

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- 1- Ahmed M., Anjum M.A., Shah A.H. and Hamid A. 2010. *In vitro* preservation of *Pyrus* germplasm with minimal growth using different temperature regimes. *Pakistan Journal of Botany* 42: 1639-1650.
- 2- Ballester A., Janeiro L.V. and Vieitez A.M. 1997. Cold storage of shoot cultures and alginate encapsulation of shoot tips of *Camellia japonica* L. and *Camellia reticulata* Lindley. *Scientia Horticulturae* 71: 67-78.
- 3- Corredoira E., San José M.C., Martínez T., Valladares S., Couselo J.L., Janeiro L., Vieitez A.M. y Ballester A. 2011. Conservación de germoplasma en especies leñosas con técnicas de cultivo *in vitro* y almacenamiento en frío. *Spanish Journal of Rural Development* 2: 15-24.
- 4- Engelmann F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. *Euphytica* 57: 227-243.
- 5- Janeiro L.V., Vieitez A.M. and Ballester A. 1995. Cold storage of *in vitro* cultures of wild cherry, chestnut and oak. *Annals of Forest Science* 52: 287-293.
- 6- Kulkarni V.M., Varshney L.R., Bapat V.A. and Rao P.S. 2002. Propagation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) by shoot proliferation of alginate-encapsulated axillary buds stored at 4°C. *Current Science* 83: 941-944.
- 7- Kuranuki Y. and Sakai A. 1995. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of tea (*Camellia sinensis*) by vitrification. *CryoLetters* 16: 345-352.
- 8- Molina S.P., Pérez M.L., Rey H.Y. y Mroginski L.A. 2013. Regeneración de plantas de té (*Camellia sinensis*) por cultivo *in vitro* de meristemas, yemas axilares y segmentos uninodales. *Rev. FCA UNCUYO* 45: 127-134.
- 9- Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- 10- Shibli R.A., Shatnawi M.A., Subaih W.S. and Ajlouni M.M. 2006. *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: a review. *World Journal of Agricultural Sciences* 2: 372-382.

Presencia de reovirus y torradovirus en co-infección con un potexvirus en cultivos de mandioca en Argentina

Andrea Zanini¹, Liliana Di Feo¹, Andrés Luque² y Patricia Rodríguez Pardina¹

1- Instituto de Patología Vegetal (IPAVE) CIAP- INTA. 2- Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV) CIAP- INTA. Córdoba.

Correo-e: ldifeoar@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, las infecciones virales en cultivos de mandioca en África, han tenido un efecto devastador sobre la producción de raíces tuberosas y, en América, hay evidencia de la aparición de varias enfermedades virales que causan pérdidas de rendimiento significativas (1).

Algunos de estos virus se han asociado con distintos síntomas foliares, como por ejemplo el *Cassava vein mosaic virus* (CsVMV),

reportado únicamente en Brasil (2) y el *Cassava common mosaic virus* (CsCMV), con amplia distribución en Brasil, Colombia, Paraguay, África y Asia y recientemente citado en Argentina (3-7). Al menos uno de estos patógenos, el *Cassava frogskin-associated virus* (CsFSaV), está asociado con síntomas radiculares graves (enfermedad del “cuero de sapo”). Este virus se distribuye en Brasil, Venezuela, Costa Rica, Panamá y Perú, y la patología en la que participa es la principal limitante de la producción de mandioca en

Latinoamérica (8-10). Es una enfermedad producida por un complejo viral en el cual estarían involucradas distintas razas del reovirus CsFSaV, perteneciente al género *Oryzavirus* y un fitoplasma, que al encontrarse en infección única, no induce síntoma foliar, ni radical en plantas indicadoras de mandioca (1,11,12).

Los virus pertenecientes al género *Oryzavirus*, poseen su genoma constituido por ARN doble cadena (ARNdc), dividido en 10 segmentos, y sus partículas son de aproximadamente 75-80nm de diámetro.

Recientemente, en Colombia, se han realizado estudios acerca de nuevas especies virales que afectan al cultivo de mandioca. Entre ellas, se encuentra el Cassava polero like virus (CsPLV), perteneciente al género *Luteovirus*, con partículas esféricas de 25-30nm de diámetro, y el Cassava torrado like virus (CsTLV) del género *Torradovirus*, cuyas partículas son isométricas de 30nm de diámetro. El genoma es lineal, bipartito y de simple cadena. Cada segmento de ARN es traducido a poliproteínas, las cuales luego son procesadas en una serie de pasos a proteínas funcionales. El ARN1 codifica proteínas necesarias para la replicación, mientras que el ARN2 codifica la cápside proteica. Un estudio reciente revela que el CsTLV causa síntomas foliares en la variedad de mandioca "Secundina" (1).

En Argentina, hasta hace poco, no existían antecedentes bibliográficos sobre virus de mandioca; no obstante nuestras apreciaciones en los cultivos de las principales provincias productoras (7), permiten aseverar que los mismos están presentes de manera generalizada y que, dada la intensidad de los síntomas foliares que producen, podrían provocar pérdidas en el rendimiento de raíces tuberosas, que no se advierten debido a la ausencia de patrones sanos de comparación en las zonas de cultivo. Dada la necesidad de dar solución a esta problemática, la propuesta de este trabajo fue el inicio y pro-

fundación de los estudios referidos a las virosis en las zonas productoras de mandioca del país. La multiplicación agámica de la especie y el ingreso indiscriminado de material de propagación desde otros países, hace altamente probable la ocurrencia de infecciones virales mixtas en mandioca. Al respecto, en plantas infectadas por CsCMV pudieron observarse síntomas conspicuos de mosaico foliar, acompañado por diseño lineal clorótico alrededor de la nervadura central y puntos cloróticos en toda la lámina. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue identificar molecularmente a otros patógenos, además del CsCMV recientemente informado, involucrados en la variada sintomatología observada en el cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

- *Multiplex PCR*

Se tomaron muestras de estacas de mandioca que presentaban síntomas de mosaico foliar y diseños lineales cloróticos (Figura 1A) y mosaico foliar con deformación de la lámina foliar (Figura 1B), las cuales fueron convenientemente acondicionadas en invernadero. Se extrajo ARN con el método CTAB modificado (1). A partir del mismo se realizó la transcripción reversa a ADN complementario (ADNc) empleando cebadores hexámeros que hibridan al azar (Invitrogen, *Life technologies*. California, USA) y la enzima de transcripción reversa M-MLV (Promega Corporation. Madison, USA) (1).

Se realizó *multiplex PCR*, con cebadores específicos para: CsFSaV y CsPLV (*mix 1*) y CsTLV ARN 1 y 2 (*mix 2*) (1). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25µl, conteniendo 2µl de cDNA; 5µl de tampón PCR 5x; 1,5µl de MgCl₂ 25mM; 2,5µl dNTP mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 2,5mM y 0,5µl de GoTaq® DNA Polymerase (Promega Corporation. Madison, USA). La cantidad de cebadores utilizados fue 1,2µl para el mix 1 y 1,6µl para el mix 2.

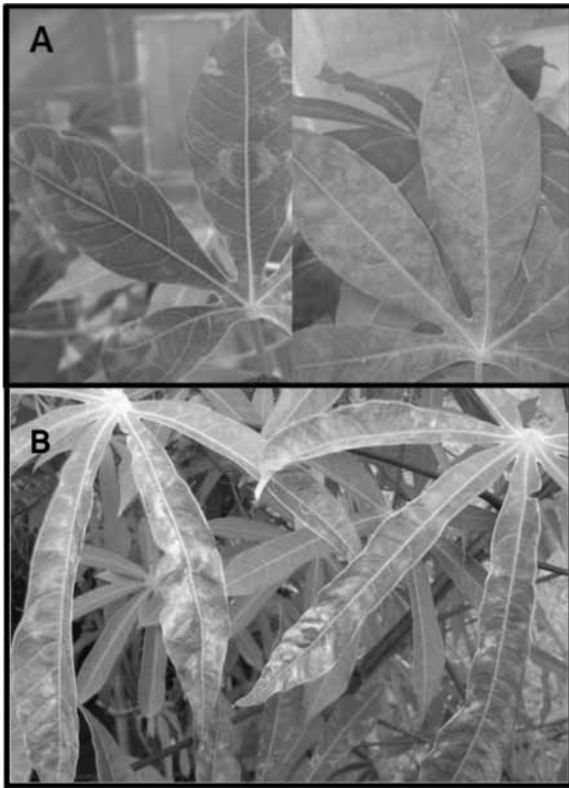


Figura 1. Clones de mandioca infectados con CsCMV de diferentes orígenes geográficos. (A) Proveniente de Formosa, se observa un patrón clorótico lineal con forma de anillo y síntomas de mosaico foliar, en algunos casos con deformación de la lámina foliar. (B) Proveniente de Corrientes, con síntomas conspicuos de mosaico foliar y puntos cloróticos.

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa (1,5% p/v), teñidos con bromuro de etidio (2µg/ml), a fin de verificar la presencia de la banda del tamaño esperado, que en el caso del *mix* 1 era de 958pb (CsFSaV) y 1200pb (CsPLV), y en el *mix* 2 de 850pb (ARN1) y 720pb (ARN2).

- **Clonado y secuenciación**

Los productos de PCR obtenidos fueron utilizados para su ligado en el vector pCR® 4-TOPO® (Figura 5), siguiendo las especificaciones del fabricante (TOPO® TA Cloning Kit for Sequencing, (Invitrogen, Life technologies. California, USA). Las células competentes de *Escherichia coli*, se transformaron por el método de choque térmico (incubando a 42°C por 30 segundos) de acuerdo al protocolo de Sambrook (13) y fueron sembradas en medio

LB (Luria Bertani) + ampicilina (100 µl/ml). La presencia de los fragmentos de ADN viral, se corroboró mediante PCR de colonias. De los clones que amplificaron la banda del tamaño esperado, se eligieron de uno a tres y se ajustaron a una concentración mínima de 200 ng/µl para ser enviados a la Unidad de Genómica de INTA Castelar para su secuenciación.

Las secuencias de nucleótidos deducidos fueron comparadas con las de otros virus previamente caracterizados, que están disponibles en el *National Center of Biotechnology Information* (NCBI - www.ncbi.nlm.nih). Para ello, se empleó el programa Blastn (www.ncbi.nlm.nih/BLAST).

Los alineamientos múltiples de las secuencias de aminoácidos deducidos, se realizaron con el programa Clustal W (www.ebi.ac.uk/clustalw) y los árboles filogenéticos se generaron con el programa MEGA versión 5.2 (www.megasoftware.net) (14), empleando el método de *neighbour-joining*. La significancia estadística del orden de las ramas se estimó realizando 2000 repeticiones del alineamiento múltiple original (*bootstrap*). Las secuencias utilizadas para la construcción de árboles se eligieron en función de las homología obtenidas en Blast-p.

En el caso de detectar CsFSaV, para el análisis filogenético, se consideraron tres aislamientos colombianos, cada uno correspondiente a una variante del virus y provenientes de distintas regiones de ese país. La primera, procedente de la Amazonía (Amazonas16A), posible origen de la enfermedad; la segunda, de Quilcacé, Cauca (FSD29A) y la tercer variante, de la región de la costa (Costa1A), la más diseminada en el país colombiano (15).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de las secuencias obtenidas de los clones de *E. coli* transformadas con el producto de PCR para el *mix* 2 (CsTLV ARN 2), se encontró un 100% de identidad a nivel de

Cuadro 1. Porcentaje de identidad de las secuencias de aminoácidos correspondientes al segmento RNA2 entre el aislamiento argentino de *Cassava torrado-like virus* (CsTLV-Ar) y un grupo selecto de torradovirus

Porcentaje de Identidad										
	1	2	3	4	5	6	7	8		
1	██████	100.0	45.4	42.9	41.2	40.8	42.9	38.2	1	CsTLV-Ar
2	0.0	██████	45.4	42.9	41.2	40.8	42.9	38.2	2	CsTLV
3	93.1	93.1	██████	45.8	45.4	44.1	46.2	45.0	3	LNLVCV
4	101.3	101.3	91.8	██████	92.4	89.9	97.1	85.3	4	TANV
5	107.1	107.1	93.1	8.0	██████	88.2	91.6	87.0	5	TCSV
6	108.7	108.7	97.1	10.9	12.8	██████	89.5	82.8	6	TCV
7	101.3	101.3	90.6	3.0	8.9	11.3	██████	85.7	7	TMV
8	118.4	118.4	94.4	16.4	14.3	19.6	15.9	██████	8	TTV
	1	2	3	4	5	6	7	8		

Las secuencias virales utilizadas fueron: el aislamiento de este trabajo (CsTLV-Ar) (KJ742698); CsTLV, *Cassava torrado-like virus* (AHA91818.1); LNLVCV, *Lettuce necrotic leaf curl virus* (AGR55592.1); TANV, *Tomato apex necrosis virus* (ABK33526.1); TCSV, *Tomato chocolate spot virus* (YP_003097231.1); TCV, *Tomato chocolate virus* (ACU01026.1); TMV, *Tomato marchitez virus* (YP_001976149.1); TTV, *Tomato torrado virus* (ACB47565.1)

Cuadro 2. Porcentaje de identidad de las secuencias de aminoácidos correspondientes a la región que codifica el gen dependiente de la ARN-polimerasa, entre el aislamiento argentino de *Cassava frogsking-associated virus* (CsFSaV-Ar) y un grupo selecto de reovirus

Porcentaje de Identidad									
	1	2	3	4	5	6	7		
1	██████	100.0	89.9	84.3	83.6	33.0	33.2	1	FSD29A
2	0.0	██████	89.9	84.3	83.6	33.0	33.2	2	Amazonas16A
3	10.8	10.8	██████	90.3	89.2	29.9	28.8	3	Costa1A
4	14.6	14.6	7.4	██████	99.1	37.5	38.4	4	CsFSaV-Ar
5	15.4	15.4	8.6	0.9	██████	37.2	38.1	5	CsFSaV
6	139.7	139.7	138.1	123.3	124.8	██████	32.3	6	RLV
7	133.1	133.1	136.9	114.5	115.8	136.8	██████	7	RRSV
	1	2	3	4	5	6	7		

Los virus están representados por su acrónimo: CsFSaV-Ar, *Cassava frogsking-associated virus* aislamiento argentino (KJ742699); CsFSaV, *Cassava frogsking-associated virus* (ABA46925.1); RLV, *Raspberry latent virus* (YP_003934919.1); RRSV, *Rice ragged stunt virus* (AEC32884.1). Las tres razas colombianas del CsFSaV se denominan según la región de procedencia: Amazonía (Amazonas16A), Cauca (FSD29A) y de la Costa (Costa1A)

nucleótidos y aminoácidos deducidos (Cuadro 1) con el ARN 2 del Cassava torrado-like virus recientemente secuenciado por Carvajal Yepes *et al.* (1) (Nº de acceso *GenBank*: KC505251.1). Según investigaciones recientes, esta variabilidad en la detección del CsTLV ARN 1 y ARN 2 sugeriría la presencia de diferentes razas, infecciones mixtas y posiblemente redistribución (1).

El árbol de la figura 2 se construyó con secuencias de aminoácidos de un grupo selecto de miembros del género *Torradovirus*, que mostraron homología con el fragmento del Cassava torrado-like virus aislado en este trabajo.

El análisis de las secuencias de los clones de *E. coli*, transformadas con el producto de PCR para el *mix 1*, exhibió un 99% de identidad a nivel de nucleótidos y aminoácidos deducidos (Cuadro 2) con el segmento 4 del aislamiento colombiano del reovirus *Cassava frogskin-associated virus* (Nº de acceso *GenBank*: DQ139870.1). Se realizó una tabla de distancias entre las secuencias de aminoácidos deducidos del aislamiento argentino, incluyendo las de las tres variantes colombianas, la depositada en el *GenBank* y la de dos reovirus que afectan a arroz: *Raspberry latent virus* (RLV) y *Rice ragged stunt virus* (RRSV) (Cuadro 2) y, de esta forma, se confirmó que el aislamiento argentino tiene el mayor porcentaje de identidad con aquel depositado en el *GenBank*, posiblemente el más difundido en Colombia, y con la variante de la Costa (Costa1A).

Utilizando regiones conservadas de aminoácidos codificantes del gen ARN dependiente de la ARN-polimerasa, los análisis filogenéticos confirmaron que el aislamiento argentino se agrupó con el colombiano del CsFSaV, y que ambos exhibieron estrecha relación con el *Rice ragged stunt virus* (RRSV), perteneciente al género *Oryzavirus*, miembro de la familia *Reoviridae*. Esto mismo fue demostrado en los estudios de Calvert *et al.* (12) y Carvajal Yepes *et al.* (1) (Figura 3).

Tanto el CsTLV como el CsFSaV, fueron encontrados en co-infección con CsCMV, en muestras de mandioca provenientes de Corrientes y Formosa, respectivamente. Ello explicaría los síntomas de mosaico foliar que presentaba la planta infectada con el reovirus, ya que el mismo no induce sintomato-

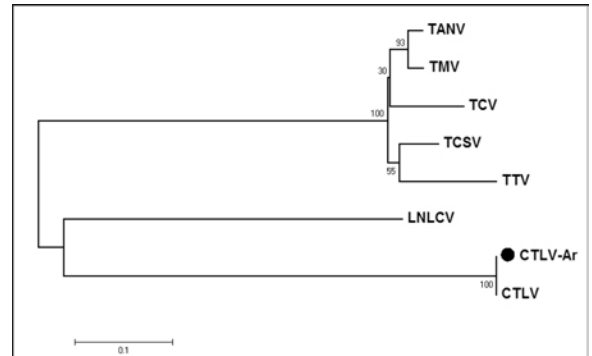


Figura 2. Árbol filogenético de los torradovirus que se agrupan con el fragmento aislado en este trabajo, el cual se indica con un punto negro. El árbol se construyó con MEGA5.2, empleando secuencias de aminoácidos. El número de ramas indica el porcentaje de repeticiones obtenidas en el análisis de *bootstrap* (2.000 repeticiones) y la barra de escala indica las sustituciones de aa por sitio. Las secuencias utilizadas fueron las mismas que las del Cuadro 1.

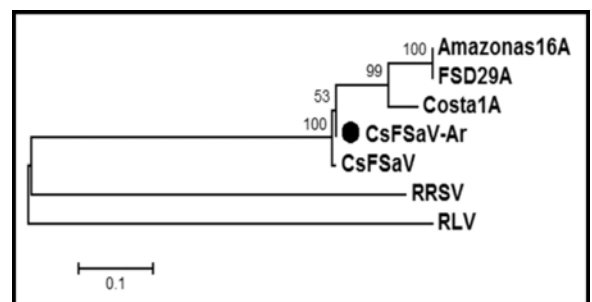


Figura 3. Árbol filogenético de los reovirus que se agrupan con el fragmento secuenciado en este trabajo (indicado con un punto negro). El árbol se construyó con el programa MEGA5.2, empleando secuencias de aminoácidos que codifican para un gen dependiente de la ARN-polimerasa, alineadas en CLUSTALW; el número de ramas indica el porcentaje de repeticiones obtenidas en el análisis de *bootstrap* (2.000 repeticiones) y la barra de escala indica las sustituciones de aa por sitio. Los nombres de los virus se indican con su acrónimo. Las secuencias utilizadas son las mismas que las del Cuadro 2.

logía en la parte aérea en infecciones simples. Por otra parte, en el clon infectado con CsFSaV y CsCMV, no se registraron síntomas radicales pues las muestras fueron tomadas de pequeñas estacas no enraizadas.

Las infecciones virales mixtas podrían interactuar de maneras inesperadas, incluyendo sinergias y antagonismos entre los agentes intervinientes, y la comprensión de estas interacciones es relevante para la predicción de la patogénesis viral, evolución del virus y para desarrollar estrategias de control eficientes (1). La enfermedad del mosaico de la mandioca, en África, y la enfermedad de la batata (*Sweet potato virus Disease*), en todo el mundo, son ejemplos de enfermedades de origen natural de virus sinérgicos con efectos devastadores en la producción (1).

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que el reovirus CsFSaV se encuentra infectando cultivos de mandioca de la provincia de Formosa y que el torradovirus CsTLV, recientemente caracterizado en el CIAT, está presente en la provincia de Corrientes. Teniendo en cuenta que ambos patógenos se asocian con la enfermedad "cuero de sapo", se considera relevante la observación exhaustiva de síntomas radiculares, dado que dicha patología está presente en países limítrofes (Brasil y Paraguay) desde donde es corriente el ingreso de material de plantación de mandioca.

Dada la dispersión generalizada de las enfermedades virales en las regiones productoras, resulta crucial continuar con los estudios pertinentes a diagnóstico, caracterización, epidemiología, relevancia económica y manejo de agentes causales de dichas virosis en cultivos de mandioca en nuestro país.

Por otra parte, es relevante investigar la naturaleza de las interacciones que ocurren entre los patógenos involucrados en infecciones mixtas.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- 1- Carvajal Yepes M., Olaya C., Lozano I., Cuervo M. and Castaño M. 2013. Unraveling complex viral infections in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) from Colombia. *Virus Research*.
- 2- Calvert L.A., Ospina M.D. and Shepherd R.J. 1995. Characterization of *Cassava vein mosaic virus*: a distinct plant pararetrovirus. *Journal of General Virology* 76: 1271-1278.
- 3- Aiton M.M., Roberts I.M. and Harrison B.D. 1988. Cassava common mosaic potexvirus from mosaic-affected cassava in the Ivory Coast. *Rep Scottish Crop Research Institute*: 191.
- 4- Chen C.T., Ko N.J. and Chen M.J. 1981. Electron microscopy of *cassava common mosaic* in Taiwan. *Rep of the Taiwan Sugar Res Inspectorate* 93: 20-27.
- 5- Costa A.S. and Kitajima E.W. 1972. Studies on virus and mycoplasma diseases of the cassava plant in Brazil. *In: Cassava Mosaic Workshop, Ibadan, Nigeria. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadán, Nigeria. pp. 18-36.*
- 6- Silberschmid K.O. 1938. O mosaico da mandioca. *Biológico* 4: 177-181.
- 7- Zanini A., Rodríguez Pardina P., Luque A. and Di Feo L. 2013. Primer informe de virus de mandioca en Argentina. *In: Resúmenes XXXVI Congreso Argentino de Horticultura. Tucumán, Argentina. p. 48*
- 8- Calvert L.A., Cuervo M. and Lozano I. 2012. Cassava viral disease in South America. *In: Cassava in the Third Millennium: Modernproduction, Processing, Use and Marketing Systems (Ospina B, Ceballos H, eds). CIAT, Cali, Colombia. pp. 309-318.*
- 9- Calvert L.A. and Thresh J.M. 2002. The viruses and virus diseases of cassava. *pp. 237-260.*
- 10- Chaparro-Martinez E.I. and Trujillo-Pinto G. 2001. First report of frog skin disease in cassava (*Manihot esculenta*) in Venezuela. *Plant Disease* 85: 1285.
- 11- Alvarez E., Mejía J.F., Llano G.A., Loke J.B. and Calari A. 2009. Characterization of a Phytoplasma Associated with Frogskin Disease in Cassava. *Plant Disease* 93: 1139-1145.
- 12- Calvert L.A., Cuervo M., Lozano I., Villareal N. and Arroyave J. 2008. Identification of Three Strains of a Virus Associated with Cassava

- Plants Affected by Frogskin Disease. Journal of Phytopathology 156: 647-653.
- 13- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 14- Kumar S., Tamura K. and Nei M.M. 1994. Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. Computer Applied Biosciences 10: 189-191.
- 15- Cuervo M. 2006. Caracterización molecular de algunos aislamientos del virus del cuervo de sapo de la yuca recolectados en diferentes zonas de Colombia. Tesis Doctorado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. 83pp.

Identificación y caracterización de *Cassava common mosaic virus* en cultivos de mandioca en Argentina

Andrea Zanini¹, Patricia Rodríguez Pardina¹, Andrés Luque² y Liliana Di Feo¹

1- Instituto de Patología Vegetal (IPAVE) CIAP- INTA. 2- Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV) CIAP- INTA. Córdoba.

Correo-e: ldifeoar@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

La mandioca (*Manihot esculenta*), cuyo centro de origen genético se encuentra en la cuenca amazónica (1), adquiere particular importancia en regiones tropicales y subtropicales del mundo, que van desde el nivel del mar hasta los 1800 m.s.n.m. En la actualidad, es el cuarto cultivo alimenticio en importancia luego del arroz, trigo y maíz (2), y un componente básico en la dieta de más de 1000 millones de personas.

Se destaca por su singular versatilidad de aplicaciones, debido a la explotación comercial de todas sus partes. El principal producto son sus raíces, proveedoras de energía y nutrientes tanto para animales como para humanos, las cuales constituyen la segunda fuente de almidón, luego del maíz (2). Según sus usos principales, las raíces tuberosas pueden dirigirse a cuatro sectores del mercado: frescas o procesadas para consumo humano; procesadas para producir harina seca; como materia prima en la industria productora de alimentos balanceados para

animales, y como producto intermedio para fines no alimenticios (industria farmacéutica, de adhesivos, química, textil y papelería) (1). Otros órganos importantes de la planta son los tallos, que proveen estacas para la propagación comercial del cultivo, y las hojas que constituyen una excelente fuente de proteínas, minerales y vitaminas, lo que permite su inclusión en la alimentación humana y en la dieta de animales (2).

En agricultura, la mandioca es manejada como un cultivo anual; sin embargo, el hecho de que sea perenne le confiere cierta rusticidad pues, al no tener un período fenológico vulnerable, es resistente a condiciones adversas, principalmente estrés hídrico (2). La ventaja comparativa con otros cultivos más rentables es su capacidad para crecer en suelos ácidos, de escasa fertilidad, con precipitaciones esporádicas o largos períodos de sequía (3).

En nuestro país, el cultivo de mandioca está localizado en la región noreste, donde la provincia de Misiones posee la mayor superficie cultivada (aproximadamente 25.000 ha)