



DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN POR ELISA Y RT-PCR DE CASSAVA COMMON MOSAIC DISEASE Y DEL AGENTE CAUSAL *Cassava common mosaic virus* (Genus: *Potexvirus*) EN CULTIVOS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*) DE LA REGIÓN DEL NORDESTE ARGENTINO (NEA)

Zanini, A.^{1,2}; Jiménez Polo, J.³; Celli, M. G.^{1,2}; Medina, R.⁴; Cuellar, W.³ y Di Feo, L.^{1,2}

¹Instituto de Patología Vegetal (IPAVE), CIAP-INTA ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) ³Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia ⁴IBONE (UNNE-CONICET), FCA-UNNE. Corrientes, Argentina.

Resumen

La mandioca, de origen americano, es el cuarto cultivo alimenticio en el mundo y posee gran importancia para la seguridad alimentaria, y potencialidad de uso industrial en provincias del NEA. Su propagación vegetativa permite mantener genotipos de alto valor agronómico; sin embargo favorece la transmisión de patógenos virales de una generación a otra de cultivo, con los consiguientes daños en la producción. Recientemente, en nuestro país, se confirmó la asociación de CsCMV con alta incidencia de síntomas de la enfermedad conocida como Cassava Common Mosaic Disease (CCMD) en la región NEA. En este estudio, se informa sobre la incidencia de este virus, el primero citado en Argentina, agente causal de CCMD en cuatro provincias productoras, correspondientes a la mencionada región. Estas investigaciones confirman la amplia distribución de CsCMV y además constituyen un avance en el monitoreo, prevención y/o manejo de la enfermedad CCMD.

Palabras clave: mosaico común, serología, diagnóstico molecular, *Cassava*, Argentina

Introducción

La mandioca, euforbiácea de origen americano, es el cuarto cultivo alimenticio en importancia luego del arroz, trigo y maíz (Ceballos y Hershey, 2012). Es cultivada principalmente por pequeños productores de bajos recursos, por sus raíces tuberosas amiláceas, empleadas en alimentación humana y animal y en industria. El cultivo, en nuestro país, está localizado en el Nordeste, donde la provincia de Misiones posee la mayor superficie cultivada (alrededor de 25.000 ha) y también la más relevante actividad industrial instalada. Le siguen Corrientes y Formosa, con 1.880 y 1.625 ha, respectivamente, utilizadas para el autoconsumo y, eventualmente, para renta. Por su parte, Chaco destina 1.000 ha a este cultivo, empleado principalmente para autoconsumo, y unos pocos productores lo realizan como actividad rentable.

Por ser una especie que comercialmente se propaga de manera agámica (estacas de tallo) es afectada por patógenos sistémicos, entre los que merecen especial atención los virus, ya que tienden a acumularse en sucesivos ciclos de cultivo, con significativas consecuencias en los rendimientos y en la calidad de raíces tuberosas. Diversos patógenos virales han sido reportados infectando mandioca (Legg *et al.*, 2015). En Argentina, hemos reportado alta frecuencia de CsCMV en plantas enfermas con CCMD (Di Feo *et al.*, 2015). En este reporte, confirmamos la alta incidencia del mismo y ampliamos el análisis en todas las provincias del NEA afectadas con la enfermedad.

Materiales y Métodos

Fuente de inóculo. Se colectaron aleatoriamente, plantas de mandioca de diferentes lotes de cultivo de las provincias de Misiones, Formosa, Corrientes y Chaco, durante los años 2014 a 2015. Para las pruebas de detección, se tomaron muestras foliares de todas las estacas colectadas, las cuales fueron mantenidas en invernadero en condiciones controladas de temperatura y humedad. Las mismas exhibieron síntomas de mosaico con diferente grado de intensidad.

Purificación viral. Para la misma se partió de hojas de *N. benthamiana* cosechadas 25-30 días después de la inoculación mecánica con extracto de hojas de un clon de mandioca fehacientemente infectado con CsCMV. Al final del proceso, se obtuvieron cuatro bandas en un gradiente continuo de sacarosa las que, luego de extraídas, se ultracentrifugaron. Los



pellets fueron resuspendidos en tampón fosfato de sodio 0,01 M y se determinó la absorbancia entre 260 y 330 nm, para calcular pureza y concentración viral y, además, se realizaron observaciones de cada banda al microscopio electrónico.

Serología. A los fines de obtener un antisuero policlonal para CsCMV, se inyectó el virus purificado emulsionado con adyuvante completo de Freund en una coneja *New Zealand* (aplicaciones intradérmicas múltiples) del virus purificado. A los 28 días, la segunda inyección (virus purificado + adyuvante incompleto de Freund) se aplicó vía intramuscular. Se efectuaron tres sangrías a los 20 días de la primera y a los 14 y 22 desde la segunda inyección, respectivamente.

Para el diagnóstico serológico, se empleó la técnica de DAS-ELISA. El antígeno fue macerado en tampón extracción, en relación 1/100 (p/v).

Las lecturas de 405nm (A_{405}) se registraron mediante un espectrofotómetro vertical (*Dynatech Laboratories*, Modelo MRX), a partir de los 15 min de puesto el sustrato y a intervalos de 15 min. Para el análisis, se consideró el tiempo de incubación en sustrato en el cual fue máxima la diferencia entre la lectura de A_{405} de los testigos sanos y enfermo. Los resultados se analizaron teniendo en cuenta el punto crítico, calculado a partir de seis plantas libres de CsCMV provenientes de un clon de mandioca saneado, a través de cultivo *in vitro* de meristemas caulinares.

Pruebas moleculares. Para realizar la detección por RT-PCR se extrajo ARN del material vegetal con el método CTAB modificado para hojas de mandioca (Carvajal-Yepes *et al.*, 2014) y la síntesis del ADN complementario se realizó con cebadores hexámeros que hibridan al azar (Invitrogen, *Life technologies*) y con la enzima de retro-transcripción M-MLV (Promega Corporation).

El CsCMV se detectó empleando cebadores universales para potexvirus siguiendo la descripción de Di Feo *et al.* (2015). Para confirmar los resultados de ELISA y RT-PCR, algunos de los productos de PCR fueron secuenciados.

Para la clonación, se empleó el vector pGEM®-T Easy, siguiendo las especificaciones del fabricante (Promega Corporation, Madison, USA). Las secuencias de nucleótidos deducidos fueron comparadas con las de otros virus previamente caracterizados, que están disponibles en Genbank *National Center of Biotechnology Information*, empleando el programa BLASTN y BLASTX (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Resultados

Purificación viral. Las determinaciones espectrofotométricas (A_{260} y A_{280}) y las observaciones al microscopio electrónico de las bandas obtenidas, permitieron concluir que la inferior exhibió alta concentración de viriones no agregados y adecuada pureza, por lo que se la escogió para producir el antisuero.

Diagnóstico serológico. De un total de 109 muestras procedentes de Formosa y 119, de Misiones, 92,7% y 70,6% estuvieron infectadas con CsCMV (Tabla 1). Por otra parte, en Corrientes se determinó que, de siete plantas recolectadas, sólo una resultó negativa para CsCMV. En Chaco, las 10 plantas evaluadas resultaron positivas para el virus.

Tabla 1. Muestras de Formosa y Misiones, analizadas por DAS-ELISA con CsCMV_{as}

FORMOSA			MISIONES		
Lotes	Número de plantas muestreadas	Número de plantas infectadas	Lotes	Número de plantas muestreadas	Número de plantas infectadas
1	19	11	1	11	11
2	16	16	2	16	13
3	17	17	4	1	1
4	14	14	5	10	2
5	8	8	7	6	4
6	9	9	8	3	1
7	14	14	9	5	4
8	2	2	10	3	2
9	10	10	11	5	3
-	-	-	12	26	10
-	-	-	13	33	33
Total	109	101 (92,7%)	Total	119	84 (70,6%)



Validación por RT-PCR y secuenciación de los resultados. De un total de 45 plantas probadas por RT-PCR, el 75,6% se encontraba infectado con CsCMV, todas ellas con síntomas de mosaico foliar de distinta intensidad. Los resultados obtenidos coincidieron en un 100% con los de DAS-ELISA, tanto en los positivos como negativos.

Fueron seleccionados 10 productos de PCR con cebadores universales para potexvirus, que se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc (Korea).

Los resultados de la secuenciación por BLASTN, confirmaron las secuencias de los productos amplificados por PCR. En la tabla 2, se muestra el porcentaje de identidad que presentan comparadas con la secuencia que mostró mayor similitud, pre-existente en el GenBank, lo que nos permite confirmar la identidad del CsCMV amplificado por PCR.

Tabla 2. Similitud en nucleótidos (nt) y aminoácidos (aa), respectivamente, con la secuencia *Cassava common mosaic virus* aislado Parana (Genbank JF913280.1) con los clones secuenciados

Clon	Similaridad (%)
	nt/aa
1A	94/99
2A	93/99
3A	94/99
5A	90/99
6A	88/98
7A	89/99
8A	89/99
9A	89/99
10A	92/98
11A	90/99

Discusión

De las distintas enfermedades que afectan al cultivo de mandioca, sólo algunas tienen probada etiología viral. Las más importantes, por su alta incidencia y severidad de los síntomas, son causadas por *Cassava mosaic virus* (Genus *Begomovirus*) y *Cassava brown streak virus* (Genus *Ipomovirus*), en África (Legg *et al.*, 2015). En las Américas, *Cassava common mosaic virus* es el agente causal de CCMD (Calvert *et al.*, 2012). CsCMV y CCMD han sido oficialmente reportados en México (Elliot y Zettler, 1986), Venezuela (Chaparro-Martínez y Trujillo-Pinto, 2003), Colombia, Brasil y Paraguay (Calvert *et al.*, 2012) y recientemente en Argentina (Di Feo *et al.*, 2015).

La propagación vegetativa de la mandioca, a través de ramas procedentes de unas pocas plantas madres, favorece la distribución inadvertida de patógenos sistémicos, resultando en una alta incidencia de algunos de ellos, como el CsCMV. Además, este virus es fácilmente transmisible a través de herramientas (Calvert *et al.*, 2012). El intercambio de material de propagación entre provincias y su ingreso desde países limítrofes como Brasil y Paraguay, aumenta la posibilidad de diseminación de éste y de otros virus.

La alta frecuencia de CsCMV y de la enfermedad por él causada, en las provincias del NEA sugiere que el manejo de material de propagación resulta inapropiado, pues facilita su diseminación.

La alta similitud de las secuencias obtenidas en este trabajo, con el aislado de Parana (Brasil) disponible en GenBank, podría estar relacionado con un posible ingreso de estacas para plantación desde el país limítrofe.

Al comparar los resultados de RT-PCR y ELISA, se deduce que la prueba serológica es un método eficiente y sensible en la detección de CsCMV, dada la inexistencia de falsos positivos/negativos en el indexado del material. El antisuero de producción local es altamente sensible y específico.

La observación de gran variabilidad de síntomas foliares y los diferentes porcentajes de plantas infectadas con CsCMV en las distintas provincias del NEA, podrían estar indicando presencia de otros agentes patogénicos reportados en mandioca (Carvajal-Yepes *et*



al., 2014) cuya interacción con CsCMV produciría un efecto de acumulación de este virus en la planta.

Conclusión

La profundización en las investigaciones permitirá indagar sobre la naturaleza de las patologías virales y establecer medidas de manejo integrado adecuadas, que se complementarán con la producción y distribución de propágulos de sanidad controlada, obtenidos por cultivo *in vitro* de meristemas combinado con termoterapia. Se deben extender estos métodos a otros virus reportados en la región y, sobre todo, investigar cambios en la incidencia de los mismos (incluyendo plantas hospederas intermediarias). El uso de herramientas bioinformáticas brindará más información acerca de la epidemiología de distintas cepas de estos virus y las posibles fuentes de infección. Hasta tanto esto pueda implementarse, se recomienda, en lo posible, iniciar los cultivos con material propio de propagación, a los fines de evitar la introducción y dispersión de patógenos virales no presentes en el lote de producción, ya que, de acuerdo a nuestros estudios y a observaciones *in situ*, las virosis de mandioca poseen alta prevalencia e incidencia en todas las provincias productoras del NEA.

Referencias

- CALVERT, L.A., et al. Identification of three strains of a virus associated with cassava plants affected by frogskindisease. **Journal of Phytopathology**, v.156, p. 647–653, 2008
- CALVERT, L.A., CUERVO, M., LOZANO, I. Cassava viral disease in South America. In: Ospina, B., Ceballos, H. (Eds.), Cassava in the Third Millennium: Modern production, Processing, Use and Marketing Systems. **CIAT**, Cali, Colombia, p.309–318, 2012
- CARVAJAL-YEPES, MÓNICA, et al. Unraveling complex viral infections in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) from Colombia. **Virus research**, v. 186, p. 76-86, 2014
- CEBALLOS H., HERSHEY C. XXXV Congreso Argentino de Horticultura, La mandioca: un cultivo americano que conquistó el mundo, **ASAHO**, Corrientes, Arg. p. 156-161, 2012
- CHAPARRO-MARTÍNEZ E.I., TRUJILLO-PINTO G. Enfermedades virales en el cultivo de yuca en algunos estados de Venezuela. **Revista Facultad de Agronomía** v.20, p. 461-467, 2003
- DI FEO L., ZANINI A., RODRIGUEZ PARDINA P., CUERVO M., CARVAJAL-YEPES M., CUELLAR W. First report of *Cassava common mosaic virus* and Cassava frogskin-associated virus infecting cassava in Argentina. **Plant Disease** v. 99, n. 5, p.733, 2015
- ELLIOT M.S., ZETTLER F.W. Cassava common mosaic virus infections of chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) in Yucatán, Mexico. **Plant Disease** v.71, p. 353-356, 1986
- LEGG, J. P. et al. Chapter Four-Cassava Virus Diseases: Biology, Epidemiology, and Management. **Advances in virus research**, v. 91, p. 85-142. 2015
- VERBEEK, M., TANG, J., WARD, L.I. Two generic PCR primers sets for the detection of members of the genus Torradovirus. **Journal of Virological Methods**, v. 185, p. 184–188, 2012