition) SNP	Sinónimo	4,9
WSMV03	P3	I -> L	2971	A -> T	ATA -> TTA	410	(transversion) SNP	No- sinónimo	3,9
WSMV03	Cl		3273	A -> G	GAA -> GAG	451	(transition) SNP	Sinónimo	2,9
WSMV03	Cl		3592	T -> C	TTA -> CTA	441	(transition) SNP	Sinónimo	3,4
WSMV03	Cl		3642	T -> C	AAT -> AAC	427	(transition) SNP	Sinónimo	3
WSMV03	Cl		3702	T -> G	CTT -> CTG	394	(transversion) SNP	Sinónimo	2,8
WSMV03	Cl		3744	C -> T	ACC -> ACT	394	(transition) SNP	Sinónimo	3,3
WSMV03	Cl		3807	C -> T	ATC -> ATT	413	(transition) SNP	Sinónimo	3,6
WSMV03	Cl		3810	A -> G	AAA -> AAG	411	(transition) SNP	Sinónimo	3,9
WSMV03	Cl		3882	A -> G	CCA -> CCG	425	(transition) SNP	Sinónimo	4
WSMV03	Cl		4056	T -> C	CAT -> CAC	474	(transition) SNP	Sinónimo	4,9
WSMV03	Cl		4057	T -> C	TTG -> CTG	473	(transition) SNP	Sinónimo	4,9
WSMV03	Cl		4116	C -> T	TAC -> TAT	468	(transition) SNP	Sinónimo	4,1
WSMV03	Cl	V -> I	4192	G -> A	GTA -> ATA	504	(transition) SNP	No- sinónimo	4
WSMV03	Cl		4389	C -> T	CTC -> CTT	478	(transition) SNP	Sinónimo	2,9
WSMV03	Cl		4686	G -> A	GTG -> GTA	464	(transition) SNP	Sinónimo	5

WSMV03	Cl		4728	G -> A	GAG -> GAA	472	SNP (transition)	Sinónimo	5,9
WSMV03	Cl		4785	A -> G	GTA -> GTG	466	SNP (transition)	Sinónimo	5,8
WSMV03	Cl		4803	A -> G	AGA -> AGG	469	SNP (transition)	Sinónimo	5,8
WSMV03	Cl		4995	T -> C	GAT -> GAC	533	SNP (transition)	Sinónimo	6,4
WSMV03	6K2		5160	T -> C	TTT -> TTC	505	SNP (transition)	Sinónimo	4,4
WSMV03	6K2		5229	T -> C	GGT -> GGC	521	SNP (transition)	Sinónimo	4,6
WSMV03	Nla		5364	C -> T	TAC -> TAT	481	SNP (transition)	Sinónimo	3,3
WSMV03	Nla		5442	A -> G	AAA -> AAG	391	SNP (transition)	Sinónimo	2,6
WSMV03	Nla		5637	A -> G	GAA -> GAG	376	SNP (transition)	Sinónimo	3,2
WSMV03	Nla		5730	C -> T	CGC -> CGT	428	SNP (transition)	Sinónimo	4,7
WSMV03	Nla		5778	G -> C	GGG -> GGC	428	SNP (transversion)	Sinónimo	4,4
WSMV03	Nla		5838	A -> G	GAA -> GAG	428	SNP (transition)	Sinónimo	4,9
WSMV03	Nla		6048	T -> C	TAT -> TAC	537	SNP (transition)	Sinónimo	6,1
WSMV03	Nla		6189	A -> G	TTA -> TTG	533	SNP (transition)	Sinónimo	4,3
WSMV03	Nla		6222	T -> C	GTT -> GTC	514	SNP (transition)	Sinónimo	4,1
WSMV03	Nla		6312	C -> T	GAC -> GAT	464	SNP (transition)	Sinónimo	3,9
WSMV03	Nla		6354	G -> A	GTG -> GTA	433	SNP (transition)	Sinónimo	3
WSMV03	Nlb		6747	A -> G	ACA -> ACG	380	SNP (transition)	Sinónimo	2,9
WSMV03	Nlb		6762	C -> T	TAC -> TAT	367	SNP (transition)	Sinónimo	4,1
WSMV03	Nlb	V -> I	6850	G -> A	GTT -> ATT	362	SNP (transition)	No- sinónimo	3,9
WSMV03	Nlb		7086	A -> G	AGA -> AGG	468	SNP (transition)	Sinónimo	4,9
WSMV03	Nlb		7176	G -> A	GAG -> GAA	442	SNP (transition)	Sinónimo	5
WSMV03	Nlb	Q -> R	7397	A -> G	CAA -> CGA	358	SNP (transition)	No- sinónimo	2,8
WSMV03	Nlb		7402	T -> C	TTG -> CTG	359	SNP (transition)	Sinónimo	3,1
WSMV03	Nlb		7671	C -> T	GAC -> GAT	339	SNP (transition)	Sinónimo	4,7
WSMV03	Nlb	R -> H	7718	G -> A	CGT -> CAT	358	SNP (transition)	No- sinónimo	5,6
WSMV03	Nlb		7764	A -> G	CGA -> CGG	394	SNP (transition)	Sinónimo	4,8
WSMV03	Nlb		7953	T -> C	TTT ->	426	SNP	Sinónimo	4,7

WSMV03	NIb		7992	A -> G	TTC TTA -> TTG	407	(transition) SNP	Sinónimo	3,2
WSMV03	NIb	N -> D	8008	A -> G	AAT -> GAT	410	(transition) SNP	No- sinónimo	4,1
WSMV03	CP	S -> G	8113	A -> G	AGT -> GGT	452	(transition) SNP	No- sinónimo	2,9
WSMV03	CP		8130	A -> C	GGA -> GGC	457	(transversion) SNP	Sinónimo	3,5
WSMV03	CP		8133	C -> T	AGC -> AGT	460	(transition) SNP	Sinónimo	3,3
WSMV03	CP	N -> S	8144	A -> G	AAT -> AGT	460	(transition) SNP	No- sinónimo	3
WSMV03	CP		8148	A -> G	CTA -> CTG	458	(transition) SNP	Sinónimo	3,1
WSMV03	CP		8496	A -> G	CAA -> CAG	418	(transition) SNP	Sinónimo	3,1
WSMV03	CP		8532	A -> C	ACA -> ACC	430	(transversion) SNP	Sinónimo	3
WSMV03	CP		8790	C -> T	GGC -> GGT	666	(transition) SNP	Sinónimo	5,1
WSMV03	CP		8928	T -> C	GAT -> GAC	864	(transition) SNP	Sinónimo	4,6
WSMV04	HC-Pro		1404	A -> G	ACA -> ACG	782	(transition) SNP	Sinónimo	2,8
WSMV04	HC-Pro	M -> T	1406	T -> C	ATG -> ACG	777	(transition) SNP	No- sinónimo	2,7
WSMV04	HC-Pro	N -> H	1411	A -> C	AAC -> CAC	757	(transversion) SNP	No- sinónimo	2,8
WSMV04	P3	M -> L	2635	A -> T	ATG -> TTG	670	(transversion) SNP	No- sinónimo	4,5
WSMV05	P1	Y -> H	949	T -> C	TAT -> CAT	418	(transition) SNP	No- sinónimo	2,2
WSMV05	HC-Pro	V -> A	1157	T -> C	GTA -> GCA	525	(transition) SNP	No- sinónimo	4
WSMV05	HC-Pro		1218	G -> A	AAG -> AAA	576	(transition) SNP	Sinónimo	3
WSMV05	HC-Pro	N -> H	1411	A -> C	AAC -> CAC	542	(transversion) SNP	No- sinónimo	7,4
WSMV05	6K1	Y -> C	3191	A -> G	TAT -> TGT	493	(transition) SNP	No- sinónimo	2,2
WSMV05	Cl		4137	T -> C	CTT -> CTC	501	(transition) SNP	Sinónimo	12,6
WSMV05	Nla	I -> S	6497	T -> G	ATT -> AGT	551	(transversion) SNP	No- sinónimo	4,4
WSMV05	Nla	N -> H	6505	A -> C	AAT -> CAT	553	(transversion) SNP	No- sinónimo	4,3
WSMV05	NIb		7416	C -> T	TAC -> TAT	454	(transition) SNP	Sinónimo	2
WSMV05	CP	A -> E	8102	C -> A	GCA -> GAA	561	(transversion) SNP	No- sinónimo	2
WSMV05	CP	T -> N	8108	C -> A	ACT -> AAT	563	(transversion) SNP	No- sinónimo	2,3
WSMV05	CP	S -> T	8126	G -> C	AGT -> ACT	567	(transversion) SNP	No- sinónimo	2,8

WSMV05	CP	S -> R	8131	A -> C	AGT -> CGT	569	SNP (transversion)	No- sinónimo	2,3
WSMV06	P3	M -> L	2635	A -> T	ATG -> TTG	405	SNP (transversion)	No- sinónimo	4,2
WSMV06	Cl	R -> Q	4532	G -> A	CGG -> CAG	621	SNP (transition)	No- sinónimo	20,6
WSMV06	Nla	S -> G	5305	A -> G	AGT -> GGT	650	SNP (transition)	No- sinónimo	5,8
WSMV07	HC-Pro	N -> H	1411	A -> C	AAC -> CAC	371	SNP (transversion)	No- sinónimo	3,8
WSMV07	HC-Pro	M -> T	1406	T -> C	ATG -> ACG	374	SNP (transition)	No- sinónimo	3,7
WSMV07	HC-Pro		1404	A -> G	ACA -> ACG	375	SNP (transition)	Sinónimo	3,7
WSMV07	HC-Pro	R -> H	1355	G -> A	CGC -> CAC	425	SNP (transition)	No- sinónimo	2,4
WSMV08	P3	M -> L	2635	A -> T	ATG -> TTG	318	SNP (transversion)	No- sinónimo	7,2
WSMV09	HC-Pro	K -> R	1145	A -> G	AAG -> AGG	500	SNP (transition)	No- sinónimo	39,4
WSMV09	P3		2817	G -> A	CCG -> CCA	541	SNP (transition)	Sinónimo	39,4
WSMV09	Nla	I -> S	6497	T -> G	ATT -> AGT	635	SNP (transversion)	No- sinónimo	3,6
WSMV09	Nla	N -> H	6505	A -> C	AAT -> CAT	638	SNP (transversion)	No- sinónimo	3,3
WSMV09	CP	T -> K	8318	C -> A	ACG -> AAG	549	SNP (transversion)	No- sinónimo	14
WSMV10	Nla		6192	G -> A	GTG -> GTA	722	SNP (transition)	Sinónimo	2,4
WSMV10	Nla	I -> S	6497	T -> G	ATT -> AGT	652	SNP (transversion)	No- sinónimo	3,7
WSMV10	Nla	N -> H	6505	A -> C	AAT -> CAT	660	SNP (transversion)	No- sinónimo	3,5
WSMV10	Nlb		6744	G -> A	CTG -> CTA	623	SNP (transition)	Sinónimo	2,6
WSMV11	HC-Pro		1404	A -> G	ACA -> ACG	711	SNP (transition)	Sinónimo	4,8
WSMV11	Nlb		7788	G -> A	TTG -> TTA	661	SNP (transition)	Sinónimo	16,8
WSMV12	HC-Pro	R -> L	1400	G -> T	CGA -> CTA	462	SNP (transversion)	No- sinónimo	2,4
WSMV12	HC-Pro		1404	A -> G	ACA -> ACG	454	SNP (transition)	Sinónimo	2,6
WSMV12	HC-Pro	M -> T	1406	T -> C	ATG -> ACG	449	SNP (transition)	No- sinónimo	2,2
WSMV12	HC-Pro	N -> H	1411	A -> C	AAC -> CAC	435	SNP (transversion)	No- sinónimo	2,5
WSMV12	HC-Pro	I -> S	1769	T -> G	ATC -> AGC	406	SNP (transversion)	No- sinónimo	33,3
WSMV12	HC-Pro		2052	A -> G	CCA -> CCG	453	SNP (transition)	Sinónimo	2,2
WSMV12	P3	M -> L	2635	A -> T	ATG -> TTG	379	SNP (transversion)	No- sinónimo	5,3
WSMV12	Nlb	N -> D	7108	A -> G	AAC ->	444	SNP	No-	2,5

WSMV12	NIb	M -> V	7771	A -> G	GAC ATG -> GTG	386	(transition) SNP	sinónimo No- sinónimo	2,3
WSMV12	NIb		7782	A -> G	CCA -> CCG	384	(transition) SNP	Sinónimo	29,7
WSMV13	P1		426	T -> C	CGT -> CGC	1110	(transition) SNP	Sinónimo	2,5
WSMV13	P1	A -> T	484	G -> A	GCT -> ACT	1060	(transition) SNP	No- sinónimo	2
WSMV13	HC-Pro	T -> A	1690	A -> G	ACA -> GCA	844	(transition) SNP	No- sinónimo	2,8
WSMV13	HC-Pro		1842	T -> C	GGT -> GGC	760	(transition) SNP	Sinónimo	2
WSMV13	HC-Pro		2139	T -> C	GTT -> GTC	969	(transition) SNP	Sinónimo	2,1
WSMV13	P3		2568	G -> A	GCG -> GCA	871	(transition) SNP	Sinónimo	2,4
WSMV13	P3	M -> L	2635	A -> T	ATG -> TTG	666	(transversion) SNP	No- sinónimo	2,1
WSMV13	CI		3687	T -> C	AAT -> AAC	911	(transition) SNP	Sinónimo	2
WSMV13	CI		3924	G -> A	GGG -> GGA	916	(transition) SNP	Sinónimo	2,8
WSMV13	CI		4047	C -> T	GAC -> GAT	908	(transition) SNP	Sinónimo	2,4
WSMV13	N1a		5802	T -> C	CAT -> CAC	1090	(transition) SNP	Sinónimo	2,3
WSMV13	N1a	I -> S	6497	T -> G	ATT -> AGT	862	(transversion) SNP	No- sinónimo	2,4
WSMV13	N1a	N -> H	6505	A -> C	AAT -> CAT	861	(transversion) SNP	No- sinónimo	2,2
WSMV13	NIb		6684	T -> C	TCT -> TCC	790	(transition) SNP	Sinónimo	2,2
WSMV13	NIb		7176	A -> G	GAA -> GAG	919	(transition) SNP	Sinónimo	2
WSMV13	NIb		7911	C -> T	ATC -> ATT	895	(transition) SNP	Sinónimo	2,5
WSMV13	CP		8130	C -> A	GGC -> GGA	921	(transversion) SNP	Sinónimo	2,1
WSMV13	CP	G -> E	8189	G -> A	GGG -> GAG	895	(transition) SNP	No- sinónimo	17,5
WSMV13	CP		8361	G -> A	CGG -> CGA	757	(transition) SNP	Sinónimo	2,5
WSMV13	CP		8392	C -> T	CTA -> TTA	762	(transition) SNP	Sinónimo	2,5

ANEXO II

Especies de *Aculodes* asociadas a gramíneas (*Poaceae*) descritas a nivel mundial utilizadas para realizar la comparación y descripción de la nueva especie

Se presenta a continuación las 21 especies de *Aculodes* asociadas a gramíneas (*Poaceae*) descritas a nivel mundial. Se incluye información sobre tipo de hospedante, localidad y hábito.

***Aculodes agropyronis* (Keifer, 1960)**

Tipo de hospedante: *Agropyron smithi* Rydb., actualmente denominado como sinónimo de *Elymus smithii* (Rydb.) Gould (The Plant List 2013).

Localidad tipo: Tejas, EEUU.

Hábito: en hojas jóvenes enrolladas y sobre la hoja cerca de la vaina.

***Aculodes bambusae* (Kuang, 1997)**

Tipo de hospedante: *Bambusa* sp.

Localidad tipo: Hangzhou City, Zhejiang Province, China.

Hábito: errantes.

***Aculodes calamaabditus* (Skoracka, 2003)**

Tipo de hospedante: *Calamagrostis epigeios* (L.) Roth., actualmente el nombre aceptado es *Calamagrostis epigejos* (L.) Roth (The Plant List 2013).

Localidad tipo: Forest, Lesna Dolina (16° 12'E, 51° 44'N), Glogow, Poland.

Hábito: errantes en la superficie superior de la hoja.

***Aculodes capillaris* (Skoracka, 2003)**

Tipo de hospedante: *Agrostis capillaris* L.

Localidad tipo: Biedrusko cerca de Poznan (16° 55'E, 52° 29'N), Poland.

Hábito: errantes en la superficie superior de la hoja, sobre todo cerca de la parte superior.

Aculodes deschampsiae (Sukhareva, 1972)

Tipo de hospedante: *Deschampsia cespitosa* (L.) P. Beauv.

Localidad tipo: Parque del Biological Institute, Leningrad University Petergof, Leningrad Region, Rusia.

Hábito: errante en ranuras en la superficie superior de la hoja.

Referencia: dibujos y caracterización taxonómica también en Skoracka (2004).

Aculodes dubius (Nalepa, 1891)

Tipo de hospedante: *Helictotrichon pratense* (L.) Besser ex Pilg.

Localidad tipo: Austria (Amrine and Stasny 1994).

Hábito: en nervaduras sobre superficie de las hojas; flores.

Referencia: dibujos y caracterización taxonómica también en Skoracka (2004).

Aculodes festucae (Skoracka, Labrzycka & Rector, 2009)

Tipo de hospedante: *Festuca arundinaceae* Schreb.

Localidad tipo: Gorski Kotar, 30 Km NE de Rijeka (14° 35.047'E, 45° 28.848'N), Croacia.

Hábito: errantes en la superficie superior de la hoja.

Aculodes fulleri (Keifer, 1966a)

Tipo de hospedante: *Stipa californica* Merr. & Burt-Davy ex Hall., actualmente referido como un sinónimo de *Stipa occidentalis* Thurb. ex S. Watson (The Plant List 2013).

Localidad tipo: Upper King's Creek, Lassen Nat. Pk., Shasta Co., California, USA.

Hábito: en las superficies superiores de las hojas.

Aculodes holcusi (Skoracka, 2004)

Tipo de hospedante: *Holcus mollis* L.

Localidad tipo: Przechyba, Beskid Sadecki Mts., Polonia.

Hábito: errantes en las superficies superiores de las hojas.

Aculodes janboczeki (Skoracka, 2005)

Tipo de hospedante: *Bromus inermis* Leys.

Localidad tipo: Pradera cerca de Oak Forest (48 ° 02.730 'N, 20 ° 28.814' E), 580 m sobre el nivel del mar, Bukki Mts., Hungría.

Hábito: errantes en las superficies superiores de las hojas.

Aculodes koeleriae (Sukhareva, 1985)

Tipo de hospedante: *Koeleria cristata* (L.), actualmente referido como un sinónimo de *Koeleria pyramidata* (Lam.) P.Beauv. (The Plant List 2013).

Localidad tipo: en pradera parecida a una estepa, cerca de Putsilovska, distrito de Pogranichny., Territorio marítimo, Primorskij Kraj, Rusia.

Hábito: en la superficie superior de la hoja; entre las nervaduras.

Aculodes kransnovi (Sukhareva, 1994)

Tipo de hospedante: *Sasa palmata* E. G. Camus.

Localidad tipo: Jardín botánico de Batumskoy, Georgia.

Hábito: los ácaros se encontraron en la superficie de las hojas.

Aculodes levis (Huang, 2001)

Tipo de hospedante: *Phyllostachys makinoi* Hayata.

Localidad tipo: Kaohsiung, Tengchih, Taiwan, China.

Hábito: errante en la superficie de la hoja inferior. No se observó daño.

Aculodes mckenziei (Keifer, 1944)

Tipo de hospedante: *Leymus triticoides* (Buckl.) Pilg.

Localidad tipo: Sacramento, California, USA.

Hábito: los ácaros se encuentran en la superficie superior de hojas. Causan algo de pardeamiento.

Referencia: Dibujos y caracterización taxonómica en Skoracka (2004).

Aculodes mongolicus (Skoracka & Shi, 2001)

Tipo de hospedante: *Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link.

Localidad tipo: Arkhangy Aymag, Horgo Terhiyn Tsagaan Nuur National Park, Mongolia.

Hábito: errantes en las superficies superiores de las hojas.

Aculodes multiricavus (Skoracka, 2004)

Tipo de hospedante: *Bromus inermis* Leyss.

Localidad tipo: Xerothermic sward, Owczary, Poland.

Hábito: errantes en las superficies superiores de las hojas.

Aculodes neglectivagrans (Skoracka, 2005)

Tipo de hospedante: *Calamagrostis neglecta* (Ehrh.) Gaertn., Mey et Schreb., actualmente referido como un sinónimo de *Calamagrostis stricta* (Timm) Koeler (The Plant List 2013).

Localidad tipo: Duna del litoral, 14 m de altitud, 10 km al oeste de la aldea de Kuzrjeka, cerca del cabo de Turij, S. de Uмба, costa del mar blanco, península de Kola, Rusia. (66 ° 35.722 'N, 34 ° 42.965' E)

Hábito: errantes en las superficies superiores de las hojas.

Referencia: Skoracka and Pacyna (2005).

Aculodes ponticus (Sukhareva, 1986)

Tipo de hospedante: *Eremopyrum distans* (Koch) Nevski.

Localidad tipo: Near Kabardinka Village, Krasnodarski Kraj, Rusia.

Hábito: entre las nervaduras en la superficie de las hojas.

Aculodes stoloniferae (Skoracka, 2005)

Tipo de hospedante: *Agrostis stolonifera* L. subsp. *Straminea* (Hartm.) Tzvel.

Localidad tipo: Taiga, cerca de una playa pedregosa, cerca del Cabo Turij, S. de Uмба, Mar Blanco. Costa, (66 ° 37.822 'N, 34 ° 27.345' E) Península de Kola, Rusia.

Hábito: errantes en las superficies superiores de las hojas.

Referencia: Skoracka and Pacyna (2005).

Aculodes sylvatici (Skoracka, Labrzycka & Rector, 2009)

Tipo de hospedante: *Brachypodium sylvaticum* (Huds.) P. Beauv.

Localidad tipo: Montañas de Velebit, a unos 24 km al sureste de Senj (15 ° 02.830'E, 44 ° 56.412'N), Croacia.

Hábito: errantes en las superficies superiores de las hojas.

Aculodes tsukushiensis (Xue, Song & Hong, 2010)

Tipo de hospedante: *Elymus tsukushiensis* Honda var. *transiens* (Hack.) Osad.

Localidad tipo: Zhouzhi County, Shaanxi Province, P.R. elevación 500 m, (34°03'54"N, 108°19'22"E), China.

Hábito: errante en las superficies de las hojas. No se observó daño en el hospedante.

Tabla 2. Descripción de 10 ácaros eriófidos (hembras) recolectados sobre *Stipa* sp. Las mediciones están presentadas en micrómetros (mm).

Caracter (Slide N°/Posición)	Hembra										Macho
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1
Idiosoma	shape:										
Idiosoma L.	194,75	190,95	200,45	219,45	222,3	216,6	200,45	223,25	221,35	202,35	170,05
Idiosoma W.	38,95	40,85	37,05	44,65	45,6	39,9	38,95	44,65	NP	NP	33,25
Gnatosoma											
Seta apical (d)	8,55	7,6	7,6	8,55	7,6	7,6	6,65	8,55	7,6	7,6	6,65
Chelicerae L.	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
Seta basal	1,9	1,9	NP	1,9	1,9	1,9	NP	1,9	1,9	NP	NP
Estilete oral L.	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
Rostro (palpo)	16,15	15,2	16,15	16,15	17,1	16,15	14,25	16,15	16,15	NP	14,25
Escudo prodorsal	shape:										
Escudo prodorsal L.	36,1	37,05	37,05	38	37,05	36,1	36,1	36,1	37,05	36,1	32,3
Escudo prodorsal W.	28,5	27,55	28,5	27,55	27,55	26,6	22,8	26,6	NP	NP	25,65
Seta escapular (sc) L.	22,8	21,85	29,45	20,9	22,8	20,9	22,8	21,85	20,9	21,85	19
Scapular tuercule sp.	14,25	16,15	13,3	14,25	14,25	14,25	14,25	15,2	NP	NP	14,25
Otra seta L.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Otra seta L.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Frontal lobe	shape:										
Frontal lobe L.	5,7	5,7	6,65	7,6	6,65	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	4,75
Frontal lobe (base) W.	7,6	7,6	7,6	8,55	8,55	8,55	7,6	8,55	7,6	NP	7,6
Legs	chaetotaxy:										
Leg I L.	31,35	28,5	29,45	32,3	31,35	27,55	27,55	30,4	30,4	27,55	23,75

Femur I L	9,5	9,5	10,45	8,55	8,55	9,5	9,5	8,55	8,55	8,55	8,55
Femoral seta I (bv) L.	6,65	7,6	6,65	7,6	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	7,6	5,7
Genu I L.	6,65	5,7	6,65	5,7	6,65	6,65	5,7	6,65	5,7	5,7	5,7
Genual seta I (I') L.	16,15	15,2	19	19	17,1	18,05	18,05	17,1	17,1	16,15	12,35
Tibia I L.	6,65	6,65	6,65	6,65	6,65	6,65	6,65	6,65	6,65	6,65	5,7
Tibial seta I (I') L.	7,6	7,6	7,6	6,65	9,5	6,65	7,6	7,6	7,6	6,65	5,7
Tarsus I L.	7,6	7,6	6,65	7,6	7,6	6,65	6,65	7,6	6,65	6,65	6,65
Lateral seta I (ft') L.	23,75	15,2	19	20,9	22,8	20,9	21,85	22,8	20,9	19,95	18,05
Dorsal seta I (ft') L.	14,25	12,35	14,25	15,2	16,15	18,05	16,15	17,1	17,1	13,3	11,4
Unguinal seta I (u') L.	5,7	4,75	5,7	4,75	4,75	5,7	5,7	4,75	5,7	NP	4,75
Solenidion I L.	8,55	8,55	7,6	7,6	9,5	8,55	8,55	8,55	8,55	8,55	7,6
Empodium I L.	6,65	6,65	6,65	6,65	7,6	6,65	7,6	6,65	6,65	6,65	5,7
Empodium I rays	9	8	8	9	8	9	9	9	9	9	8
Leg II L	28,5	25,65	25,65	27,55	27,55	27,55	27,55	27,55	26,6	25,65	22,8
Femur II L	9,5	9,5	8,55	9,5	8,55	8,55	9,5	8,55	9,5	8,55	8,55
Femoral seta II (bv) L.	10,45	9,5	9,5	10,45	9,5	9,5	11,4	9,5	9,5	9,5	7,6
Genu II L.	4,75	4,75	4,75	5,7	5,7	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	3,8
Genual seta II (I') L.	6,65	7,6	7,6	8,55	8,55	8,55	8,55	9,5	8,55	8,55	7,6
Tibia II L.	5,7	5,7	5,7	5,7	4,75	5,7	5,7	5,7	4,75	5,7	5,7
Tarsus II L.	6,65	6,65	7,6	6,65	6,65	7,6	6,65	6,65	6,65	6,65	5,7
Lateral seta II (ft') L.	20,9	18,05	19,95	19,95	21,85	19	20,9	22,8	20,9	20,9	19,95
Dorsal seta II (ft') L.	8,55	7,6	8,55	8,55	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	6,65
Unguinal seta II (u') L.	4,75	4,75	NP	4,75	6,65	5,7	4,75	5,7	5,7	NP	4,75
Solenidion II L.	9,5	9,5	8,55	8,55	9,5	8,55	9,5	9,5	9,5	8,55	8,55
Empodium II L.	6,65	6,65	5,7	6,65	6,65	6,65	6,65	6,65	6,65	6,65	5,7
Empodium II rays	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	8

Coxisternal region	ornamentation:										
Coxal seta I (1b) sp.	9,5	9,5	8,55	8,55	8,55	8,55	8,55	8,55	NP	NP	8,55
Coxal seta I (1b) L.	6,65	6,65	7,6	8,55	9,5	6,65	8,55	9,5	7,6	8,55	4,75
Coxal seta II (1a) sp.	4,75	5,7	6,65	5,7	5,7	4,75	4,75	5,7	NP	NP	4,75
Coxal seta II (1a) L.	14,25	13,3	14,25	13,3	14,25	13,3	14,25	6,65	12,35	13,3	9,5
Coxal seta III (2a) sp.	19	19,95	15,2	18,05	19	17,1	17,1	19	NP	NP	15,2
Coxal seta III (2a) L.	28,5	27,55	27,55	22,8	25,65	19,95	27,55	10,45	16,15	31,35	19,95
Sternal line L.	6,65	6,65	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	6,65	NP	5,7
Coxisternal rings N°	5	5	5	5	5	5	5	5	NP	5	4
Genitalia	ornamentation:										
Genitalia L.	12,35	13,3	11,4	12,35	12,35	13,3	11,4	12,35	NP	12,35	12,35
Genitalia W.	19	18,05	16,15	18,05	18,05	17,1	18,05	17,1	NP	NP	16,15
Longitudinal ribs	12	10	11	12	12	11	12	12	NP	10	NP
Genital seta (3a) L.	17,1	12,35	14,25	14,25	19	10,45	15,2	19	NP	15,2	9,5
Opisthosoma	obs.										obs.
Dorsal seta (c1) L.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dorsal seta (c2) sp./ring	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lateral seta (c2) L.	22,8	20,9	26,6	18,05	19	17,1	15,2	17,1	13,3	16,15	19,95
Lateral seta (c2) ring	1 o 2	2	2	2	2	2	2	2	NP	2	1 o 2
Ventral seta I (d) L.	36,1	29,45	35,15	38,95	39,9	30,4	40,85	42,75	40,85	28,5	33,25
Ventral seta I (d) ring	12	12	13	14	16	12	14	15	NP	13	10
Ventral seta I (d) sp.	25,65	26,6	19,95	25,65	22,8	22,8	21,85	19	NP	NP	20,9
Ventral seta I (d) micro.	21	20	20	22	18	21	22	22	NP	NP	15
Ventral seta II (e) L.	14,25	9,5	11,4	11,4	12,35	11,4	13,3	14,25	10,45	10,45	5,7
Ventral seta II (e) ring	29 o 30	31	30	30	35	28	32	35	NP	29	22
Ventral seta II (e) sp.	11,4	12,35	11,4	11,4	10,45	11,4	10,45	11,4	NP	NP	8,55

Ventral seta II (e) micro.	9	9	10	9	8	7	8	10	NP	NP	5
Ventral seta III (f) L.	25,65	12,35	19,95	23,75	20,9	21,85	21,85	22,8	20,9	19	14,25
Ventral seta III (f) ring	58	58	59	56	63	55	59	63	NP	56	43
Ventral seta III (f) sp.	16,15	16,15	14,25	16,15	7,6	14,25	14,25	NP	NP	NP	13,3
Ventral seta III (f) micro.	15	14	13	15	7 (L)	13	13	NP	NP	NP	13
Total dorsal annuli	74	71	71	69	70	70	67	69	67	64	55
Total ventral annuli	62	62	63	60	67	59	63	67	NP	60	47
Caudal seta (h2) L.	68,4	26,6	84,55	62,7	52,25	53,2	65,55	47,5	68,4	65,55	34,2
Accesory seta (h1) L.	4,75	4,75	3,8	4,75	4,75	4,75	3,8	3,8	3,8	5,7	2,85

PUBLICACIONES

Del presente trabajo de tesis se han publicado los siguientes artículos:

- Alemandri V., Truol G., Mendonça R.S and Navia D. 2015. Eriophyid mites in the genus *Aculodes* Keifer (Prostigmata: Eriophyidae) from grasses- the first taxon from South America and world species information. *International Journal of Acarology* 41(5): 429-441.
- Alemandri V., Argüello Caro E., Mattio M.F., Dumón A., Rodríguez S.M. y Truol, G. 2011. Amplificación de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) para la caracterización molecular del ácaro *Aceria tosichella* en Argentina. *Fitopatología Colombiana* 35(1) Suplemento: 76.
- Alemandri V., Mattio M.F., Argüello Caro E., Dumón A., Abbate P.E., Pontaroli A.C., Bainotti C. y Truol G. 2013. Virus transmitidos por el ácaro *Aceria tosichella* Keifer: *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) y *Wheat mosaic virus* (WMoV). *Revista Aapresid* 120: 44-48.

Se han realizado las siguientes presentaciones a congresos y reuniones científicas:

- Alemandri V., Bainotti C., Lau D., Rodriguez S.M. y Truol G. Cultivares de trigo evaluados frente a virus transmitidos por eriófidos, *Wheat streak mosaic virus* y *Wheat mosaic virus*, de importancia para países del cono sur. En: 4° Congreso Argentino de Fitopatología. 19, 20 y 21 de abril de 2017, Mendoza, Argentina, B3-003, p. 391.
- Alemandri V., Bainotti C., Rodríguez M.S., Mattio M.F., Argüello Caro E.B., Dumón A. y Truol, G. Evaluación del comportamiento de cultivares de trigo argentinos y brasileros frente a *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) y *Wheat mosaic virus* (WMoV) en infecciones artificiales. En: Jornadas Fitosanitarias Argentinas, 7 al 9 de Octubre de 2015, Santa Fe. p. 24.
- Alemandri V., López Lambertini P.M. y Truol G. Reconstrucción de haplotipos del genoma completo del virus del mosaico estriado del trigo (*Wheat streak mosaic virus*, WSMV) a partir de secuencias generadas por técnicas de nueva generación (Next-Generation Sequencing). En: XI Congreso Argentino de Virología (CAV), 23 al 26 de junio de 2015, ciudad autónoma de Buenos Aires. p. 46.
- Alemandri V., López Lambertini P.M. y Truol G. Análisis de la diversidad genética intra-hospedante de la secuencia completa del *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) en Argentina. En: Jornadas de Cierre del Proyecto de Cooperación Internacional INTA-EMBRAPA. 6, 7 y 8 de Octubre de 2014, Córdoba, Argentina. p. 31-32.
- Alemandri V., Navia D. y Truol G. Caracterización de la diversidad genética de *Aceria tosichella* en Argentina e identificación morfológica y molecular de ácaros eriófidos asociados a trigo. En: Jornadas de Cierre del Proyecto de

- Cooperación Internacional INTA-EMBRAPA. 6, 7 y 8 de Octubre de 2014, Córdoba, Argentina. p. 36-37.
- Alemandri V., Navia D., Rodríguez S.M. y Truol G. Ácaros eriófidos potenciales vectores de virosis de trigo y otras especies de gramíneas: identificación preliminar. En: 3° Congreso Argentino de Fitopatología, 4, 5 y 6 de junio de 2014, San Miguel de Tucumán. p. 294.
- Alemandri V., López Lambertini P.M. y Truol G. Pirosecuenciación de amplicones: una rápida metodología para obtener el genoma completo de *Wheat streak mosaic virus* (WSMV). En: 3° Congreso Argentino de Fitopatología, 4, 5 y 6 de junio de 2014, San Miguel de Tucumán. p. 486.
- Alemandri V., Truol G., Santos de Mendonça R e Navia D. Determinación de la diversidad de secuencias a nivel nuclear y mitocondrial de poblaciones de *Aceria tosichella* Keifer vectores de *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) y High plains virus (HPV) en Argentina. En: Workshop: Cooperação Internacional Embrapa/INTA. 17 e 18 de setembro de 2013, Passo Fundo, Brasil. Livro de Resumos. p.19-22.
- Alemandri V., Navia D., Mattio M.F., Rodríguez S.M. y Truol G. Análisis de secuencias de la región Internal Transcribed Spacer (ITS) de DNA ribosomal de *Aceria tosichella* Keifer vector de *Wheat streak mosaic virus* (WSMV), de diferentes zonas trigueras de Argentina. Acarología Latinoamericana. Primer Congreso Latinoamericano de Acarología. Puebla, 20 a 23 de mayo de 2012. México. Estrada Venegas EG, Equihua Martínez A, Acuña Soto JA, Chaires Grijalva MP, Durán Ramírez G. (Eds.). pp 170-175.