

**Caracterización de la raza *Sweet potato feathery mottle virus* que  
afecta a *Ipomoea batatas* (L.) Lam. en Argentina y establecimiento de  
un método rápido de diagnóstico en plantas *in vitro*.**

*Tesis presentada para optar al título de Magister Scientiae de la Facultad de  
Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata.*

**Autora: Paola Analía Faroni**



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES**



**UNIVERSIDAD DE LA PLATA**

**DIRECTORA: Dra (Ing. Agr.) Liliana del Valle Di Feo.** Doctora en Ciencias Agropecuarias. Investigadora del área de Virología del Instituto de Patología Vegetal. Profesora Titular de Mejoramiento Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica de Córdoba. Profesional Superior del CONICET

**JURADOS:**

**Dra (Ing. Agr.) Graciela Ana María Truol** Doctora en Ciencias Biológicas. Investigadora del INTA. Estudios postdoctorales en EMBRAPA CENARGEN (Centro de Recursos Genéticos y Biotecnológicos) Brasilia, Brasil. Docente de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica de Córdoba. Coordinadora de PPR y de la Red Nacional de Protección Vegetal.

**Dra. Marano Maria Rosa** Doctora en Ciencias Biológicas. Responsable del área Virología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario. Investigadora independiente del CONICET.

**Dr. Asurmendi Sebastián,** Doctorado en Ciencias Biológicas. Post doctoral en mecanismos de resistencia viral de amplio espectro mediada por Capside viral. Investigador del INTA.

**Fecha de defensa de tesis: 18 de Agosto de 2017**

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, *Alfredo y Nicolasa*, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación, siendo un modelo a seguir y destacar.

Con mucho amor se lo dedico a mi compañero de vida *Leonardo*, quien brindó gran comprensión, paciencia y tesón, mi apoyo en todo momento.

A mis amados hijos, *Valentino y Benicio*, quienes son mi fuente de motivación e inspiración para superarme día a día y ser su mejor ejemplo.

También a mi Directora *Liliana*, amigos y compañeros, quienes compartieron conocimiento, alegrías y tristezas, y contribuyeron para lograr la realización de este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Con profundo amor y cariño para mis padres, **Alfredo y Nicolasa**, que hicieron todo en la vida para que pudiera lograr mis estudios, por motivarme, acompañarme y siempre con palabras de aliento y consejos que acarician el alma. A ustedes por siempre en mi corazón.

A **Leonardo**, que esta a mi lado, siempre brindando cariño, fuerza, apoyo, comprensión y un amor incondicional para seguir adelante. Y que juntos tenemos dos soles amados, **Valentino y Benicio**.

A mi eterna amiga del alma y compañera de la vida, **Carla**, mi hermana.

A Liliana Di Feo, un profundo agradecimiento, quien ha sido incondicional, por orientarme y ayudarme a realizar este estudio, de quien siempre recibí no solo las mejores enseñanzas académicas y técnicas, sino que también valiosos consejos para el desarrollo de mi vida profesional dedicándose con mucha vocación y esmero.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que con su generosa ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a Dra Natalia Almasia, Dra Mariana Puntel y Dra Paula Faccio.

A las amigas que la carrera me regaló, por todos los años compartidos, las horas de estudio y sus sabios consejos.

Merecen un especial agradecimiento el Dr. Andrés Luque, Andrea Zanini y Ramón Suasnabar, por sus colaboraciones que han contribuido en este trabajo. Finalmente quisiera también agradecer al INTA, ya que ha financiado mi estudio y carrera de maestría.

**Con mucho cariño gracias!!!**

## INDICE GENERAL

### INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### ABREVIATURAS

### RESUMEN Y PALABRAS CLAVES

<b>1. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Generalidades del cultivo de batata.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Enfermedades del cultivo de batata.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Las virosis en Argentina.....</b>	<b>5</b>
<b>1.4. Sweet Potato Feathery Mottle Virus.....</b>	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1. Objetivos generales.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>13</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>14</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
<b>4.1. Fuente de inóculo.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2. Caracterización biológica del SPFMV. Pruebas de transmisión.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2.1. Transmisión por injerto.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2.2. Transmisión mecánica y rango de hospedantes.....</b>	<b>15</b>
<b>4.3. Separación del SPFMV involucrado en la nueva virosis, en caso de infecciones mixtas.....</b>	<b>16</b>
<b>4.4. Caracterización serológica de los agentes etiológicos.....</b>	<b>17</b>
<b>4.4.1. DAS- ELISA (<i>Double Antibody Sandwich</i>).....</b>	<b>17</b>
<b>4.5. Obtención de un antisuero contra la raza local del SPFMV.....</b>	<b>19</b>
<b>4.5.1. Purificación de SPFMV a partir de <i>Ipomoea setosa</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>4.5.2. Preparación para microscopia electrónica.....</b>	<b>21</b>
<b>4.5.3. Obtención del antisuero para SPFMV.....</b>	<b>21</b>

4.5.4. Titulación del antisuero para NCM-ELISA ( <i>Nitrocellulose membrane</i> ).....	23
4.6. Caracterización molecular del SPFMV raza local.....	23
4.6.1. Transcripción reversa- reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)....	23
4.6.1.1. Extracción de ARN por medio de columnas comerciales.....	23
4.6.1.2. Reacción de amplificación por PCR.....	24
4.6.1.3. Purificación de la agarosa de las secuencias amplificadas por PCR.....	25
4.6.2. Clonado y secuenciación.....	25
4.6.2.1. Ligación con el vector pGEM®-T easy de las secuencias obtenidas por PCR.....	25
4.6.2.2. Transformación de bacterias <i>E.coli</i> con el vector recombinante.....	25
4.6.2.2.1. Preparación de bacterias <i>E. coli</i> competentes.....	25
4.6.2.2.2. Transformación de bacterias <i>E. coli</i> competentes.....	26
4.6.2.3. Aislamiento de ADN plasmídico (minipreparación).....	26
4.6.2.3.1. Minipreparación casera.....	26
4.6.2.3.2. Digestión con endonucleasas de restricción.....	27
4.6.2.3.3. ADN para enviar a secuenciar.....	27
4.6.3. Preparación de la sonda de hibridación molecular. Prueba <i>Dot blot</i> .....	28
4.6.3.1. Marcado con Digoxigenina ( <i>Dig Dna Labelling And Detection Kit, Roche</i> ).28	
4.6.3.2. Evaluación del rendimiento del material marcado.....	28
4.6.3.3. Prueba de la sonda de hibridación. Prueba <i>Dot blot</i> .....	28
4.6.4. Preparación de la sonda de hibridación molecular. Prueba <i>Southern blot</i> ....	29
4.6.4.1. Digestión con las endonucleasas de restricción <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> y <i>SacI</i> .....	29
4.6.4.2. Marcado con Digoxigenina ( <i>Dig Dna Labelling And Detection Kit, Roche</i> ).30	
4.6.4.3 Hibridación molecular: Prueba <i>Southern blot</i> .....	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1. Caracterización biológica del SPFMV. Pruebas de transmisión.....	31
5.1.1. Transmisión por injerto.....	31
5.1.2. Transmisión mecánica y rango de hospedante.....	31

5.2. Separación del SPFMV involucrado en la nueva virosis, en caso de infecciones mixtas.....	33
5.3. Caracterización serológica de los agentes etiológicos.....	39
5.3.1. DAS- ELISA ( <i>Double Antibody Sandwich</i> ).....	39
5.4. Obtención de un antisuero contra la raza local del SPFMV.....	41
5.4.1. Purificación de SPFMV a partir de <i>Ipomoea setosa</i> .....	41
5.4.2. Observación de preparados en microscopia electrónica y lectura en nanodrop.....	42
5.4.3. Obtención del antisuero para SPFMV. Pruebas de titulación por NCM-ELISA ( <i>Nitrocellulose membrane Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> ).....	44
5.5. Caracterización molecular del SPFMV raza local.....	46
5.5.1. Reacción de amplificación por PCR.....	46
5.5.2. Clonado y secuenciación.....	48
5.5.2.1. Ligación con el vector pGEM®-T easy y transformación de bacterias <i>E. coli</i> competentes.....	48
5.5.2.2. Análisis de secuencias.....	49
5.5.3. Preparación de la sonda de hibridación molecular. Prueba <i>Dot blot</i> .....	50
5.5.3.1. Hibridación molecular: Prueba <i>Dot blot</i> .....	51
5.5.4. Preparación de la sonda de hibridación molecular. Prueba <i>Southern blot</i> ...51	
5.5.4.1. Hibridación molecular: Prueba <i>Southern blot</i> .....	53
6. DISCUSIÓN.....	55
7. CONCLUSIONES GENERALES.....	57
8. BIBLIOGRAFÍA.....	58
ANEXO.....	69

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Virus reconocidos y no reconocidos por la ICTV en el cultivo de batata.....	4
Tabla 2: Valores de DAS ELISA (a los 60 minutos de colocado el sustrato) empleando antisuero para SPFMV. Se resalta en amarillo, las combinaciones de diluciones de IgG y conjugado enzimático a las cuales las diferencias entre controles sanos y enfermos fueron mayores. EA: “encrespamiento amarillo”.....	39
Tabla 3: Valores de DAS ELISA (a los 60 minutos de colocado el sustrato) empleando antisuero para EC. Se resalta en amarillo, las combinaciones de diluciones de IgG y conjugado enzimático a las cuales las diferencias entre controles sanos y enfermos fueron mayores.....	39
Tabla 4: Valores de DAS ELISA (a los 120 minutos de colocado el sustrato) empleando distintos antisueros (R1: IgG del conejo R1 1º sangría con 1,88mg/ml, R2: IgG del conejo R1 1º sangría diluido a 1,32 mg/ml, T1: IgG del conejo T1 1º sangría con 2,3mg/ml, T2: IgG del conejo T1 1º sangría diluido a 1,5mg/ml y FMV: IgG del conejo FM) y combinando los distintos conjugados enzimáticos correspondientes. Se resalta en amarillo, las combinaciones de diluciones de IgG y conjugado enzimático a las cuales las diferencias entre controles sanos y enfermos fueron mayores.....	40
Tabla 5: Valores de DAS ELISA (a los 120 minutos de colocado el sustrato) empleando distintos antisueros (R1: IgG del conejo R1 1º sangría con 1,88mg/ml, R2: IgG del conejo R1 1º sangría diluido a 1,32 mg/ml, T1: IgG del conejo T1 1º sangría con 2,3mg/ml, T2: IgG del conejo T1 1º sangría diluido a 1,5mg/ml y FMV: IgG del conejo FM) y combinando los distintos conjugados enzimáticos correspondientes. Se resalta en amarillo, las combinaciones de diluciones de IgG y conjugado enzimático a las cuales las diferencias entre controles sanos y enfermos fueron mayores.....	41

Tabla 6: Resumen de los valores obtenidos de las lecturas de nanodrop para las tres bandas obtenidas en la purificación. Y cálculos de concentración y pureza viral.....	44
Tabla 7: Resumen de las homologías de los clones secuenciados contrastados utilizando el programa <i>Blast</i> del <i>NCBI</i> ( <a href="http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> ).....	50
Figura 1: Síntomas típicos de la enfermedad “batata crespa” del cv Criolla Amarilla. Se observan mosaico, ampollado, engrosamiento de nervaduras y deformación de hojas.....	6
Figura 2: Plantación de batata cv. Morada INTA afectadas por la enfermedad “enanismo clorótico”, caracterizada por presencia de manchones cloróticos y achaparrados en el cultivo.....	7
Figura 3: (A) Vista bajo el microscopio electrónico de transmisión partículas filamentosas flexuosas. Inclusiones cilíndricas, característica de las infecciones de <i>potivirus</i> y (B) Morfología de la partícula viral.....	10
Figura 4: Fuente de inóculo, cv Arapey en campos de Colonia Caroya (Córdoba) Enero 2009.....	15
Figura 5: <i>One probe</i> a partir de batata cv. Arapey INIA (fuente de inóculo). Ejemplar de <i>M. persicae</i> “picando” una hoja de <i>I. setosa</i> .....	17
Figura 6: Representación de la placa de prueba de calibración. Muestras: 1) <i>I.setosa</i> sana y 2) Batata sana (controles negativos), 3) Morado INTA con enanismo clorótico (EC), 4) Arapey INIA con EC y 5: Morado INTA con EC severo (controles positivos) (flechas: solo tampón).....	18
Figura 7: Representación de la placa 1. Muestras: 1) <i>I.setosa</i> sana, 2) <i>I. setosa</i> con <i>feathery mottle virus</i> (FMV), 3) Arapey sana, 4) Arapey con EC, 5) Okinawa sana y 6) Okinawa con <i>virus G</i> (VG) + <i>chlorotic stunt virus</i> (CSV).....	19
Figura 8: Representación de la placa 2. Muestras: 1) <i>I.setosa</i> sana, 2) <i>I. setosa</i> con FMV, 3) Arapey sana, 4) Artico con EC, 5) Okinawa sana y 6) Okinawa con VG+CSV.....	19
Figura 9: <i>Pellet</i> obtenido luego de la concentración en colchón sacarosa 25%.....	20

Figura 10: Representación del gradiente discontinuo de CICs.....	20
Figura 11: Primera inoculación viral, mediante vía intradérmica múltiple sobre el lomo.....	22
Figura 12: (A) desinfección de la zona del corte con xilol y (B) recolección de la sangre en un tubo.....	22
Figura 13: Representación ilustrativa de células competentes de <i>E. coli</i> transformadas (color blanco) y no transformadas (color azul).....	26
Figura 14: (A) Plantas de <i>Ipomoea setosa</i> injertadas con púas de batata cv Arapey INIA enferma (fuente de inóculo). (B) y (C) Síntoma de “cordón de zapato”.....	31
Figura 15: <i>Ipomoea nil</i> inoculada mecánicamente con Arapey INIA enferma. Síntomas de engrosamiento y aclaramiento de venas, curvado de la hoja hacia abajo, mosaico y anillos suaves.....	32
Figura 16: <i>Ipomoea setosa</i> inoculada mecánicamente con Arapey INIA enferma. Síntomas de mosaico suave y aclaramiento de nervadura.....	32
Figura 17: Las cuatro plantas de <i>I. setosa</i> inoculadas a través de pulgón desde Arapey INIA enferma con síntomas a partir de los 10 días.....	33
Figura 18: <i>I. setosa</i> <b>planta 3</b> , síntomas típicos de SPFMV en 5°, 6° y 7° hoja (moteado plumoso, aclaramiento de venas y punteado clorótico).....	34
Figura 19: Plantas a los 24 días desde inoculación con remisión de síntomas, a partir de la novena hoja verdadera.....	35
Figura 20: NCM-ELISA contra SPFMVas, SPMSVas y SPVGas. Muestras 1) y 2) Planta asintomática de <i>I. setosa</i> inoculada con pulgón desde batata Okinawa 100, 3), 4), 5), 6) y 7) Plantas sintomáticas de <i>I. setosa</i> inoculadas con pulgón desde batata Arapey INIA enferma, 8) batata Okinawa 100 asintomática 9) batata enferma con SPMSV de Chaco, 10) batata Arapey INIA positiva para SPFMV, 11) Planta sana de batata Arapey INIA.....	36

Figura 21: Partículas de SPFMV a través de inmunoelectromicroscopía con decoración en <i>I. setosa</i> <b>planta 1</b> inoculada a través de <i>Myzus persicae</i> (one probe) desde Arapey INIA enferma.....	37
Figura 22: Partículas de SPFMV a través de inmunoelectromicroscopía con decoración en <i>I. setosa</i> <b>planta 2</b> inoculada a través de <i>Myzus persicae</i> (one probe) desde Arapey INIA enferma.....	37
Figura 23: Partículas de SPFMV a través de inmunoelectromicroscopía con decoración en <i>I. setosa</i> <b>planta 3</b> inoculada a través de <i>Myzus persicae</i> (one probe) desde Arapey INIA enferma.....	38
Figura 24: Partículas de SPFMV a través de inmunoelectromicroscopía con decoración en <i>I. setosa</i> <b>planta 4</b> inoculada a través de <i>Myzus persicae</i> (one probe) desde Arapey INIA enferma.....	38
Figura 25: Bandas producidas luego de la ultracentrifugación del gradiente de CICs...	41
Figura 26: Tinción negativa de partículas con acetato de uranilo 2%, durante la purificación, decoradas con SPFMVas (1:100) A) muestra 1: fase acuosa, y B) la muestra 3: resuspensión pellet.....	42
Figura 27: Tinción negativa de partículas con acetato de uranilo 2%, decoradas con SPFMVas (1:100). A) banda <b>inferior</b> , B) banda <b>superior</b> y C) banda <b>intermedia</b> . Flecha roja: partícula muy decorada; flecha amarilla: partícula poco decorada.....	42
Figura 28: Lecturas en nanodrop de las tres bandas ( <b>función uv/vis</b> ).....	43
Figura 29: Titulaciones en NCM ELISA del antisuero obtenido luego de la primer sangría del conejo T1 y R1. A) <i>I. setosa</i> con SPFMV, B) batata Arapey con SPFMV, C) <i>I. setosa</i> sana y D) batata Arapey INIA sana, contra 12 diluciones seriada distintas (1)1/1.000, 2)1/3.000, 3)1/6.000, 4)1/12.000, 5)1/24.000, 6)1/48.000, 7)1/96.000, 8)1/192.000, 9)1/384.000, 10)1/768.000, 11)1/1.536.000 y 12)1/3.072.000).....	45
Figura 30: Titulaciones en NCM ELISA del antisuero obtenido luego de la segunda sangría del conejo T1 y R1. A) batata Arapey con SPFMV, B) Okinawa 100 con SPVG, C) <i>I. setosa</i> inoculada con Arapey INIA con SPFMV, D) <i>I. setosa</i> inoculada con Okinawa 100 con SPVG, E) y F) batata Arapey INIA sana, G) y H) <i>I. setosa</i> sana contra 12 diluciones seriada distintas (1)1/6.000, 2)1/12.000, 3)1/24.000, 4)1/48.000,	

5)1/96.000, 6)1/192.000, 7)1/384.000, 8)1/768.000, 9)1/1.536.000, 10)1/3.072.000,  
 11)1/6.144.000 y  
 12)1/12.288.000)..... 46

Figura 31: Esquema del fragmento amplificado de 1800 pb (correspondiente a la región 3' Terminal, que incluye parte del gen NIb, la cápside proteica completa y la región 3' no codificante de los Potyvirus). Figura adaptada del esquema de la página de Expsy ([http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/50.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/50.html)) no realizada a escala. Es un genoma monopartito, linear, ssRNA (+) de 10 kb. En el extremo 3' posee una cola de poly (A) y en el 5' una proteína (genome-linked protein=VPg).....47

Figura 32: Patrón de electroforesis en gel de agarosa 1% de los fragmentos amplificados por PCR. *ladder*: marcador, HA1: hoja apical 1 de *I. setosa* inoculada con SPFMV, HA2: hoja apical 2 de *I. setosa* inoculada con SPFMV, HB1: hoja basal 1 de *I. setosa* inoculada con SPFMV, HB2: hoja basal 2 de *I. setosa* inoculada con SPFMV, C(+): control positivo PVY y C(-): control negativo *mix* de PCR sin ADNc..... 48

Figura 33: Foto ilustrativa de células transformadas (color blanco) y no transformadas (color azul)  
 Fuente:<http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1&note=4>..... 49

Figura 34: Patrón de electroforesis en gel de agarosa 1% de los posibles fragmentos de ADN viral clonados en el vector comercial pGEM®-T easy. *ladder*: marcador, 1 a 10: clones muestras. En círculo verde: clones seleccionados que se secuenciaron..... 49

Figura 35: Membrana de *nylon* para la estimación de la eficiencia de marcado del ADNc. A) Plásmido sin marcar (control negativo); B) ADNc marcado y C) ADN marcado (control positivo)..... 50

Figura 36: Membranas de *nylon* de la prueba de hibridación con ADNc marcado con digoxigenina. A) Plásmido sin marcar (control positivo); B) ARN Arapey sana, C) ARN Arapey enferma con EA y D) ARN Arapey enferma con SPVC (control positivo). P: puro. Diluciones 1)1/10 2)1/100 3)1/1.000 4)1/5.000 5)1/10.000 6)1/20.000. Diluciones de sonda marcada (1) 1.25 ng/ml (2) 2.5 ng/ml (3) 5 ng/ml (4) 10 ng/ml (5) 15 ng/ml (6) 20 ng/ml..... 51

Figura 37: Patrón de electroforesis en gel de agarosa 2% “Gel exploratorio”. *Ladder*: marcador, 1)Plásmido sin digerir, 2)Plásmido digerido con BE<sub>1</sub>, 3) Plásmido digerido con BE<sub>2</sub>, 4)Plásmido digerido con SE<sub>1</sub> y 5)Plásmido digerido con SE<sub>2</sub>..... 52

Figura 38: **A)** Patrón de electroforesis en gel de agarosa 2% “Gel preparativo”. *Ladder*: marcador, 1)Plásmido digerido con BE y 2)Plásmido digerido con SE. **B)** El mismo gel visto en luz UV donde se escindió las bandas a extraer el ADN.....52

Figura 39: Patrón de electroforesis en gel de agarosa 1% de las extracciones del gel preparativo. 1) Banda 250pb, 2) Banda 750pb.....53

Figura 40: **A)** Patrón de electroforesis en gel de agarosa 1% de las muestras extraídas con Trizol. 1) Batata enferma con “encrespamiento amarillo” (contiene al SPVC), 2) *I. setosa* enferma con SPFMV, 3) Batata enferma con SPFMV, 4) Batata enferma sin diagnóstico, C(-): planta de batata sana, C(+): Plásmido y *Ladder*: marcador. **B)** membrana de hibridación.....54

## ABREVIATURAS

°C: grado Celsius

µg: microgramo

µl: microlitro

3' UTR: *Three prime untranslated region*

5' UTR: *Five prime untranslated region*

A<sub>405</sub>: absorvancia a 405 nm de longitud de onda

ADN: Acido desoxirubonucleico

ARN: Acido ribonucleico

ADN<sub>C</sub>: ADN complementario

CICs: cloruro de cesio

CP: Proteína de Cubierta

cv: cultivar

DAS-ELISA: *Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

dNTPs: deoxyribonucleotide triphosphate

DO<sub>600</sub>: densidad óptica a 600 nm de longitud de onda

DTT: ditioneitol

dTTP: deoxyribonucleotide triphosphate

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

Fig.: figura

g: gramo

h: horas

HCl: Ácido clorhídrico

IgG: inmunoglobulina

ISEM + D: Inmuno-electromicroscopía con decoración

kb: kilo base

KCl: Cloruro de potasio

l: litro

LB: Luria Broth

M: molar

mg: miligramo

MgCl: Cloruro de Magnesio

min: minutos

ml: mililitro

mm: milimetro

mM: milimolar

NCM-ELISA: *NitroCellulose Membranes - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

ng: nanogramo

nm: nanometro

P/V: relación peso volumen

pb: pares bases  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
PNPP: paranitro fenilfosfato  
PTG: isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido  
rpm: revoluciones por minuto  
SDS: dodecil sulfato de sodio  
seg: segundos  
TAE: Tris-acetato-EDTA  
TRIS: tris (hidroximetil) aminometano  
U/ $\mu$ l: Unidad por microlitro  
UK: United Kingdon  
uv/ UV: ultra violeta  
V/cm: Volt por centimetro  
vis: visible  
X-Gal: bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside

## RESUMEN

El cultivo de batata en Argentina ha experimentado una disminución en la superficie plantada y, por ende, en su producción. Actualmente, todas las regiones productoras de batata se encuentran afectadas por una la patología viral denominada “encrespamiento amarillo” (EA), la más grave que se haya presentado hasta la actualidad en el país. El EA es causado por cinco virus, dentro de los cuales se encuentran los potyvirus, *Virus C de la batata* (SPVC) y *Virus del moteado plumoso de la batata* (SPFMV) razas RC y O. Estos en infecciones simples no ocasionan problemas en el cultivo, pero en las mixtas llegan a causar mermas en rendimientos superiores al 80%. En el presente trabajo se caracterizó biológica, serológicamente y molecularmente a SPVC que pudo ser aislado de plantas infectadas con SPFMV, otro potyvirus estrechamente relacionado con él. SPVC fue transmitido mediante injerto y mediante inoculación mecánica, en bajo porcentaje en *Ipomoea nil* e *I. setosa*. En infecciones

simples, se produjo síntomas típicos de infección con SPFMV, en hojas de *I. setosa* (hospedante alternativo). Complementariamente, se logró purificar el virus y posteriormente se obtuvo el antisuero para el diagnóstico de SPVC, mediante DAS-ELISA, NCM-ELISA e ISEM +D. Los ensayos biológicos y/o serológicos no logran diferenciar SPFMV y SPVC cuando las plantas están infectadas, no resultando fiables para su diagnóstico. Ensayos basados en ácidos nucleicos proporcionan la ventaja de una detección confiable de virus, siendo la sonda de hibridación un instrumento específico para diagnóstico. El presente estudio permitió obtener una sonda de hibridación para detectar específicamente al *Sweetpotato virus C*, aunque son necesarias pruebas ulteriores que permitan concluir al respecto.

**PALABRAS CLAVES:** *Ipomoea batatas*, potyvirus, serología, secuenciación, sonda de hibridación

#### ABSTRACT

The sweetpotato crop in Argentina has experienced a decline in plantings and hence in production. Currently, all sweetpotato producing regions are affected by a viral disease called "*encrespamiento amarillo*" (EA), the most serious disease that has been presented to date in the country. The EA is caused by five viruses, within which the potyviruses *Sweet potato virus C* (SPVC) and the strains RC and O of *Sweet potato feathery mottle virus* razas. In single infections, these pathogens do not cause problems, but in mixed ones, they produce yield decreases (near 80%). In the present the virus was characterized biologically, serologically and molecularly. SPVC could be isolated from plants infected with *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV), another potyvirus closely related to it. SPVC was transmitted by grafting (100% of transmission) and by mechanical inoculation to *I. nil* and *I setosa*. (in low percentages). In simple infections, it produced typical symptoms of SPFMV infection in *Ipomoea setosa* leaves (alternative

host). Additionally, the virus was purified and subsequently the antiserum useful for DAS-ELISA, NCM-ELISA and ISEM + D. Was obtained biological and / or serological tests are not useful to differentiate strains of SPFMV and SPVC. Nucleic acid based assays provide the advantage of a reliable detection of virus, and the hybridization probe is a specific instrument for diagnosis. In this work an hybridization probe to specific detection of *Sweet potato virus C* was obtained, but needed further evidence to conclude on the matter they are.

## **1. INTRODUCCION**

### **1.1. Generalidades del cultivo de batata**

Con una producción anual mundial de 103 millones de toneladas (Faostat, 2014), la batata se ubica en el séptimo lugar como cultivo destinado a la alimentación, y es el tercero más importante de los que tienen órganos comerciales subterráneos después de la papa y la mandioca (Loebenstein, 2015). Globalmente, existen 8 millones de hectáreas cosechadas con batata; aproximadamente el 95% de esa superficie se ubica en países de Asia (49%) y África (46%) en los que es considerado un cultivo de subsistencia. La producción mundial se concentra en Asia con un 75% del total, y un 41% corresponde a China (Faostat, 2014).

A causa de su gran diversidad genética (Zhang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000) y la consiguiente variabilidad en sus características fenotípicas y morfológicas (Woolfe, 1992), la batata presenta gran adaptabilidad y versatilidad de usos. En la actualidad, está recibiendo atención especial como cultivo alimenticio para “salvar vidas” en países en desarrollo (Flugie, 2007). Entre las ventajas de la especie se citan las siguientes: potencialmente, tanto sus raíces como el follaje pueden emplearse en la alimentación humana y animal; posee un mercado potencial para la exportación en fresco (Canadá, Inglaterra, Holanda, Bélgica, Suecia y otros) de 122.500 T/año, aproximadamente equivalente a nuestra producción nacional y del que Argentina no participa; desde una perspectiva global, se prevé hacia el año 2020 un incremento en el procesamiento de la batata para alimentación humana, animal y para la extracción de almidón (Scott *et al.*, 2000) debido sus múltiples posibilidades de uso industrial y, además, es fuente de compuestos (antioxidantes, fibras, minerales, vitaminas, etc.) que la ubican como la hortaliza número uno en base a sus propiedades nutritivas y como uno de los diez alimentos que el ser humano no debería dejar de consumir (Martí, 2009).

En Argentina, la producción de batata es de aproximadamente 120.000 T y se estima que, en 2007, se plantaron unas 10.000 ha. La región pampeana (Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe) y la del noreste (Entre Ríos, Corrientes y Misiones) representan el 83% de la superficie cultivada (43% para la primera zona y 40%, para la segunda). El noroeste (Jujuy, Salta y Tucumán) posee el 15% y el restante 2% corresponde a cuyo (Mendoza)

(SAGPyA, 2008; Martí, 2009). Córdoba constituye la principal provincia productora, a la que le siguen Buenos Aires y, en menor escala, Santa Fe, Entre Ríos, Corrientes, Formosa, Tucumán, Santiago del Estero y Cuyo (Martí, 2007).

De acuerdo a información brindada por la Secretaría de Agricultura y Ganadería de la provincia de Córdoba, en la que las virosis son limitante severa para el cultivo, durante la campaña 2001/02 la batata fue el principal cultivo hortícola en Córdoba, con una superficie plantada de 5000 ha y una producción de 100.000 T (SAGPyA, 2008). El departamento Colón (80%) es el que presenta mayor superficie cultivada con la especie. Al período comprendido entre los ciclos 82/83- 01/02 le correspondió el 56,7% del área con batata y, en la campaña 2002-03, el 42,1% de un total provincial de 4866 ha cultivadas con esta especie (Italia, 2003). Sin embargo, un estudio efectuado durante la campaña 2007/08 reveló que el área con la hortícola en el Dpto Colón se ha reducido a no más de 1200 ha (Grion, datos no publicados) y que una de las principales causas de ello, tal como sucediera históricamente, es la reaparición de virosis en la zona. Del mismo modo, estas enfermedades serían una de las principales determinantes de la disminución experimentada en la superficie plantada con batata a nivel nacional (40% en 2002 con respecto a 1988), según Censo Agropecuario Nacional del 2002. Al respecto, si bien se conoce que, mundialmente, los gorgojos (*Cylas brunneus* y *C. puncticolis*) son la plaga más devastadora de batata (CIP, 2000), las enfermedades causadas por virus son equiparables en importancia en todas las regiones en donde se realiza su cultivo.

### **1.2. Enfermedades del cultivo de batata**

A nivel comercial, esta hortícola se propaga vegetativamente, lo que conduce a un incremento en la concentración de partículas virales en los tejidos vegetales (Onwueme y Charles, 1994; Karyeija *et al.*, 1998), que varía inversamente con la producción. Al respecto, debe destacarse que dicha forma de propagación favorece la ocurrencia de infecciones mixtas, las cuales, con frecuencia, conllevan interacciones sinérgicas (incremento de la severidad de síntomas, de la acumulación y movimiento de partículas virales y marcada disminución de rendimiento de raíces reservantes). Un ejemplo de lo mencionado es *Sweet potato virus disease* (SPVD), probablemente la enfermedad de mayor gravedad que apremia a la batata en todo el mundo (Carey *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2003; Njeru *et al.*, 2004; Mukasa *et al.*, 2006) ocasionada por la co-infección de

*Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) y *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV).

Un estudio conducido en *Resources and Rural Economics Division* del USDA, EEUU determinó que el control de virus es una de las necesidades prioritarias relativas al cultivo de la batata en países en desarrollo, además de: control de gorgojos y desarrollo de cultivares con alto contenido de  $\beta$  caroteno y de almidón, aumento de la disponibilidad y calidad del material para plantación y desarrollo de genotipos con un alto y estable rendimiento potencial (Flugie, 2007).

Para el control de virosis, el paso inicial es la identificación de su/s agente/s etiológicos, la cual resulta más dificultosa que la de la mayor parte de los virus que infectan a otras especies debido a:

- a) Su reducido rango de hospedantes, generalmente limitado a especies convolvuláceas (pocas plantas pueden usarse como indicadoras).
- b) Diferentes virus causan síntomas semejantes en la especie.
- c) Baja concentración de partículas virales en savia de batata que, además, varía según el tejido vegetal infectado.
- d) Inestabilidad en savia (presencia de factores que inhiben su transmisión mecánica a especies indicadoras y las reacciones serológicas).
- e) Dificultad en su purificación y caracterización.
- f) Frecuente ocurrencia de infecciones mixtas y, concomitantemente, de relaciones sinérgicas (Kokkinos y Clark, 2006a).

Lo expresado explicaría por qué los virus son los patógenos de batata menos conocidos, a pesar de ser los de mayor difusión en cultivos comerciales, más aun en los que no se desarrollan bajo los beneficios de un programa de sanidad controlada. La compleja identificación de virus de batata hace que el panorama mundial de virosis de la especie sea confuso. Por otra parte, muchas veces, los mismos fueron señalados en base a la sintomatología observada, lo cual es insuficiente por la amplia variabilidad genética del cultivo que determina que una misma especie viral provoque diferentes síntomas según cuál sea el genotipo infectado. Probablemente sean muy pocos los agentes infectivos, teniendo en cuenta que fueron descritos independientemente en diferentes partes del mundo.

Más de 25 especies virales han sido descritas infectando batatas, aunque sólo 22 son reconocidas por el *International Committee of Taxonomy of Viruses* (ICTV; Tabla 1) (Fauquet *et al.*, 2005; Kreuze y Fuentes, 2008; Loebenstein *et al.*, 2009; King, *et al.* 2012; ICTV, 2015). Entre los últimos pueden mencionarse los siguientes, de los cuales la mayoría pertenecen al género *Potyvirus*:

Tabla 1: Virus reconocidos y no reconocidos por la ICTV en el cultivo de batata.

Virus Reconocidos por ICTV	Género	Distribución	Transmisión
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> (SPLCV) (Shinkai, 1979; Lotrakul <i>et al.</i> , 1999)	<i>Begomovirus</i>	Japón, Taiwán, EEUU, Lejano Oriente, Brasil, México, China, Corea, Puerto Rico, Perú y Kenia	moscas blancas
<i>Sweet potato leaf curl Georgia virus</i> (SPLCGV) (Lotrakul <i>et al.</i> , 2003)	<i>Begomovirus</i>	EEUU, Puerto Rico e India	moscas blancas
Sweet potato chlorotic fleck virus (Fuentes y Salazar, 1992)	<i>Carlavirus</i>	África, América del sur, Asia, Cuba, Panamá, Nueva Zelanda	desconocido
Sweet potato C-6 virus (Fuentes, 1994)	<i>Carlavirus</i>	República Dominicana	desconocido
<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i> (SPCSV) (Shaefers y Terry, 1976; Cohen <i>et al.</i> , 1992)	<i>Crinivirus</i>	mundial	moscas blancas
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	<i>Cucumovirus</i>	Israel, Egipto, Kenia, Sudáfrica, Nueva Zelanda	áfidos
<i>Sweet potato mild mottle virus</i> (SPMMV) (Sheffield, 1957; Hollings, <i>et al.</i> 1976; Brunt <i>et al.</i> , 1996)	<i>Ipomovirus</i>	África, Indonesia, China, India, Nueva Zelanda	moscas blancas
<i>Sweet potato leaf speckling virus</i> (SPLSV) (Fuentes <i>et al.</i> , 1996)	Desconocido (Familia: <i>Luteoviridae</i> )	Perú, Cuba	áfidos
<i>Sweet potato feathery mottle virus</i> (SPFMV) (Moyer y Kennedy, 1978; Clark y Moyer, 1988; Moyer y Salazar, 1989)	<i>Potyvirus</i>	mundial	áfidos
<i>Sweet potato latent virus</i> (SwPLV) (Colinet <i>et al.</i> , 1997)	<i>Potyvirus</i>	África, Taiwan, Perú, Indonesia	áfidos
<i>Sweet potato mild speckling virus</i>	<i>Potyvirus</i>	Argentina, Perú, Indonesia, Taiwán,	áfidos

(SPMSV) (Alvarez <i>et al.</i> , 1997; Di Feo <i>et al.</i> , 2000; Nome <i>et al.</i> , 2006; Untiveros <i>et al.</i> , 2006)		Filipinas, China, Egipto, Sudáfrica, y Nueva Zelanda	
Sweet potato virus 2 (Moyer <i>et al.</i> 1989; Souto <i>et al.</i> . 2003; Ateka <i>et al.</i> . 2004)	<i>Potyvirus</i>	EEUU, África, Taiwan, China, Portugal, EEUU, Sudáfrica, Australia.	áfidos
<i>Sweet potato virus C</i> (SPVC) (Jari Valkonen, 2010)	<i>Potyvirus</i>		áfidos
<i>Sweet potato virus G</i> (SPVG) (Colinet <i>et al.</i> 1994, Colinet <i>et al.</i> , 1998; Kokkinos y Clark, 2006a; Untiveros <i>et al.</i> , 2007)	<i>Potyvirus</i>	China, Egipto, Perú, España, Etiopía, Tanzania, Nigeria, Japón y Barbados	áfidos

Virus No reconocidos por ICTV	Género	Distribución	Transmisión
<i>Sweet potato yellow dwarf virus</i> (SPYDV) (Liao <i>et al.</i> , 1979)	<i>Ipomovirus</i>	Taiwan, Lejano Oriente, Brasil	moscas blancas
Sweet potato vein mosaic virus (SPVMV) (Nome, 1973)	<i>Potyvirus</i>	Argentina	áfidos

### **1.3. Las virosis en Argentina**

En Argentina, hasta el presente, se han hallado siete especies virales: *Sweet potato vein mosaic virus* (SPVMV), *Sweet potato feathery mottle virus* razas *ordinary* y *russet crack* (SPFMV-O y SPFMV-RC), *Sweet potato mild speckling virus* (SPMSV), *Sweet potato chlorotic stunt virus* raza *Western Africa* (SPCSV-WA), *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV) (Rodríguez Pardina *et al.* 2012 b, Rodríguez Pardina *et al.* 2012 c); *Sweet potato virus G* (SPVG)(Rodríguez Pardina *et al.* 2012 a) y *Sweet potato virus C* (SPVC) (Bejerman *et al.*, 2016). Históricamente, la aparición de estas virosis fue progresiva en el tiempo. En 1970, en la zona del Dpto Colón, comenzaron a observarse manchones cloróticos en lotes plantados con cv Criolla Amarilla o Colorada. Las plantas exhibían acortamiento de entrenudos, disminución de tamaño, hojas deformadas, rugosas o ampolladas (lo que le dio el nombre de “batata crespá” a la sintomatología), con marcado aclaramiento de nervaduras, que eran más prominentes que lo normal, mosaico internerval difuso más evidente hacia finales de estación y sistema radicular escaso, con raíces filiformes, consecuencia del área foliar reducida 10-15% respecto a la de plantas sanas, lo que impedía la formación de sustancias de

reserva. El causal de esta etiología era un virus de partículas filamentosas flexuosas de 761 nm de longitud, transmitido por *Myzus persicae* y con reducido rango de hospedantes: SPVMV o virus de la batata crespada o mosaico de las nervaduras (Nome, 1973) (Fig. 1). Estudios posteriores del efecto del patógeno sobre la producción en batata Colorada indicaron un 84% de disminución de los rendimientos en observaciones de campo (Nome y Docampo, 1974). A partir de estos resultados comenzó un programa de producción de plantines de batata de sanidad controlada. La distribución de los mismos entre productores del Dpto Colón, a los tres años de iniciado el programa, permitió aumentar los rendimientos con respecto a la batata común de la zona de manera significativa (Italia, 1991). De este modo, se dio solución al más grave problema que el cultivo había presentado hasta entonces.



FIGURA 1: Síntomas típicos de la enfermedad “batata crespada” del cv Criolla Amarilla. Se observan mosaico, ampollado, engrosamiento de nervaduras y deformación de hojas

En 1980, por primera vez en Argentina, fue hallado el SPFMV o “virus del moteado plumoso de la batata” que afectaba a material procedente de San Pedro, Buenos Aires, correspondiente al cv Criolla Amarilla y Brasilera Blanca (Nome *et al.*, 1980).

Por otra parte y, al mismo tiempo que comenzaron los trabajos de liberación del SPVMV en Criolla Amarilla, se inició la difusión en el cultivo del cv Morada INTA, lo que significó un gran alivio para los productores por tratarse de material sano, con tolerancia a los virus hallados en Argentina hasta entonces (SPFMV y SPVMV). En la década del 80 esta variedad llegó a ocupar el 90% de la superficie cultivada con batata en el país. En pocos años, desplazó a Criolla Amarilla y los problemas de virus

quedaron casi olvidados. Sin embargo, en 1984, en cultivos de la Pcia. de Córdoba, derivados de plantines de Morada INTA introducidos desde Santiago del Estero comenzó a manifestarse con alta incidencia (aproximadamente 60%) una sintomatología severa característica de virosis (Di Feo, 1988; Di Feo *et al.*, 1990a). De este modo, el mencionado genotipo empezó a comportarse como susceptible a la nueva enfermedad, amenaza grave en zonas productoras de Santiago del Estero y Córdoba y que fue denominada “enanismo clorótico” (EC) (*Sweet potato chlorotic dwarf disease: SPCD*) por presentarse en forma de manchones cloróticos y achaparrados en el campo (Fig. 2) Estimaciones de daños producidos por la misma indicaron que, en lotes comerciales con 5% de incidencia (plantas severamente afectadas), existía un 64% de disminución de rendimientos expresado como peso fresco de raíces reservantes (Biderbost *et al.*, 1990). Diferentes investigaciones permitieron determinar que el EC era causado por la acción sinérgica de tres virus, un crinivirus, transmitido por la mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius emparentado con el *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) y dos potyvirus, cuyo vector es el áfido *M. persicae*: *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) y *Sweet potato mild speckling virus* (SPMSV) (Nome y Di Feo, 1999; Di Feo *et al.*, 2000; Nome *et al.*, 2007). Cabe destacar que el cultivar Morada INTA no expresa síntomas cuando es infectado por cualquiera de los potyvirus mencionados o por ambos simultáneamente (Di Feo *et al.*, 1999a). De igual manera, infecciones simples con SPCSV no causan síntomas ni daños en batata. El EC sólo se manifiesta fenotípicamente en plantas infectadas con el crinivirus y uno o los dos potyvirus; no obstante, los síntomas más severos se visualizan en infecciones triples (Di Feo *et al.*, 1998; Di Feo *et al.*, 1999b). La enfermedad *Sweet potato virus disease* (SPVD) mencionada



FIGURA 2: Plantación de batata cv. Morada INTA afectadas por la enfermedad “enanismo clorótico”, caracterizada por presencia de manchones cloróticos y achaparrados en el cultivo.

FIGURA 2: Plantación de batata cv. Morada INTA afectadas por la enfermedad “enanismo clorótico”, caracterizada por presencia de manchones cloróticos y achaparrados en el cultivo.

Investigaciones posteriores relativas a EC y a su control permitieron concluir que en aquellas regiones donde los cultivos permanecían asintomáticos y con buenos rendimientos (San Pedro, Pcia. de Bs. As; Yuto, Pcia. de Jujuy; Romang, Pcia. de Santa Fe) la no expresión de la enfermedad se debía a la influencia del ambiente sobre la interacción planta-patógeno, pese a que también estaban presentes los tres agentes virales mencionados y sus vectores (Castellano *et al.*, 1995; Castellano *et al.*, 1996). A partir de esto, se delineó como estrategia de control, el empleo en áreas productoras muy afectadas (Córdoba y Santiago del Estero) de plantines procedentes de zonas en donde el “enanismo clorótico” no se manifestaba, medida que fue adoptada por los productores y redundó en rendimientos rentables de raíces reservantes por aproximadamente dos años.

El mencionado resultó un manejo económico y práctico de la virosis y con eficiencia similar a la del uso de plantines libres de virus.

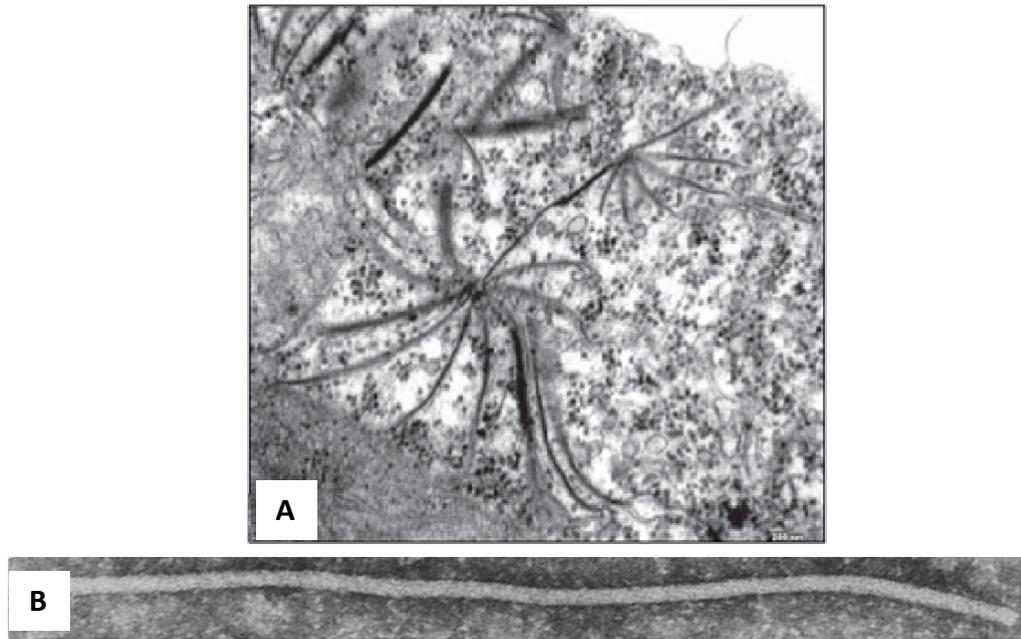
Sin embargo, el último censo agropecuario nacional efectuado en el año 2002, reveló una marcada disminución de la superficie implantada con batata. Un estudio sobre este fenómeno sin precedentes en un cultivo que, históricamente, ha sido de gran importancia en la zona condujo a diagnosticar, tal como se mencionara anteriormente, que entre las principales causas del mismo estaban la reaparición de las virosis y la problemática de la producción de plantines, afectada por virus y sequía (Grion, 2008). Estimaciones efectuadas en lotes de Colonia Caroya en enero de 2009, permitieron establecer la presencia de una sintomatología viral en Morada INTA (clorosis, achaparramiento, área foliar disminuída, aclaramiento de nervaduras) y en el cv Arapey INIA, segundo en importancia en la zona y de creciente difusión por su alta producción y su marcada precocidad (manchones cloróticos, con plantas de tamaño más reducido que las normales, hojas ampolladas, con mosaico intenso y anillos cloróticos) (Luque *et al.*, 2010). Testimonios de productores que adquieren de Romang material base para iniciar las plantaciones (raíces reservantes) indicaron que la expresión fenotípica de la enfermedad ocurre en plantines de dos años (Londero, com. pers.). En el caso de Arapey, la mencionada es, sin lugar a dudas, una nueva patología, cuya etiología, deberá

ser motivo de estudio, como primer paso para establecer medidas de manejo que conlleven una solución a la problemática planteada.

Respecto al panorama de virosis en el país, en la década del 90 se realizó una prospección de patógenos virales de batata en distintas regiones productoras, que permitió establecer la difusión generalizada del SPFMV en la totalidad de las mismas sin evidencias de otros dos virus considerados en el estudio (SwPLV y SPCFV) (Biderbost *et al.*, 1993). En ese entonces, sólo se manifestaron daños sobre la producción en las provincias de Santiago del Estero y Córdoba. Tal como se explicara anteriormente, es conocida que la expresión de síntomas y daños severos depende no sólo de la presencia del SPCSV, sino también de la del SPFMV y/o SPMSV, que juntos o separados sinergizan con el mencionado crinivirus y de la interacción planta-patógeno-hospedante (Castellano *et al.*, 1996; Di Feo *et al.*, 2000). La grave sintomatología expresada en Arapey INIA en cultivos de batata de la provincia de Córdoba y la severidad de daños manifestados en su producción, también hacen pensar en la ocurrencia de infecciones mixtas, de acuerdo a los antecedentes mencionados (Di Feo, com. pers.) o bien en la presencia de una raza severa del SPFMV, patógeno viral omnipresente en todas las regiones productoras del mundo. Pruebas serológicas realizadas en el Instituto de Patología Vegetal (IPAVE), demostraron la presencia de este virus en el material infectado y la ausencia del SPMSV (Luque *et al.*, 2010)

#### **1.4. Sweet Potato Feathery Mottle Virus**

Las características del SPFMV. Este patógeno pertenece a la familia *Potyviridae*, género *Potyvirus*. Los viriones son filamentos flexuosos, consistentes de una cápside no envuelta, elongada, con simetría helicoidal y con una longitud modal de 830-850 nm (Fig. 3). Posee genoma monopartito, con ARN de cadena simple en sentido positivo. El genoma completo consta de 11.600 nucleótidos, con una región poli A y, en general, ha sido parcialmente secuenciado (Moyer y Cali, 1985).



**Figura 3:** (A) Vista bajo el microscopio electrónico de transmisión partículas filamentosas flexuosas. Inclusiones cilíndricas, característica de las infecciones de *potivirus*; (B) Morfología de la partícula viral

Los viriones pueden ser detectados en el citoplasma de las células de toda la planta hospedante infectada, en las que se observan inclusiones consistentes en molinetes que no contienen partículas maduras (Lawson *et al.*, 1971; Nome *et al.*, 1974).

En la naturaleza, los vectores del SPFMV son los áfidos *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *A. craccivora* y *Lipaphis erysimi*, que lo transmiten de manera no persistente. La transmisibilidad depende de una proteinasa *helper* codificada por el virus y de un triplete DAG en la cubierta proteica. Puede infectar por inoculación mecánica a varias *Ipomoea* spp. como *I. batatas*, *I. setosa*, *I. nil*, *I. incarnata* e *I. purpurea*, y, algunas razas, a *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *Chenopodium amaranticolor* y *Ch. quinoa* (Brunt *et al.* 1996). Su diagnóstico es factible de realizar mediante injerto sobre *I. setosa*, en la que causa aclaramiento de nervaduras seguido de remisión de síntomas, o sobre *I. incarnata* e *I. nil* en las que induce aclaramiento de nervaduras sistémico, bandeo nerval y anillos cloróticos. No se transmite por contacto ni por semilla o polen.

La mayoría de los cultivares de batata infectados sólo por SPFMV no exhiben síntomas o bien éstos consisten en manchas circulares suaves en sus hojas o patrones verde claro a lo largo de las nervaduras (*vein banding*). Sin embargo, en co-infecciones con el SPCSV, transmitido por *Bemisia tabaci*, puede observarse achaparramiento de

plantas, aclaramiento con aspecto plumoso de nervaduras (*feathering*) y amarillamiento de las plantas. En experimentos controlados, en infecciones simples, el SPFMV no reduce los rendimientos en comparación con los controles libres de virus; mientras que la infección mixta con el mencionado crinivirus puede causar mermas en la producción de raíces reservantes superiores al 50% o más (Biderbost *et al.*, 1990; Milgram *et al.*, 1996; Gutiérrez *et al.*, 2003). Sin embargo, en Brasil, se observaron incrementos de rendimiento de 118% cuando se plantaron estacas provenientes de cultivo de meristemas combinado con termoterapia, en relación a estacas tomadas directamente del campo e infectadas con una raza local del SPFMV (Pozzer *et al.* 1995). Se mencionan aislamientos de EEUU y Japón que causan importantes daños económicos sobre los rendimientos y la calidad de las raíces comerciales por inducir necrosis externa o corchosis interna de las mismas (*russet crack e internal cork*).

Estudios de la taxonomía molecular de los virus vegetales, incluyendo los potyvirus, son principalmente efectuados a través de la comparación de las secuencias del gen de la cubierta proteica (Yamasaki, 2010). En cuanto a la variabilidad del patógeno, se determinaron cuatro grandes grupos filogenéticos o razas: *Russet crack* (RC) conformado por aislamientos procedentes de Norteamérica, Japón y Corea; Este de África (EA) conformado por aislamientos en su mayoría procedentes de países del Este africano; Ordinario (O) conformado por aislamientos procedentes de China, Japón, Corea, Nigeria, Níger y Argentina. A partir del 2012 la ICTV aprobó la propuesta de Valkonen (2010) de reclasificar al SPFMV-C como una especie separada, SPVC en el género Potyvirus. Ensayos serológicos no logran identificar cepas SPFMV y SPVC cuando las plantas están infectadas ya sea con más de una cepa de este virus o con ambos virus. Por lo tanto, los ensayos biológicos o serológicas no son siempre los procedimientos fiables para su diagnóstico. Ensayos basados en ácidos nucleicos proporcionan la ventaja de una detección fiable de estos virus en las plantas infectadas (Bejerman *et al.*, 2016).

También se han informados aislamientos, variantes y serotipos como Severa (S), C1 (de Perú), strain 835 (de Guatemala) y otras (Colinet y Kummert, 1993; Karyeija *et al.* 2001).

Al respecto, se conoce las secuencias nucleotídicas completa del ARN de varios aislamientos del SPFMV. Tales como la de la raza Severa (SPFMV-S) (Sakai *et al.* 1997), que consta de 10.820 nucleótidos (GenBank accession D86371) excluyendo la

cola poli A, y contiene un marco abierto de lectura que potencialmente codifica 3.493 aminoácidos. La raza *Russet crack* (SPFMV-RC) (Yamasaki *et al.*, 2008) de 10.820 (GenBank accession DL174876) nucleótidos. El Piu3 (Kreuze *et al.*, 2009) perteneciente a la raza Este de África (GenBank accession FJ155666). Y Ordinario (SPFMV-O) (Yamasaki *et al.*, 2010) se obtuvieron secuencias de 10.895 nucleótidos (GenBank accession AB465608). Existen evidencias de eventos de recombinación entre virus de grupo de razas diferentes de SPFMV (Untiveros *et al.* 2007).

Existen diferentes técnicas para la detección del SPFMV, de las cuales las más comúnmente empleadas son las serológicas (distintas variantes de ELISA, tales como DAS-ELISA y NCM-ELISA). Sin embargo, las mismas sólo permite el diagnóstico del patógeno de manera confiable en hojas con síntomas o cuando éste se encuentra en infecciones mixtas con SPCSV (Gutiérrez *et al.* 2003). Una medida eficiente es tomar varias hojas de la planta, considerando la distribución no uniforme del virus en la misma, especialmente en plantines derivados del cultivo de meristemas. Esto debe ser seguido de un *indexing* en una indicadora susceptible (Green *et al.* 1988). SPFMV puede detectarse también a través del uso de una sonda de ARN (Abad y Moyer, 1992), método de alta sensibilidad: revela 0,128 pg de ARN, en relación a ELISA, que es capaz de detectar 179 pg de proteína de la cápside.

Una vía complementaria eficiente para diagnosticar al virus en los tejidos vegetales es el injerto sobre indicadoras. La identificación del SPFMV se efectúa también, por transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), usando iniciadores degenerados para genes específicos, diseñados para amplificar la región variable 5' terminal de los genes de la cápside proteica de los potyvirus (Colinet *et al.* 1998). Últimamente se está ensayando el uso de *multiplex* RT-PCR como herramienta para identificar los agentes virales ARN, para la rápida identificación de infecciones mixtas, y como un método seguro y sensible de mRT-PCR para detección simultánea y diferenciación de las razas de potyvirus (Bejerman *et al.*, 2016; Kwak *et al.*, 2014)

De acuerdo a lo expresado, la presencia del SPFMV es una limitante cierta en el crecimiento y la producción de batata, ya sea en infecciones simples de alguna de sus razas o co-infecciones con otros virus, tal como el SPCSV. Debido a la necesidad del mejoramiento genético de esta hortícola, el intercambio de germoplasma es relevante a nivel mundial y nacional, lo que trae aparejado el peligro de difusión de virosis, que puede resultar aún más grave si se considera que un aislamiento suave o latente del

mismo virus para un grupo de cultivares de una región puede tener efectos considerablemente mayores en áreas donde existen genotipos de diferente base genética. Por tal razón, es importante recurrir a un control eficiente de este patógeno y, al respecto, una de las principales medidas es el cultivo de meristemas en combinación con termoterapia de las plantas dadoras de yemas, con el fin de obtener plantines de sanidad controlada. Este recurso, indudablemente, debe adoptarse en los bancos de germoplasma, de cuyas colecciones se origina el material para resguardo, y para el intercambio generado a partir de las tareas de investigación. Además, el mismo debe complementarse con un diagnóstico sensible y confiable de virus, a los fines de distribuir propágulos de sanidad certificada.

El banco de germoplasma de batata que funciona en el Instituto de Recursos Biológicos del INTA Castelar es una colección activa cuya finalidad es la utilización de los recursos genéticos disponibles, aprovechando la variabilidad existente en los mismos, a fin de satisfacer las demandas provenientes del sector productivo-industrial y científico. Las actividades que se desarrollan en el mismo comprenden: introducción de materiales, conservación de los mismos, monitoreos periódicos de su viabilidad y repiques a nuevos medios de cultivo y monitoreo de la estabilidad genética. La indexación de enfermedades virales aún no está siendo desarrollada y, de acuerdo a lo expresado, es de primordial relevancia, por lo que en el presente proyecto se propone el establecimiento de un paquete tecnológico a tal fin.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos generales**

- Determinar la identidad de la raza del SPFMV que infecta a cultivos de batata en Argentina.
- Establecer una metodología rápida, eficiente y sensible para la detección del SPFMV en plantas de batata.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar biológicamente a la raza local del SPFMV (pruebas de inoculación mecánica y por injerto sobre distintas especies indicadoras).
- Caracterizar serológicamente a la raza local del SPFMV

- Caracterizar molecularmente a la raza local del SPFMV (clonado y secuenciación de su cápside proteica).
- Crear una sonda de hibridación molecular que permita la rápida y eficiente detección del SPFMV en tejidos de plantas *in vitro* de batata.

### **3. HIPÓTESIS**

- La grave sintomatología observada en batatas en lotes de producción comercial de Argentina es causada por una raza severa del SPFMV o bien por una infección mixta en la que este virus es relevante.
- Es posible caracterizar a la raza local del SPFMV presente en cultivos de Argentina.
- Es factible establecer un método de diagnóstico rápido y eficiente para la detección del SPFMV en plantas *in vitro* de batata.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Fuente de inóculo**

Estacas de plantas de batata cv Arapey INIA severamente afectadas por la virosis de lotes en producción del Dpto Colón, Pcia de Córdoba (Fig.4), fueron puestas a enraizar y mantenidas como fuente de inóculo en invernáculo.



**Figura 4:** Fuente de inóculo, cv Arapey en campos de Colonia Caroya (Córdoba) Enero 2009.

### **4.2. Caracterización biológica del SPFMV. Pruebas de transmisión**

#### **4.2.1. Transmisión por injerto**

Se tomaron púas de las plantas fuente de inóculo que fueron injertadas sobre *I. setosa* Ker. (injerto de púa lateral) y sobre diferentes cultivares de batata que se hallaban en el Banco de Germoplasma de Castelar, tales como GEM, Okinawa 100, Beauregard, Arapey INIA y Colorada INTA. Se observó la evolución de los síntomas desde la semana de practicado el injerto. A partir de la expresión fenotípica de los mismos se extrajeron conclusiones preliminares acerca de la presencia de una raza severa del SPFMV y/o de infecciones mixtas del mismo con otro patógeno viral (Di Feo, 2000).

#### **4.2.2. Transmisión mecánica y rango de hospedantes**

La transmisión mecánica se efectuó utilizando 1 g de hojas con síntomas conspicuos de plantas fuente de inóculo y se homogeneizaron en un tampón de inoculación 1/5 (P/V): fosfato de potasio (0,05 M), sulfito de sodio (0,2%) a pH= 7,2. Se le agregó al macerado (de 5ml) una pizca de carbón activado y de carborundum. Con la savia extraída se inoculó un rango de hospedantes constituido por: *I. nil*, *I. setosa*, *Datura metel*, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. murale*, *Cucumis sativa* (pepino),

*Nicotiana benthamiana*, *N. occidentalis*, *Phaseolus vulgaris*. Las plantas inoculadas fueron mantenidas en invernadero a 25°C, con fotoperíodo adecuado y buena iluminación. Se observó la evolución de síntomas a partir de la semana de inoculación, a través de esta metodología se prevé la separación del SPFMV, solo o en mezcla con otros agentes virales que se transmiten mecánicamente, de los que no lo hacen por este medio, tal como el SPCSV y SPLCV.

Posteriormente, y complementariamente, se efectuaron injertos de púas de *I. nil* portadoras de hojas con síntomas inoculadas mecánicamente, sobre plantas de *I. setosa* sanas, a los fines de constatar los síntomas ocasionados por este patógeno en infecciones simples.

#### **4.3. Separación del SPFMV involucrado en la nueva virosis, en caso de infecciones mixtas**

Se procedió a la separación del SPFMV, a los fines de su caracterización, obtención de reactivos de diagnóstico y confirmación de la participación del mismo una vez aislado en la etiología de la nueva enfermedad de la fuente de inóculo.

Dado que la mayoría de los virus que afectan a batata son transmitidos por áfidos (especialmente *M. persicae*), la metodología de separación de los patógenos involucrados se realizó de la forma descrita por Di Feo *et al.*, 2000 (*one probe*: un pulgón y una “picada”). En primera instancia, ejemplares de *M. persicae* previamente sometidos a ayuno, fueron colocados en hojas sintomáticas de planta de batata cv Arapey INIA, (fuente de inóculo). Mediante una lupa (Interelec®) se observó el momento en cual el insecto introdujo el estilete en el tejido vegetal y, cuando lo retiró, fue transferido a una hoja verdadera de *I. setosa* sana (Fig. 5). Se procedió de la misma manera sobre 34 plántulas de *I. setosa* sanas, un pulgón por planta. Éstas fueron mantenidas en jaulas con malla anti-insectos y, luego de 12 horas, pulverizadas con insecticida. Se realizó un seguimiento semanal de los síntomas y se corroboró la presencia de SPFMV mediante ISEM + D (Inmuno-electromicroscopía con decoración; protocolo 2 del Anexo) y NCM-ELISA (protocolo 1 del Anexo) con empleo de tres antisueros (SPFMV, SPMSV y SPVG) y se utilizaron 11 muestras, a los 15 días de la transmisión (Di Feo *et al.*, 2000). También, se calculó el porcentaje de transmisión por áfidos de SPFMV.



Figura 5: *One probe* a partir de batata cv. Arapey INIA (fuente de inóculo). Ejemplar de *M. persicae* “picando” una hoja de *I. setosa*

#### 4.4. Caracterización serológica de los agentes etiológicos

A tal fin se recurrió a las pruebas de DAS ELISA y NCM-ELISA, (Clark y Adams, 1977; Lommel *et al.*, 1982; Parent *et al.*, 1985; Lizarraga y Fernández-Northcote, 1989; Di Feo y Córdoba, 1993; Di Feo y Nome, 1999b) empleando antisueros contra SPFMV, SPMSV, EC (complejo viral “enanismo clorótico”) (producidos en IFFIVE-INTA).

##### 4.4.1. DAS- ELISA (*Double Antibody Sandwich*)

Para determinar la dilución de empleo óptima de los reactivos, se realizó la prueba de calibración de la placa. En esta prueba de DAS-ELISA (Milne *et al.* 1978), se empleó como soporte una placa de poliestireno NUNC con 96 celdillas de fondo plano.

Se prepararon 3 IgG (contra SPFMV, SPMSV y EC) según protocolo 3 del Anexo, en distintas diluciones (1/500, 1/1000 y 1/ 2000) en tampón *coating* (Tampones 3 del Anexo), y del conjugado enzimático según protocolo 4 del Anexo, en las mismas diluciones pero en tampón enzima.

Primera etapa: Sensibilización de la placa con IgG. Se comenzó sensibilizando la placa con 100µl por celdilla de IgG en sus distintas diluciones (Fig 6), usando tres columnas de celdillas consecutivas por dilución. Se la cubrió y se dejó incubando por 4 horas a 37°C.

Segunda etapa: Colocación de las muestras. Se maceraron las distintas muestras con tampón extracción 1/10 (P/V) y se colocaron 100µl por celdilla, una muestra por fila. Se emplearon como controles positivos y negativos, plantas de batata infectadas con EC y plantas sanas, respectivamente. Se dejó incubando toda la noche a 4°C.

Tercera etapa: Colocación del conjugado IgG-fosfatasa alcalina. Se agregó a cada celdilla 100 µl del conjugado enzimático en sus distintas diluciones, usando 1 columna de celdillas por dilución, repitiéndose tres veces. Se la cubrió y se dejó incubando por 4 horas a 37°C.

Cuarta etapa: Colocación del sustrato (Paranitro-fenilfosfato- PNPP). Se agregó a cada celdilla 100 µl del sustrato PNPP (0,8 mg paranitrofenilfosfato/ml de tampón sustrato). Se la dejó incubando a temperatura de laboratorio, en oscuridad, controlado el viraje del color (prueba cualitativa). Luego de 45 minutos se midió en espectrofotómetro (prueba cuantitativa) 3 lecturas a A<sub>405</sub> cada 20 minutos.

Las celdillas de los bordes fueron completadas con el tampón correspondiente a cada etapa. Al final de cada etapa la placa soporte fue lavada con tampón de lavado tres veces de 3 minutos cada una.

[IgG]		1/500			1/1000			1/ 2000			
[Conjugado enzimático]		1/500	1/1000	1/2000	1/500	1/1000	1/2000	1/500	1/1000	1/2000	
A →											
B: Muestra 1											
C: Muestra 2											
D: Muestra 3											
E: Muestra 4											
F: Muestra 5											
G	↑										↑
H →	↑										↑

Figura 6: Representación de la placa de prueba de calibración. Muestras: 1) *I.setosa* sana y 2) Batata sana (controles negativos), 3) Morado INTA con enanismo clorótico (EC), 4) Arapey INIA con EC y 5: Morado INTA con EC severo (controles positivos) (flechas: solo tampón)

Luego de la placa de calibración se realizaron, de la misma manera antes descripta, dos placas con IgG para SPFMV, R1 y R2 (1° sangría conejo R, en dos diluciones) y T1 y T2 (1° sangría conejo T, en dos diluciones) y los conjugados enzimáticos correspondientes para los cuales se usaron en dilución 1/1000 para ambos (Fig. 7 y 8). Los tejidos sanos y enfermos: 1/10 (P/V). Las lecturas de absorbancia a 405nm se registraron a los 45 minutos, 1 hora 10 minutos, 2 horas y 2 horas 45 minutos.

[IgG]		R1		R2		T1		T2		FMV		
[Conjugado enzimático]		R1	FMV	R2	FMV	T1	FMV	T2	FMV	FMV		
A												
B: muestra 1												
C: muestra 2												
D: muestra 3												
E: muestra 4												
F: muestra 5												
G: muestra 6												
H												

Figura 7: Representación de la placa 1. Muestras: 1) *I.setosa* sana, 2) *I. setosa* con *feathery mottle virus* (FMV), 3) Arapey sana, 4) Arapey con Encrespamiento Amarillo (EA) C, 5) Okinawa sana y 6) Okinawa con *virus G* (VG) + *chlorotic stunt virus* (CSV).

[IgG]		FMV					R1	R2	T1	T2	
[Conjugado enzimático]		FMV	R1	R2	T1	T2	FMV				
A											
B: muestra 1											
C: muestra 2											
D: muestra 3											
E: muestra 4											
F: muestra 5											
G: muestra 6											
H											

Figura 8: Representación de la placa 2. Muestras: 1) *I.setosa* sana, 2) *I. setosa* con FMV, 3) Arapey sana, 4) Arapey con EA, 5) Okinawa sana y 6) Okinawa con VG+CSV.

#### 4.5. Obtención de un antisuero contra la raza local del SPFMV

##### 4.5.1. Purificación de SPFMV a partir de *I. setosa*

A los fines de obtener un antisuero contra la raza local del SPFMV, se procedió a realizar su purificación. Para ello, se partió de hojas de *I. setosa* que fueron inoculadas mecánicamente con SPFMV (aislado del cv Arapey INIA) al estado de hoja cotiledonal y según el procedimiento indicado en Di Feo *et al.* 2000 (protocolo 5 del Anexo). Se cosecharon hojas sintomáticas aproximadamente a los 21 días desde la inoculación, las cuales se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta obtener cantidad suficiente de material para iniciar la purificación.

Se tomaron 120g de hojas congeladas se molieron con licuadora en tampón borato

(1/2 P/V: 240 ml) 0,5M, pH 8, conteniendo EDTA 0,01M. Luego de una clarificación con tetracloruro de carbono, cloroformo y ácido tioglicólico y centrifugación, la fase acuosa se concentró en un colchón de sacarosa. Como control se tomó una alícuota de la misma para su observación al microscopio electrónico (muestra 1). Posteriormente, el precipitado obtenido (Fig. 9) fue resuspendido (se hicieron preparados para observar al microscopio electrónico, a partir del resuspendido viral, muestra 2) y sembrado en un gradiente discontinuo (0%, 10%, 20%, 30% y 40%) de CsCl, Fig. 10). Tras su ultracentrifugación, se visualizaron tres bandas, que fueron extraídas cuidadosamente con una jeringa y luego dializadas contra tampón borato 0,05M + EDTA 0,001M, pH 8 para extraer el CsCl (Di Feo *et al.* 1992, Di Feo *et al.* 2000). La pureza y concentración de la suspensión viral fueron determinadas mediante observaciones al microscopio electrónico de preparados contrastados con acetato de uranilo (Roberts 1986).



Figura 9: Precipitado obtenido luego de la concentración en colchón sacarosa

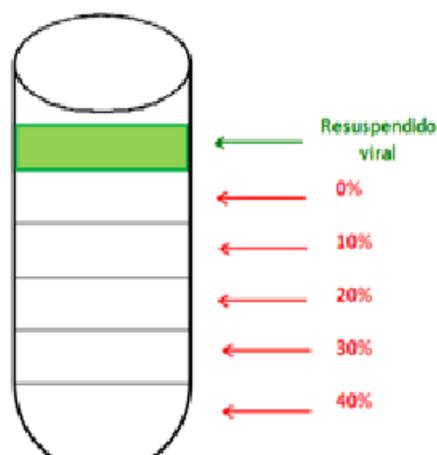


Figura 10: Representación del gradiente discontinuo de CICs.

#### 4.5.2. Preparación para microscopia electrónica

Cabe destacar que al partir de plantas con infecciones mixtas, en el gradiente de centrifugación se visualizaron al menos dos bandas y que cada una correspondería a una entidad viral diferente. Se identificó, mediante observaciones al microscopio electrónico, la banda correspondiente al SPFMV. Para ello se realizaron preparados con decoración estándar contrastados con acetato de uranilo, según protocolo 6 del Anexo, a partir de las tres bandas resultantes del gradiente de CICs. Con las muestras extraídas durante la purificación viral, también se efectuaron preparados para observar al microscopio electrónico: decoración estándar tinción negativa, para las muestras 1 y 2, contrastando con acetato de uranilo los tres preparados, según descrito en los protocolos 6 y 7 del Anexo.

Se tomaron fotografías con cámara digital anexada al microscopio electrónico a los fines de determinar la presencia de partículas virales de SPFMV. También se realizaron lecturas en nanodrop a  $A_{260}$ ,  $A_{280}$  y  $A_{330}$  (función uv/vis) y con los valores obtenidos, se calculó concentración y pureza viral.

$$\text{Concentración de virus (mg/ml)} = \frac{(A_{260} - A_{330}) \times \text{dilución}}{\text{CE}^*}$$

$$\text{Pureza Viral} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

\*CE = coeficiente de extinción: es un valor fijo para cada virus, en el caso del SPFMV el CE es de 2,5. A una preparación de virus perfectamente purificada se le mide la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm con una concentración de virus de 1mg/ml y en una cubeta de 1 cm de espesor.

#### 4.5.3. Obtención del antisuero para SPFMV

Dicho antisuero fue elaborado inmunizando dos conejas raza *New Zealand* con las bandas, superior e inferior como lo especifican Di Feo *et al.*, 2000.

Se efectuaron tres inoculaciones a cada coneja, con aproximadamente 20 días de diferencia entre ellas. Para una coneja (T1), se utilizó la banda inferior, emulsionando 1 ml del purificado viral con 1 ml de adyuvante completo de Freund y la aplicación fue realizada vía intradérmica múltiple en el lomo del animal (Fig. 11). Las dos aplicaciones

siguientes, 1ml del purificado viral + 1 ml de adyuvante incompleto de Freund, se efectuaron intramuscularmente en la cara interna del muslo. Para la segunda coneja (R1), se aplicó en la primera inoculación, la banda superior, (2 ml del purificado viral) emulsionada con 2 ml de adyuvante completo de Freund. Las siguientes dos aplicaciones fueron de la manera antes descrita para la primera coneja.



Figura 11: Primera inoculación viral, mediante vía intradérmica múltiple sobre el lomo.

La primera sangría se realizó a los 21 días desde la primera inoculación viral, previa aplicación de xilol y un pequeño corte de una vena dilatada de la oreja del conejo. La sangre fue recogida lentamente en un tubo cubierto interiormente con vaselina (Fig. 12). Se obtuvieron aproximadamente 9 ml de suero de cada coneja. Se dejó la sangre en reposo, a 37°C por 40 min. y luego se la centrifugó 8 min. a 5000 rpm. El suero se conservó a -20°C. Posteriormente se realizó con ambos sueros pruebas de titulación por NCM-ELISA, según protocolo 2 del Anexo.



Figura 12: (A) desinfección de la zona del corte con xilol; (B) recolección de la sangre en un tubo.

Se realizó una segunda sangría a los 35 días de la segunda inyección del virus y se obtuvieron, de la manera antes descrita, 19 ml de suero de cada coneja. La sangre se dejó en reposo a 37°C por 30 min. y luego se la centrifugó 15 min. a 10.000 rpm. Los

sueros fueron titulados por NCM-ELISA. En este caso se incluyeron más muestras y diluciones mayores con respecto a la primera titulación.

#### **4.5.4. Titulación del antisuero para NCM-ELISA (*Nitrocellulose membrane Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)**

Esta prueba se efectuó con el objetivo de conocer la dilución de empleo óptima en NCM-ELISA de los antisueros obtenidos. Para la primera sangría las diluciones fueron en forma seriada en tampón de antisuero (1/1.000, 1/3.000, 1/6.000, 1/12.000, 1/24.000, 1/48.000, 1/96.000, 1/192.000, 1/384.000, 1/768.000, 1/1.536.000, 1/3.072.000). El material vegetal fue macerado en tampón extracción en proporción 1/50 (P/V) como se indica en el protocolo 1 del anexo. Los controles positivos estuvieron constituidos por plantas de *I. setosa* infectadas con SPFMV y batata cv Arapey INIA infectada con SPFMV y los controles negativos, por plantas sanas de *I. setosa* y batata cv Arapey INIA.

Para el antisuero de la segunda sangría, dado el alto título de los sueros logrados en la primera, las diluciones fueron diferentes (1/6.000, 1/12.000, 1/24.000, 1/48.000, 1/96.000, 1/192.000, 1/384.000, 1/768.000, 1/1.536.000, 1/3.072.000, 1/6.144.000, 1/12.288.000). El material se trató de la misma manera antes descripto. Los controles positivos fueron plantas de batata cv Arapey INIA con SPFMV, Okinawa 100 con SPVG, *I. setosa* inoculada con Arapey INIA con SPFMV e *I. setosa* inoculada con Okinawa 100 con SPVG y los controles negativos plantas sanas de Arapey e *I. setosa* sanas. Se incluyeron las plantas con SPVG, a los fines de determinar la posible reacción cruzada del antisuero entre estos *potyvirus*. El soporte de las pruebas fue una membrana de nitrocelulosa.

## **4.6. Caracterización molecular del SPFMV raza local**

### **4.6.1. Transcripción reversa- reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)**

#### **4.6.1.1. Extracción de ARN por medio de columnas comerciales**

Se realizó la extracción de ARN de hojas de *I. setosa* con síntomas muy conspicuos, acorde al protocolo comercial del *Kit RNAqueous*®, provisto por la compañía *AMBION*® (USA).

Posteriormente se incubó el ARN con ADNsa y se sintetizó un ADN copia siguiendo el protocolo 8 del Anexo, con el oligonucleotido FMV 10820 y se utilizó para la transcripción reversa la *SuperScript III RT* (200 U/ $\mu$ l).

#### 4.6.1.2. Reacción de amplificación por PCR

El ADN copia obtenido en el paso anterior fue utilizado como molde en reacciones para amplificar un fragmento de aproximadamente 1800 pb, correspondiente a la región 3' terminal, que incluye parte del gen NIb, la cápside proteica completa y la región 3' no codificante de los *Potyvirus*. Para ello, se utilizaron los iniciadores PVD-2 (5' GGBAAYAAYAGYGGDCARCC 3') y FMV 10820.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final 50 $\mu$ l, de los cuales 2 $\mu$ l correspondía al ADN copia viral y 48 $\mu$ l a la mix, que contenía 5 $\mu$ l de tampón Taq, 1,5 $\mu$ l de MgCl, 1 $\mu$ l de dNTPs, 1 $\mu$ l de iniciador PVD-2 (100ng/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l de iniciador FMV 10820 (100ng/ $\mu$ l), 0,5 $\mu$ l de TAQ (ADN polimerasa) (*Invitrogen*<sup>TM</sup>, USA) y 38 $\mu$ l de agua desionizada.

En todos los tubos a ensayar se agregó una gota de aceite mineral para evitar la evaporación. El molde utilizado en la mayoría de los casos fue ADN extraído de las plantas, como se describió anteriormente. Toda reacción de PCR se realizó con un control positivo ADN copia (PVY) y control negativo (sin ADN). Se empleó un termociclador de Biometra (UNO-Thermoblock) y se aplicaron las siguientes condiciones: 10 min. a 94°C (desnaturalización del ADN), seguido de 36 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 50°C (*annealing*, pegado de los oligonucleótidos) y 2,5 min. a 72°C (extensión del iniciador, temperatura óptima de la enzima); seguida de una extensión de 10 min. a 72°C.

Los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1% P/V), junto con un marcador de peso molecular (1 kb "ladder") y teñido con bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/ml) en tampón TAE a 1V/cm, a fin de verificar la presencia de banda de tamaño esperado (1800 pb).

A partir de las muestras positivas se eligieron aquellas representativas para su posterior clonado y secuenciación.

#### 4.6.1.3. Purificación de la agarosa de las secuencias amplificadas por PCR

Se escindieron las bandas deseadas con bisturí, observando en UV con lentes, durante el menor tiempo posible para evitar que el ADN sufriera posibles mutaciones causadas por dicha luz. Se aplicó el protocolo comercial para extraer el ADN de la agarosa: *QUIEX II (QIAGene, Alemania)*, el cual se utilizó según las especificaciones descriptas por la compañía.

#### 4.6.2. Clonado y secuenciación

##### 4.6.2.1. Ligación con el vector *pGEM®-T easy* de las secuencias obtenidas por PCR.

El ligado consiste en unir el ADN viral al vector para su posterior clonado en células competentes. Las bandas de ADN amplificadas y purificadas fueron clonadas considerando los parámetros que se enumeran a continuación. Se emplearon 50ng de vector comercial y se estimó la cantidad de inserto según la fórmula:

$$ng \text{ de inserto} = \frac{\text{Tamaño del inserto} \times ng \text{ de vector}}{\text{Tamaño del vector}}$$

En particular se clonaron según protocolo en el vector comercial *pGEM®-T easy (Promega, Madison, WI, USA)*. El vector el *pGEM®-T easy* se suministra en forma lineal y posee un extremo 3'T protuyente para permitir la ligación directa de los productos de PCR con alta eficiencia, tomando ventaja de la actividad transferasa terminal de la enzima Taq polimerasa.

Se utilizaron 50ng de vector y una relación molar vector: inserto de 1:3. En un volumen final de 10µl, de los cuales 1,5µl correspondía a ADN y 8,5µl a la mix, que contenía 1µl la enzima T4 ADN ligasa, 5µl tampón de ligasa (2X), 1µl *pGEM®-T easy* y 1,5µl de agua desionizada.

La mix se incubó a 16°C durante toda la noche.

#### 4.6.2.2. Transformación de bacterias *E. coli* con el vector recombinante.

##### 4.6.2.2.1. Preparación de bacterias *E. coli* competentes

Se inocularon 3 ml de medio LB (protocolo 9 del Anexo) de cultivo con una colonia aislada de la cepa de *Escherichia coli* especificada en cada caso y se permitió que llegue a saturación mediante agitación a 37°C durante toda la noche. Se continuó según protocolo 10 del Anexo para obtener las células competentes.

##### 4.6.2.2.2. Transformación de bacterias *E. coli* competentes

Se mezclaron, en un tubo *eppendorf*, 5µl de reacción de ligación (producto de amplificación clonado en *pGEM®-T easy*) con 50µl de células bacterianas competentes (DH5α) descongeladas en hielo, se homogeneizaron suavemente y se dejaron 30 min. en hielo. Las bacterias se colocaron en un baño de agua a 42°C durante 1 min. con 30 seg. y luego se mantuvieron en hielo durante 2 min.. Se agregaron 250µl de medio LB sin antibióticos y se incubó en cámara de 37°C con agitación suave durante 60 min.

Las bacterias fueron plaqueadas en placas de LB agar con ampicilina 100µg/ml que se incubaron a 37°C durante toda la noche. Estas placas fueron previamente rastrilladas con una solución de X-Gal y IPTG (*Gibco-BRL, USA*) (20µg de 50mg/ml y 100 mM respectivamente), y se dejaron absorber durante 30 min. a 37°C. Se picaron diez colonias blancuzcas y no azuladas para el posterior aislamiento de ADN plasmídico y secuenciación (Fig. 13).

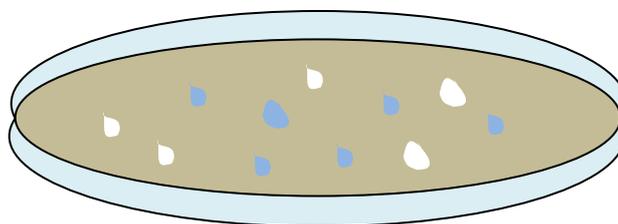


Figura 13: Representación ilustrativa de células competentes de *E. coli* transformadas (color blanco) y no transformadas (color azul).

#### 4.6.2.3. Aislamiento de ADN plasmídico (minipreparación)

##### 4.6.2.3.1. Minipreparación casera.

Para cada una de las diez preparaciones de ADN plasmídico en pequeña escala, se inoculó una colonia en 5 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente y se dejó toda la noche en cámara de 37°C con agitación. Las bacterias se cosecharon por centrifugación en microcentrífuga a 5000 rpm durante 3 min. a temperatura ambiente. Luego se resuspendió el precipitado en una serie de soluciones, siguiendo el protocolo 11 del Anexo.

#### **4.6.2.3.2. Digestión con la endonucleasa de restricción *EcoRI***

Se verificó la presencia del inserto en las diez preparaciones de ADN plasmídico, las mismas se digirieron con la endonucleasa *EcoRI* (*New England Biolabs Inc. Ipswic, MA, USA*). Se utilizó dicha enzima respetando las soluciones correspondientes según cada uno de los catálogos. La reacción de 30µl de volumen final comprendía: 3µl del blanco (0,05 a 0,4µg ADN en agua o TE), 3µl de tampón (10X), 0,5µl de enzima de restricción *EcoRI* (1 U/µg ADN o según catálogo), 0,6µl de ARNasa y 22,9µl de agua de cartucho hasta completar el volumen final.

Las digestiones se dejaron 2 h a 37°C en un cuarto de incubación. Los productos de la reacción, junto con un marcador de peso molecular (1kb "ladder"), fueron corridos en un gel de agarosa 1% conteniendo bromuro de etidio (0,5µg/ml) en tampón TAE a 1V/cm.

Posteriormente, se seleccionaron cinco clones positivos para la presencia del inserto y se realizó para ellos una minipreparación comercial. Este tipo de preparaciones se realizaron cuando se necesitaba un producto más limpio (sin sales) o puro. Se utilizó para la purificación columnas el *kit Qiaprep Spin Plasmid Miniprep (QIAGene, Alemania)*, siguiendo las especificaciones descriptas por la compañía.

#### **4.6.2.3.3. ADN para enviar a secuenciar**

Se cuantificó el ADN obtenido mediante uso de un espectrofotómetro nanodrop 1000A (*ThermoScientific*). Se mandaron a secuenciar fragmentos clonados utilizando los cebadores T7 y Sp6, que presentan homología con regiones del vector, adyacentes al sitio de inserción, a la Unidad Genómica del Instituto de Biotecnología, CICVyA del INTA Castelar.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el programa Bioedit v7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) (Hall 1999). Los consensos de las mismas se contrastaron con la base de datos utilizando el programa *Blast* del *NCBI* (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### **4.6.3. Preparación de la sonda de hibridación molecular. Prueba *Dot blot*.**

##### **4.6.3.1. Marcado con Digoxigenina (*DigDnaLabelling And Detection Kit, Roche*)**

El plásmido *pGEM-T* con el inserto de ADN linealizado con *Pst I* que está a una concentración de 0,11 ug/ul aproximadamente, se colocó en un microtubo de PCR (10µl del plásmido linealizado (1,1 µg) con 5µl agua). El ADNc se desnaturalizó y estabilizó como simple cadena. Siguiendo las especificaciones descritas por la compañía se marcó con digoxigenina (protocolo 12 del Anexo). Luego la reacción se la mantuvo a 10°C.

##### **4.6.3.2. Evaluación del rendimiento del material marcado.**

Se realizó la estimación de la eficiencia del ADNc marcado (protocolo 13 del Anexo). Para ello se llevaron a cabo una serie de diluciones de la muestra de ADNc marcado y del plásmido sin marcar (control negativo) (1/10 – 1/100 – 1/1.000 – 1/5.000 – 1/10.000 – 1/20.000). También de una sonda de concentración conocida (control positivo) las diluciones fueron según establece el *kit Dig DNA Labelling and Detection (Roche, Man., Alemania)* (1 ng/ul - 10 pg/ul – 3 pg/ul - 1 pg/ul – 0,3 pg/ul – 0,1 pg/ul – 0,03 pg/ul– 0,01 pg/ul)

Luego de una serie de incubaciones y fijaciones de la membrana se esperó hasta que todas las diluciones de la sonda se marcaran.

##### **4.6.3.3. Prueba de la sonda de hibridación. Prueba *Dot blot***

Luego de la estimación de la eficiencia del ADNc marcado se procedió a realizar las extracciones de ARN de las muestras utilizando el método de CTAB (protocolo 14 del Anexo). Las muestras probadas con la sonda marcada fueron batatas sana (control negativo) y enferma con EA y con SPVC y plásmido sin marcar (control positivo). Y se hicieron contra 6 diluciones. Se siguió el protocolo 15 del Anexo para realizar las detecciones.

#### 4.6.4. Preparación de la sonda de hibridación molecular. Prueba *Southern blot*.

Para la preparación de la sonda se eligieron a través del mapa del vector *pGEM®-T easy* las endonucleasas BamHI, EcoRI y SacI (*New England Biolabs Inc. Ipswic, MA, USA*) y combinadas en BamHI+EcoRI (BE) y SacI+EcoRI (SE). El fin de obtener un segmento de secuencias relativamente más corto que el plásmido entero linealizado para que la hibridación fuera más eficiente.

##### 4.6.4.1. Digestión con las endonucleasas de restricción *BamHI*, *EcoRI* y *SacI*

Se verificó la presencia del inserto en las preparaciones de ADN plasmídico, las mismas se digirieron con las enzimas de restricción seleccionadas, para determinar la configuración del plásmido. Se utilizaron dichas enzimas respetando las soluciones correspondientes según cada uno de los catálogos. La reacción de 10µl de volumen final comprendía: 1µl del blanco (0,05 a 0,4µg ADN en agua o TE), 1µl de tampón (10X), 0,5µl de enzima de restricción (1 U/µg ADN o según catálogo), 1µl de BSA(10X) (menos la reacción que contiene sólo EcoRI) y 6,5µl de agua deionizada (7,5µl la reacción que contiene sólo EcoRI) hasta completar el volumen final.

Las digestiones se dejaron 1 h a 37°C en incubación. Con los productos de la reacción se realizó un gel de “**mapeo**”, junto con un marcador de peso molecular (1kb “*ladder*”), los mismos fueron corridos en un gel de agarosa 1% conteniendo *SYBR® Safe DNA* (*Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA*) (0,1µl/ml) en tampón TAE a 1V/cm.

Luego que se determinó la configuración del plásmido, se efectuaron digestiones con las dos combinaciones de endonucleasas, BE y SE, para obtener segmentos de ADN relativamente cortos. Las reacciones de 100µl de volumen final comprendían: 15µl del blanco (0,05 a 0,4µg ADN en agua o TE), 10µl de tampón (10X), 2µl de enzima de restricción (1 U/µg ADN o según catálogo), 10µl de BSA (10X) y 63µl de agua deionizada hasta completar el volumen final. Se incubó bajo las mismas condiciones antes mencionadas. Se corrió un nuevo gel “**exploratorio**”, en este caso: de agarosa 2% conteniendo *SYBR® Safe DNA* (0,1µl/ml) en tampón TAE a 1V/cm. En el que se analizó la eficiencia del corte enzimático en solo 1µl de mezcla de reacción.

Posteriormente, se realizó un nuevo gel “**preparativo**”, con las reacciones antes preparadas, con celdas grandes para obtener cantidad de producto para luego extraer el ADN, en gel de agarosa 2% conteniendo *SYBR® Safe DNA* (0,1µl/ml) en tampón TAE a 1V/cm. En el que se sometió a separación por electroforesis al resto del volumen de reacción, 99µl.

Se escindió la banda deseada (750pb) con bisturí, observando en UV con lentes, durante el menor tiempo posible. Se aplicó el protocolo comercial para extraer el ADN de la agarosa: *QUIEX II (QIAGene, Alemania)*, el cual se utilizó según las especificaciones descriptas por la compañía.

Se cuantificó el ADN obtenido mediante uso de un espectrofotómetro nanodrop 1000A (*ThermoScientific*) y se corrió un gel para confirmar las bandas deseadas.

#### **4.6.4.2. Marcado con Digoxigenina (*Dig DNA Labelling And Detection Kit, Roche*)**

El segmento de ADN utilizado para el marcado fue el obtenido a través de los cortes con las enzimas combinadas de BE y se colocó en un microtubo de PCR (24µl del plásmido (15,6ng/µl). El ADN se desnaturalizó y estabilizó como simple cadena. Siguiendo las especificaciones descriptas por la compañía se marcó con digoxigenina (protocolo 12 del Anexo). Luego la reacción se mantuvo a 10°C.

#### **4.6.4.3 Hibridación molecular: Prueba *Southern blot***

Se procedió a realizar las extracciones de ARN de las muestras utilizando el método de TRIZOL (protocolo 16 del Anexo). Posteriormente se incubó el ARN con ADNsa y se sintetizó ADN copia siguiendo el protocolo 8 del Anexo, con el oligonucleótido FMV 10820, utilizando *M-MLV* (200 U/µl) para la transcripción reversa.

Las muestras probadas con la sonda marcada fueron: batata sana (control negativo) y enferma con EA y con SPFMV y plásmido sin marcar (control positivo). Los productos de las extracciones fueron sembrados y corridos en un gel de agarosa 1% conteniendo *SYBR® Safe DNA* (0,1µl/ml) en tampón TAE a 1V/cm, junto con un marcador de peso molecular (1kb “*ladder*”). Se realizó la transferencia del gel a la membrana de *nylon* (*Roche, Man., Alemania*) y luego de una serie de lavados e incubaciones se determinó la hibridación molecular con la sonda, para lo cual se siguió el protocolo 17 del Anexo.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Caracterización biológica del SPFMV. Pruebas de transmisión**

#### **5.1.1. Transmisión por injerto**

Los injertos de púa lateral de batata Arapey INIA enferma (traídas de campos de producción de Colonia Caroya, Dpto Colón, Pcia. de Córdoba, en enero de 2009) sobre *I. setosa* sana resultaron en un 100 % de infección de las plantas de esta indicadora. A partir de la 3<sup>o</sup> semana de observación (Fig. 14) mostraron síntoma de cordón de zapato, esto es a medida que se avanza en la guía, las hojas disminuyen su área foliar, quedando reducidas a las nervaduras y finalmente a protuberancias. La planta termina muriendo.

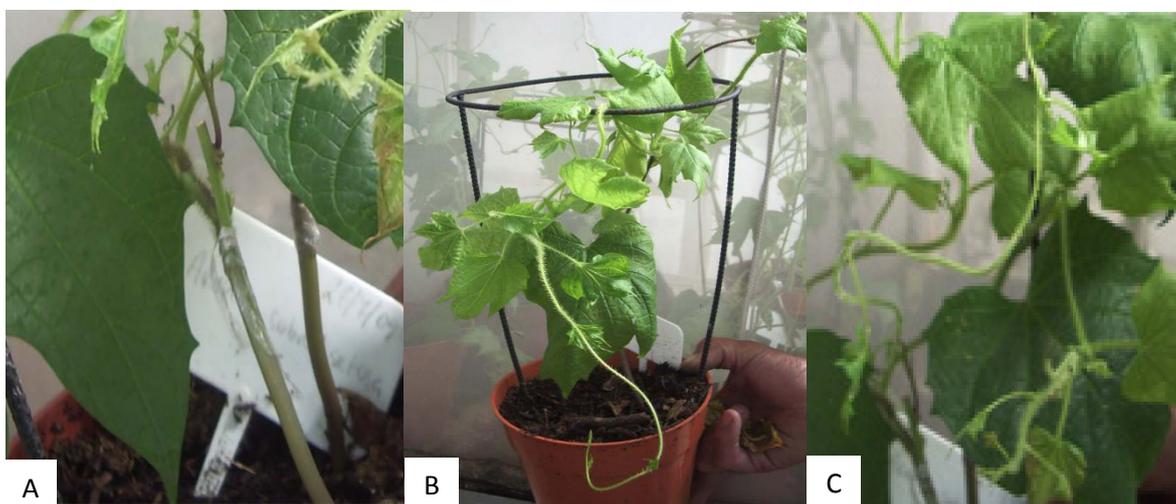


Figura 14: (A) Plantas de *Ipomoea setosa* injertadas con púas de batata cv Arapey INIA enferma (fuente de inóculo). (B) y (C) Síntoma de “cordón de zapato”.

En cambio, al injertar plantas sanas de *I. setosa* con púas de los diferentes cultivares de batata que se hallan en el Banco de Germoplasma de Castelar (Gem, Okinawa 100, Beauregard, Arapey INIA y Colorada INTA), no hubo expresión de síntoma alguno en la indicadora.

### 5.1.2. Transmisión mecánica y rango de hospedante

A las cuatro semanas desde la inoculación mecánica de plantas de *Ipomoea nil* con savia proveniente de hojas sintomáticas de Arapey INIA enferma (fuente de inóculo de la misma procedencia que la empleada en los injertos), se visualizaron síntomas en cuatro de las 23 plantas inoculadas de esta indicadora (17% de transmisión). Los síntomas fueron hojas curvadas hacia abajo, con mosaico y anillos cloróticos suaves, engrosamiento y aclaramiento de venas vieja y luego, remisión de síntomas). (Fig. 15)



Figura 15: *Ipomoea nil* inoculada mecánicamente con Arapey INIA enferma. Síntomas de engrosamiento y aclaramiento de venas, curvado de la hoja hacia abajo, mosaico y anillos suaves.

En *I. setosa* en una planta de las 15 inoculadas (6% de transmisión), los síntomas fueron similares a los obtenidos anteriormente (cuando se injertaba con púas de *I. nil* a plantas sanas de *I. setosa*): mosaico y aclaramiento de venas en todas las hojas (Fig. 16).



Figura 16: *I. setosa* inoculada mecánicamente con Arapey INIA enferma. Síntomas de mosaico suave y aclaramiento de nervadura

Las restantes especies hospedantes inoculas NO MANIFESTARON SÍNTOMAS.

### **5.2. Separación del SPFMV involucrado en la nueva virosis, en caso de infecciones mixtas**

El porcentaje de inoculación a través de la transmisión por pulgón fue de aproximadamente 12% (cuatro plantas de 34 tratadas)

A los 10 días de la *one probe*, aparecieron síntomas en hojas medias de *I. setosa*. Y se pudo observar lo siguiente (Fig. 17):

Planta 1: aclaramiento de todas las venas y *vein banding* en quinta hoja verdadera y sólo en nervaduras principales en sexta hoja verdadera.

Planta 2: ídem planta 1 aunque síntomas menos notables.

Planta 3: mosaico, ampollado y *vein banding* notable en tercera y cuarta hoja, y menos notable en quinta hoja.

Planta 4: ídem planta 3, a partir de la cuarta hoja.

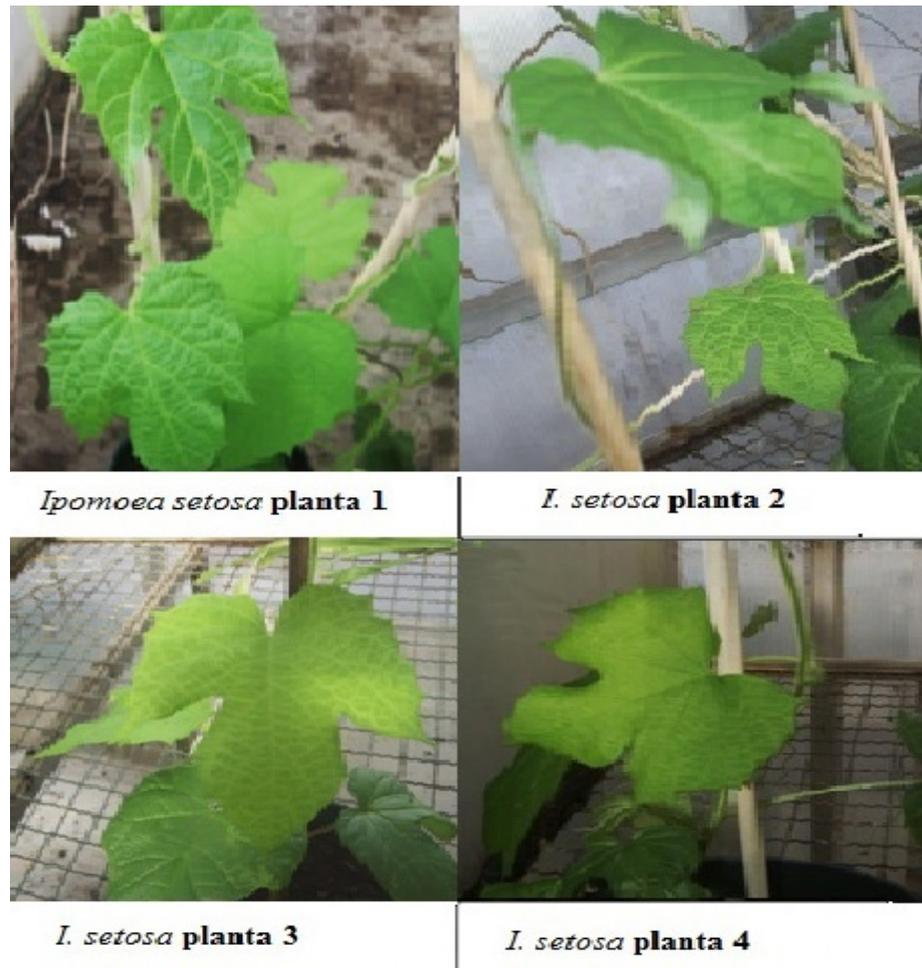


Figura 17: Las cuatro plantas de *I. setosa* inoculadas a través de pulgón desde Arapey INIA enferma con síntomas a partir de los 10 días.

Los síntomas a los 17 días desde la inoculación fueron típicos de SPFMV en las cuatro plantas de *I. setosa* sintomáticas: “moteado plumoso” de venas (*vein banding* con prolongaciones como plumas) y punteado clorótico, principalmente. (Fig. 18)

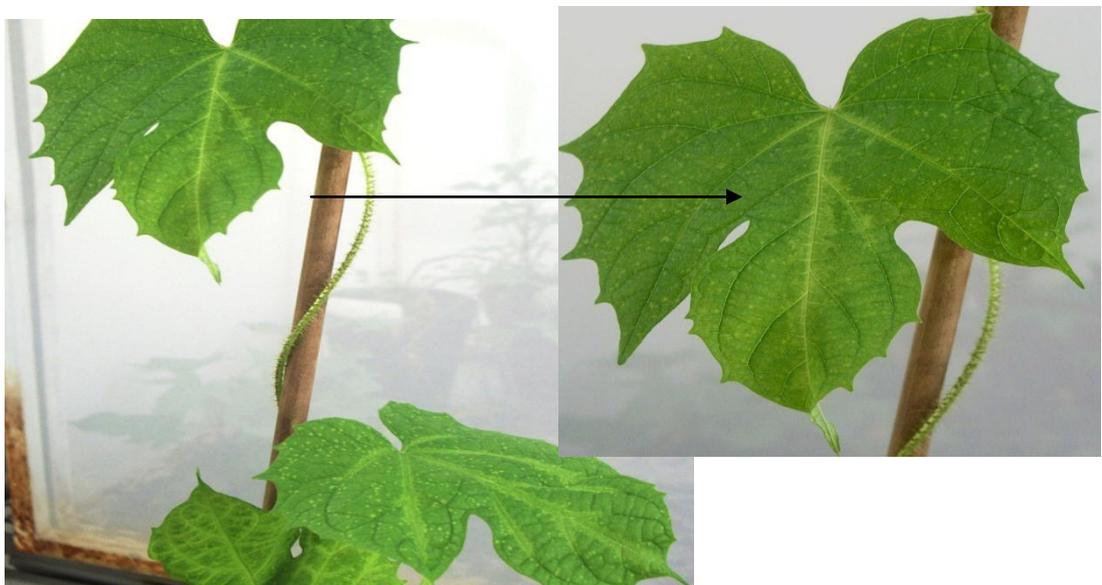


Figura 18: *I. setosa* planta 3, síntomas típicos de SPFMV en 5°, 6° y 7° hoja (moteado plumoso, aclaramiento de venas y punteado clorótico)

Los síntomas a los 24 días desde inoculación fueron iguales que los manifestados a los 17 días, con remisión de los mismos a partir de la novena hoja, aproximadamente. (Fig. 19). Esta remisión de síntomas es típica de infección de *I. setosa* con SPFMV.

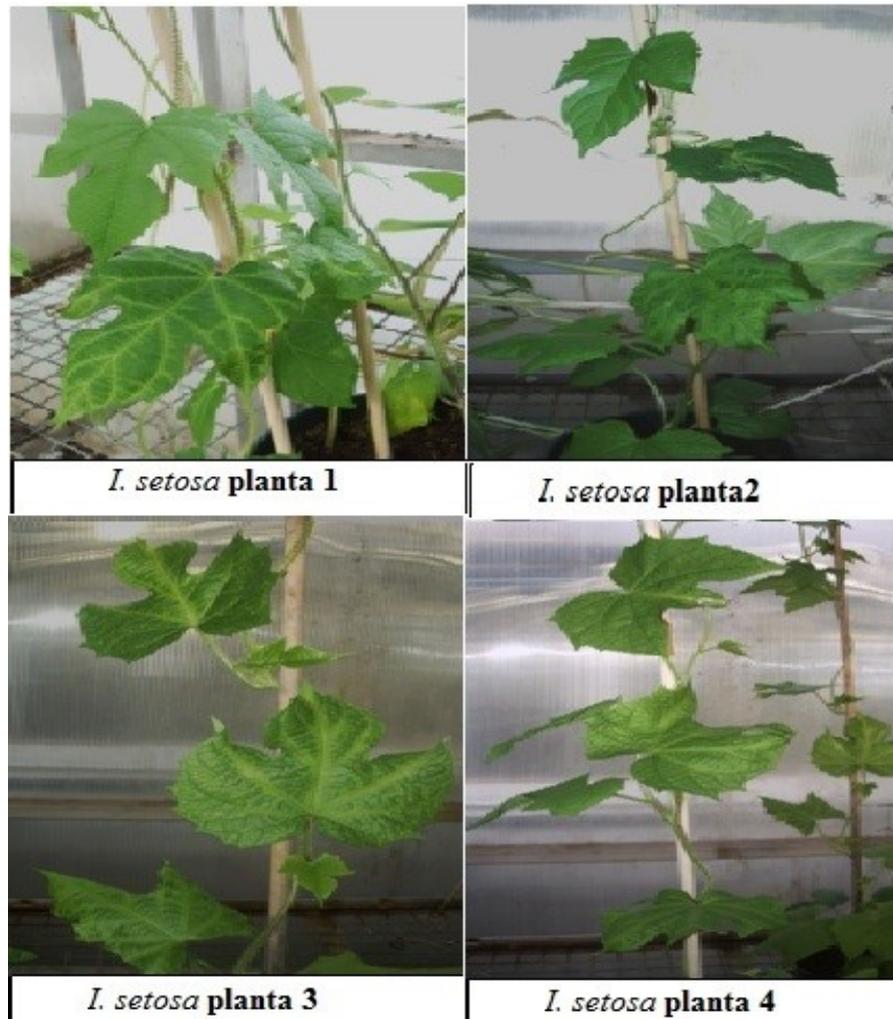


Figura 19: Plantas a los 24 días desde inoculación con remisión de síntomas, a partir de la novena hoja verdadera.

Para corroborar la presencia y separación de SPFMV de otros *potyvirus*, se llevó a cabo una prueba de NCM-ELISA a las dos semanas de la transmisión, incluyendo 11 muestras en la misma y con el empleo de tres antisueros (sueros anti-SPFMV, anti-SPMSV y anti-SPVG).

Se determinó la presencia de SPFMV en las cuatro plantas sintomáticas de *I. setosa* (muestras de 3 a 6) positivas sólo para SPFMV (Fig. 20) como la muestra 10 mostró también reacción positiva sólo para SPFMV. La planta *I. nil* inoculada con batata Morada INTA enferma con SPMSV (muestra 9) dio positiva sólo para SPMSV, como era de esperar. No hubo ocurrencia de reacciones inespecíficas. El resto de las muestras fueron negativas para los tres antisueros.

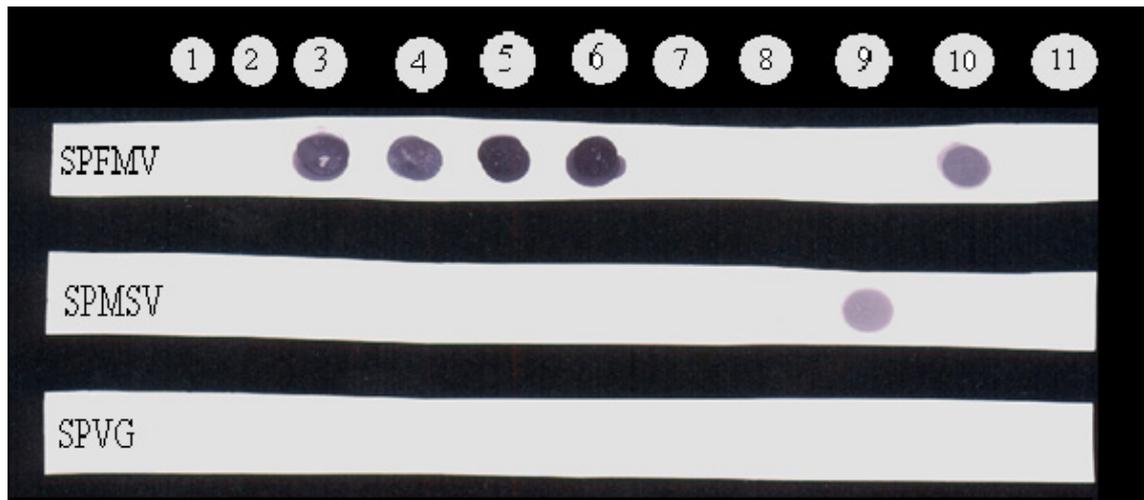


Figura 20: NCM-ELISA contra SPFMVas, SPMSVas y SPVGas. Muestras 1) y 2) Planta asintomática de *I. setosa* inoculada con pulgón desde batata Okinawa 100, 3) 4) 5) 6) y 7) Plantas sintomáticas de *I. setosa* inoculadas con pulgón desde batata Arapey INIA enferma, 8) batata Okinawa 100 asintomática 9) batata enferma con SPMSV de Chaco, 10) batata Arapey INIA positiva para SPFMV, 11) Planta sana de batata Arapey INIA

En los preparados de ISEM + D en microscopio electrónico de transmisión (*Zeiss*) se observaron pocas partículas virales filamentosas, largas y flexuosas típicas de *potyvirus* pero muy decoradas, para las cuatro plantas sintomáticas de *I. setosa* inoculadas con Arapey INIA enferma mediante *one probe* (Fig. 21, 22, 23 y 24)

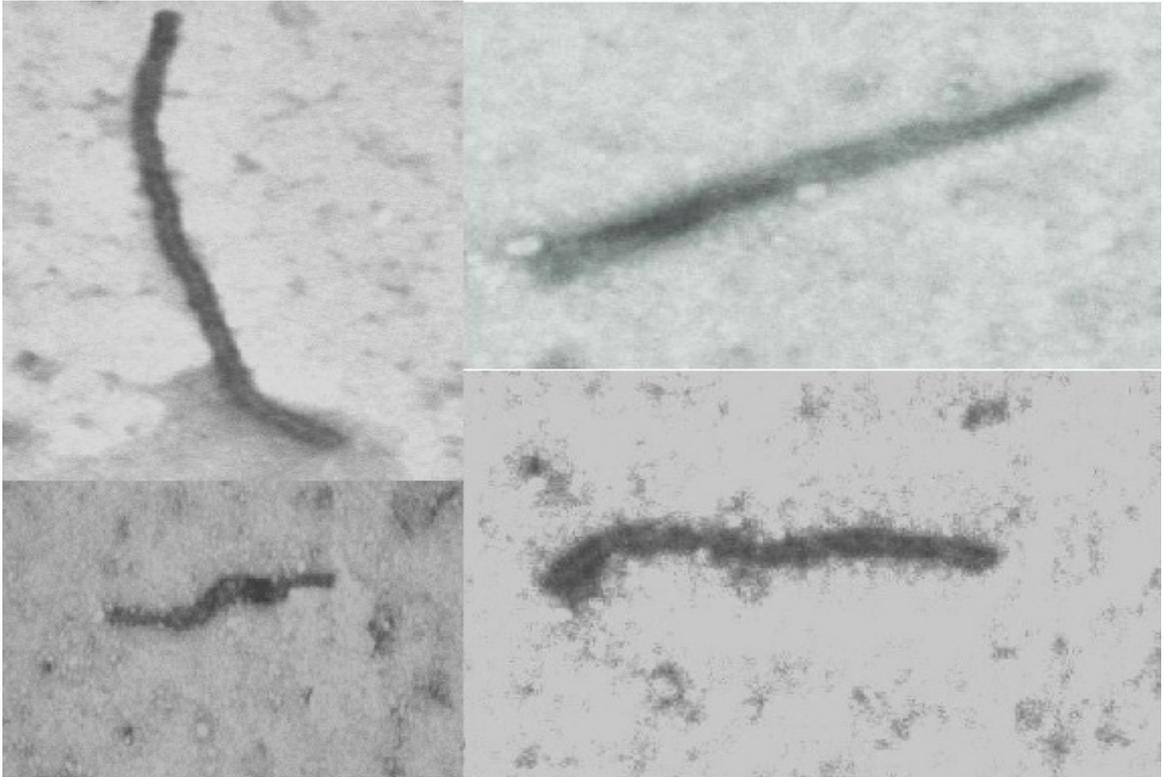


Figura 21: Partículas filamentosas (*potyvirus*) decoradas con SPFMVas (proveniente de savia de la **planta 1** sintomática de *I. setosa*, inoculada mediante *one probe*)

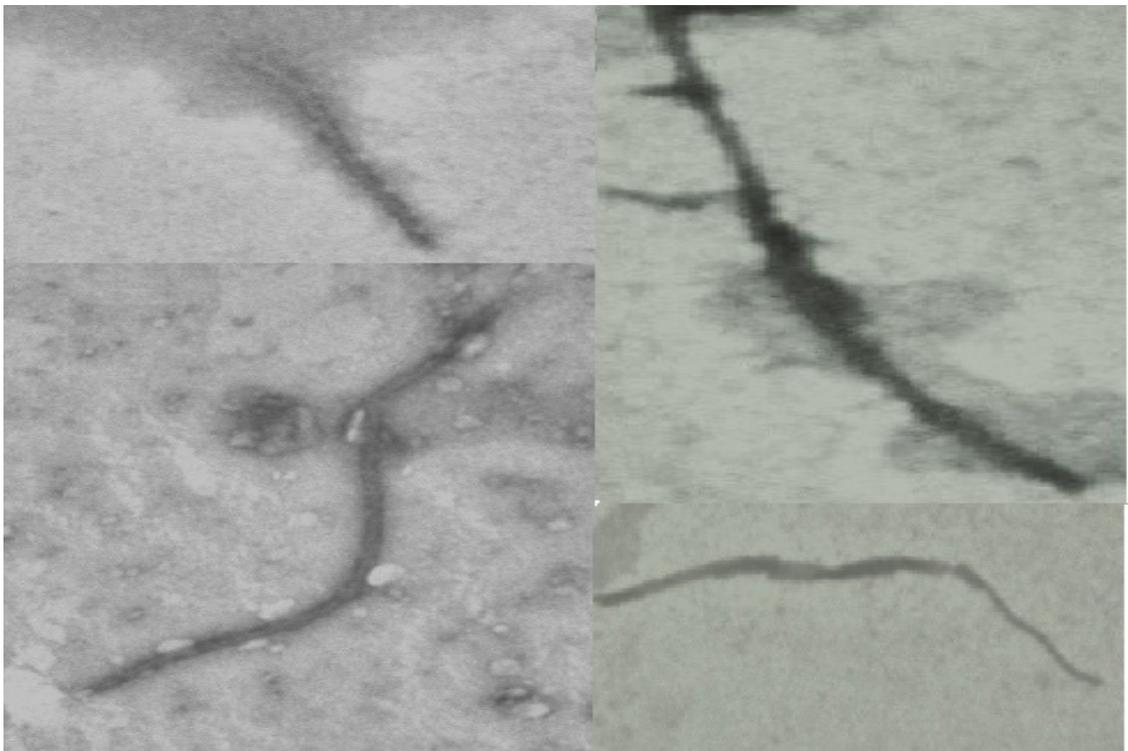


Figura 22: Partículas filamentosas (*potyvirus*) decoradas con SPFMVas (proveniente de savia de la **planta 2** sintomática de *I. setosa*, inoculada mediante *one probe*)

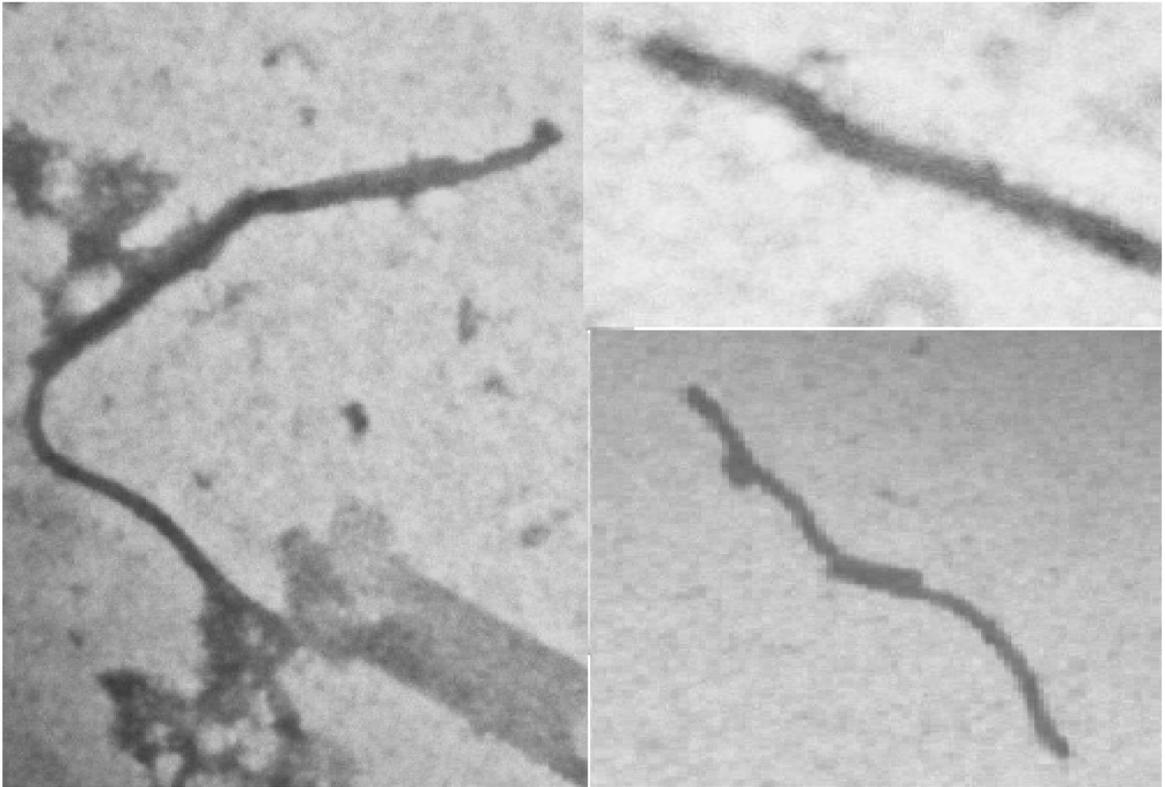


Figura 23: Partículas filamentosas (*potyvirus*) decoradas con SPFMVas (proveniente de savia de la **planta 3** sintomática de *I. setosa*, inoculada mediante *one probe*)

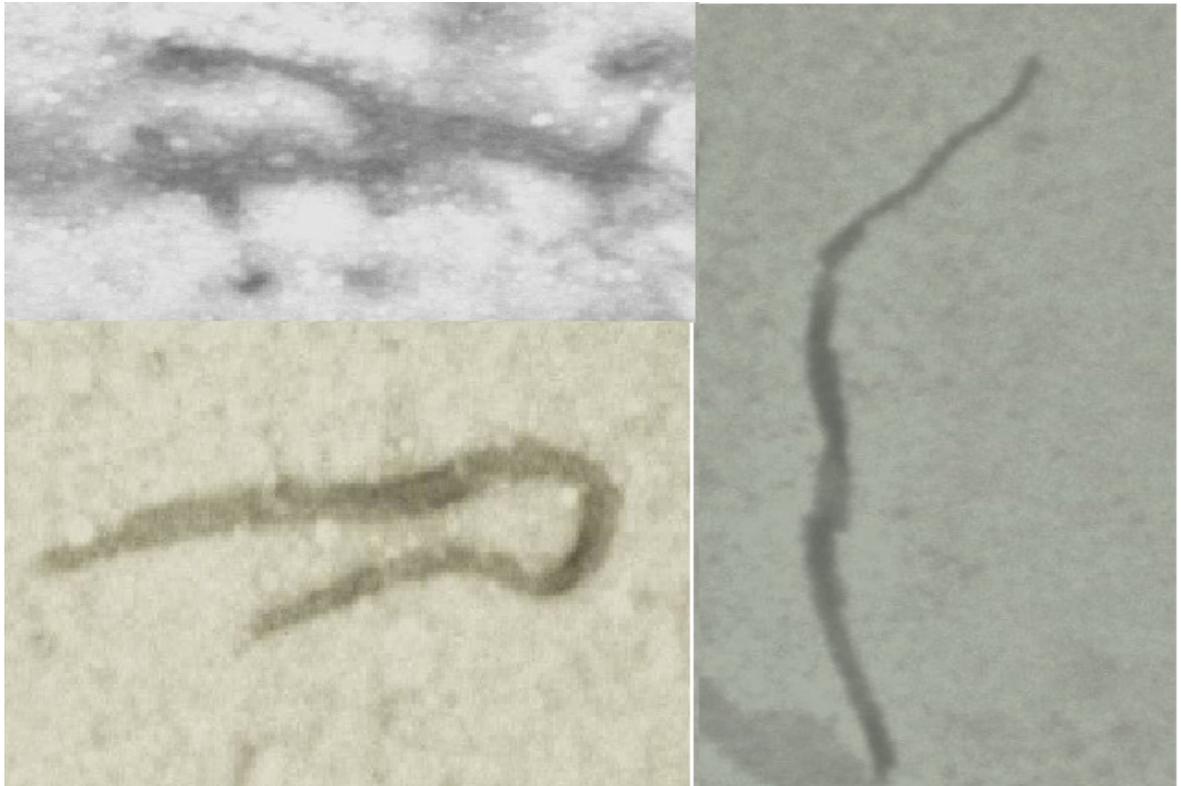


Figura 24: Partículas filamentosas (*potyvirus*) decoradas con SPFMVas (proveniente de savia de la **planta 4** sintomática de *I. setosa*, inoculada mediante *one probe*)

### 5.3. Caracterización serológica de los agentes etiológicos

#### 5.3.1. DAS- ELISA (*Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

En las placas de calibración los valores óptimos de  $A_{405}$  fueron registrados a los 60 minutos de colocado el sustrato en la placa.

Las diluciones más adecuadas de inmunoglobulina (IgG) y conjugado enzimático fueron de 1/500 para SPFMV y EA. En estas combinaciones, se obtuvieron las mayores diferencias entre las lecturas de los controles enfermos y los sanos (Tabla 2 y 3).

[IgG]	1/500			1/1000			1/ 2000		
[Conjugado enzimático]	1/500	1/1000	1/ 2000	1/500	1/1000	1/ 2000	1/500	1/1000	1/ 2000
<i>I. setosa</i> sana	0,036	0,035	0,012	0,033	0,004	0,002	0,025	0,011	0,013
Batata Arapey INIA sana	0,065	0,029	0,013	0,034	0,008	0,015	0,017	0,016	0,012
Morada INTA con EA	2,458	1,400	0,705	1,988	1,116	0,599	1,553	0,896	0,448
Arapey INIA con EA	0,858	0,466	0,257	0,618	0,330	0,194	0,368	0,235	0,129
Morada INTA con EA severo	2,327	1,55	0,672	1,801	1,175	0,619	1,442	0,813	0,483

Tabla 2: Valores de DAS ELISA (a los 60 minutos de colocado el sustrato) empleando antisuero para SPFMV. Se resalta en amarillo, las combinaciones de diluciones de IgG y conjugado enzimático a las cuales las diferencias entre controles sanos y enfermos fueron mayores. EA: “encrespamiento amarillo”

[IgG]	1/500			1/1000			1/ 2000		
[Conjugado enzimático]	1/500	1/1000	1/ 2000	1/500	1/1000	1/ 2000	1/500	1/1000	1/ 2000
<i>I.setosa</i> sana	0,035	0,015	0,009	0,085	0,159	0,092	0,138	0,164	0,040
Batata sana	0,023	0,013	-0,001	0,095	0,072	0,005	0,013	0,002	0,009
Morada INTA con EA	0,720	0,404	0,231	0,746	0,362	0,176	0,442	0,222	0,192
Arapey INIA con EA	0,413	0,167	0,081	0,325	0,176	0,078	0,118	0,112	0,033
Morada INTA con EA severo	1,429	0,756	0,355	1,284	0,132	0,426	0,700	0,523	0,250

Tabla 3: Valores de DAS ELISA (a los 60 minutos de colocado el sustrato) empleando antisuero para EA. Se resalta en amarillo, las combinaciones de diluciones de IgG y conjugado enzimático a las cuales las diferencias entre controles sanos y enfermos fueron mayores.

Las dos placas probadas con distintas IgG, luego de la calibración, mostraron a la hora de puesto el sustrato diferencias notables de  $A_{405}$  entre controles sanos y enfermos. Las máximas diferencias entre registros de  $A_{405}$  ocurrieron a partir de las 2 horas de incubación de la placa con sustrato.

Todas las IgG probadas (T1, T2, R1 y R2) funcionaron. Esto se vio al confrontarlas con un conjugado contra SPFMV suero local y de uso en el IPAVE para diagnóstico de rutina. De ellas la de más calidad fue la de T1, le siguió R1, T2 y R2. La IgG y el conjugado correspondiente obtenido a partir del suero del conejo FM fueron los que dan más altas lecturas de  $A_{405}$  y con ellos fue máxima la diferencia entre tejido enfermo y tejido sano tanto en batata como en *I. setosa* (Tabla 4).

De los conjugados T1, T2, R1 y R2, probados contra la IgG anti-SPFMV calibrada y de uso de rutina en laboratorio, el denominado T1, fue el que arrojó los mejores resultados al emplearlo a una dilución de 1:500. Le siguió en calidad R1. Los conjugados para T2 y R2 fueron descartados por su baja eficiencia de detección, debido esto a que se elaboraron a partir de IgG de primera sangría diluidos (Tabla 5).

En ambas placas las lecturas de  $A_{405}$  fueron más altas para batata Arapey INIA enferma que para *I. setosa* enferma (seguramente, porque SPFMV aún no había alcanzado su concentración óptima en esta hospedante).

No hubo reacción entre ninguna IgG y conjugado para SPFMV en Okinawa enferma, lo cual es lógico, porque ese cultivar no porta este virus, sino otro *potyvirus*: SPVG que puede tener algo de reacción cruzada con SPFMVas (pero es más débil en DAS-ELISA que en NCM-ELISA).

[IgG]	R1		R2		T1		T2		FMV	
[Conjugado enzimático]	R1	FMV	R2	FMV	T1	FMV	T2	FMV	FMV	FMV
<i>I setosa</i> sana	0,125	0,110	0,095	0,097	0,102	0,097	0,083	0,099	0,101	0,072
<i>I setosa</i> infectada con SPFMV	0,212	1,199	0,105	0,748	0,397	1,563	0,121	1,173	1,330	1,366
Arapey INIA sana	0,127	0,110	0,094	0,093	0,093	0,099	0,087	0,088	0,099	0,103
Arapey INIA EA	0,381	1,758	0,126	1,180	0,726	2,281	0,165	1,555	1,764	2,029
Okinawa sana	0,133	0,105	0,103	0,103	0,094	0,108	0,090	0,109	0,102	0,096
Okinawa SPVG+SPCSV	0,165	0,128	0,097	0,110	0,150	0,143	0,089	0,108	0,114	0,116

Tabla 4: Valores de DAS ELISA (a los 120 min. de colocado el sustrato) empleando distintos antisueros (R1: IgG del conejo R1 1° sangría con 1,88mg/ml, R2: IgG del conejo R1 1° sangría diluido a 1,32 mg/ml, T1: IgG del conejo T1 1° sangría con 2,3mg/ml, T2: IgG del conejo T1 1° sangría diluido a 1,5mg/ml y FMV: IgG del conejo FM) y combinando los distintos conjugados enzimáticos

correspondientes. Se resalta en amarillo, las combinaciones de diluciones de IgG y conjugado enzimático a las cuales las diferencias entre controles sanos y enfermos fueron mayores.

[IgG]	FMV					R1	R2	T1	T2
[Conjugado enzimático]	FMV	R1	R2	T1	T2	FMV			
<i>I setosa</i> sana	0,101	0,093	0,085	0,083	0,073	0,089	0,086	0,085	0,072
<i>I setosa</i> infectada con SPFMV	1,369	0,199	0,101	0,305	0,120	1,142	0,679	1,296	0,963
Arapey INIA sana	0,122	0,098	0,091	0,075	0,082	0,093	0,090	0,079	0,062
Arapey INIA EA	1,540	0,275	0,121	0,437	0,130	1,565	0,834	1,857	1,085
Okinawa sana	0,117	0,098	0,096	0,079	0,075	0,120	0,089	0,083	0,058
Okinawa SPVG+SPCSV	0,129	0,125	0,101	0,099	0,079	0,121	0,103	0,117	0,092

Tabla 5: Valores de DAS ELISA (a los 120 min. de colocado el sustrato) empleando distintos antisueros (R1: IgG del conejo R1 1° sangría con 1,88mg/ml, R2: IgG del conejo R1 de 1° sangría diluido a 1,32 mg/ml, T1: IgG del conejo T1 1° sangría con 2,3mg/ml, T2: IgG del conejo T1 de 1° sangría diluido a 1,5mg/ml y FMV: IgG del conejo FM) y combinando los distintos conjugados enzimáticos correspondientes. Se resalta en amarillo, las combinaciones de diluciones de IgG y conjugado enzimático a las cuales las diferencias entre controles sanos y enfermos fueron mayores.

## 5.4. Obtención de un antisuero contra la raza local del SPFMV

### 5.4.1. Purificación de SPFMV a partir de *I. setosa*

Luego de la ultracentrifugación del gradiente de CsCl se obtuvieron tres bandas (Fig. 25). Se observó una banda intermedia (verde) con dos bandas blanquecinas (superior e inferior) adyacentes y restos vegetales sólidos que no llegaron a formar un precipitado. Luego de la diálisis se obtuvieron 4 ml de banda inferior, 6ml de banda superior y aproximadamente 3 ml de banda intermedia.

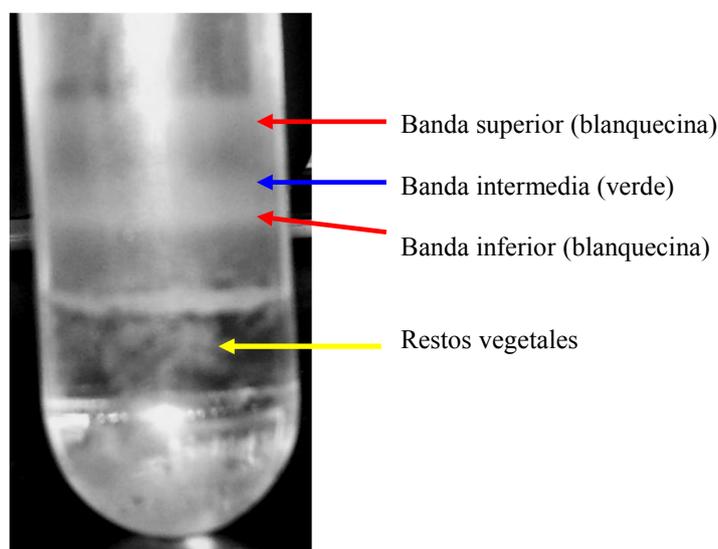


Figura 25: Bandas producidas luego de la ultracentrifugación del gradiente de CICs.

#### 5.4.2. Observación de preparados en microscopía electrónica y lectura en nanodrop

De acuerdo a las observaciones al microscopio electrónico, las preparaciones de las muestras 1 y 2 durante la purificación contrastada con acetato de uranilo, presentaron baja concentración de partículas virales pero bien decoradas (Fig. 26).

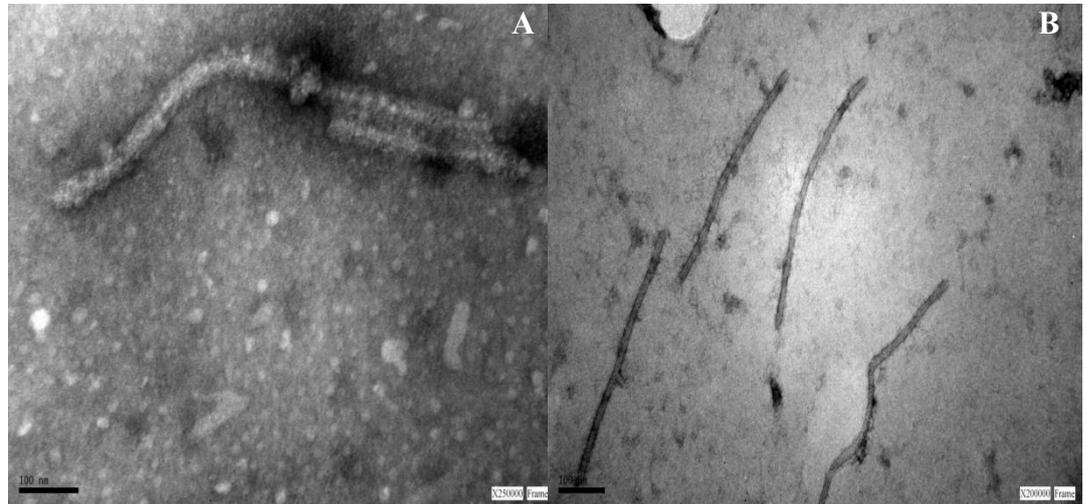


Figura 26: Tinción negativa de partículas con acetato de uranilo 2%, durante la purificación, decoradas con SPFMVas (1:100) A) muestra 1: fase acuosa, y B) la muestra 2: resuspensión viral.

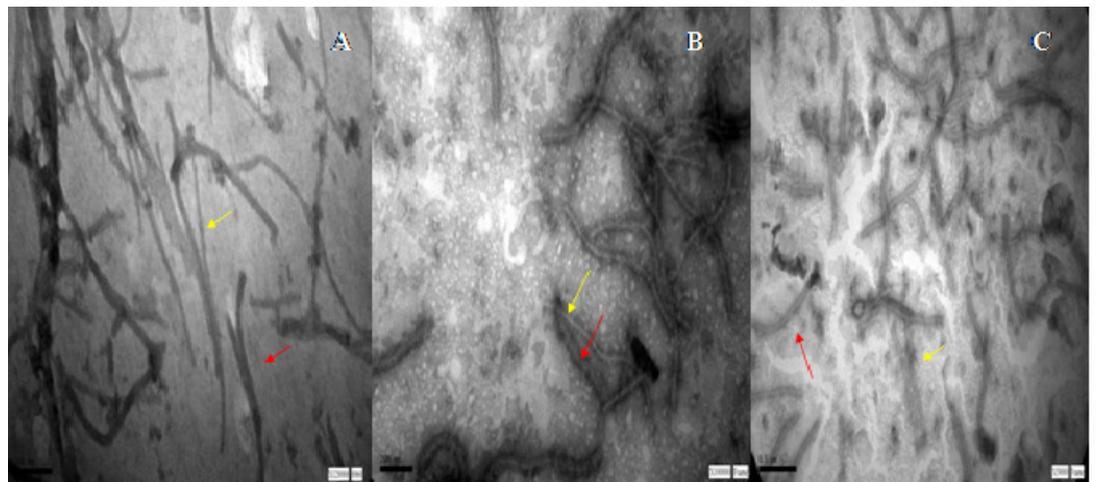


Figura 27: Tinción negativa de partículas con acetato de uranilo 2%, decoradas con SPFMVas (1:100). A) banda inferior, B) banda superior y C) banda intermedia. Flecha roja: partícula muy decorada; flecha amarilla: partícula poco decorada.

Y a partir de los preparados que se visualizaron al M.E. se realizaron decoraciones de las tres bandas con suero SPFMV<sub>as</sub> diluido 1: 100 (función uv/vis) se observaron partículas bien decoradas (Fig. 27). Detallándose que en la banda superior se vieron partículas decoradas. En la banda inferior casi todas las partículas estuvieron bien decoradas. Y en la banda intermedia hubo partículas decoradas y sin decorar y muchas impurezas. De las lecturas en nanodrop de cada una de ellas (Fig. 28), se calcularon las concentraciones y pureza viral (Tabla 6) siendo la banda superior la más limpia (por mayor pureza y menor valor  $A_{330}$ ). La pureza de los *potyvirus* se debe acercar a 1,20, aunque tuvo la mitad de concentración de virus que la banda inferior.

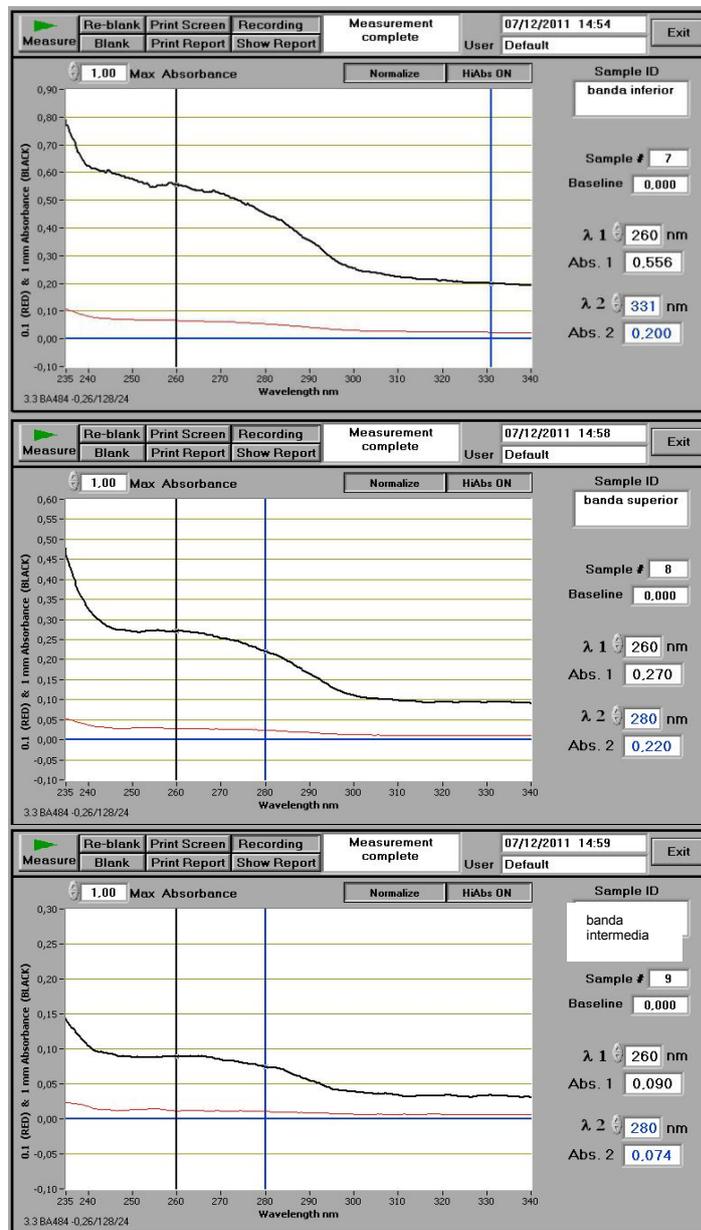


Figura 28: Lecturas en nanodrop de las tres bandas (**función uv/vis**).

	Banda inferior	Banda superior	Banda intermedia
A <sub>260</sub>	0,556	0,270	0,090
A <sub>280</sub>	0,450	0,220	0,074
A <sub>330</sub>	0,201	0,094	0,033
<b>Concentración de virus (mg/ml)</b>	0,142	0,0704	0,0228
<b>Pureza Viral</b>	1,236	1,227	1,216

Tabla 6: Resumen de los valores obtenidos de las lecturas de nanodrop para las tres bandas obtenidas en la purificación. Y cálculos de concentración y pureza viral.

#### 5.4.3. Obtención del antisuero para SPFMV. Pruebas de titulación por NCM-ELISA (*Nitrocellulose membrane Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Para la obtención del antisuero se utilizaron como inmunógenos dos bandas, inferior y superior, luego de las observaciones al microscopio electrónico y cálculos de concentración y pureza viral.

Para la titulación en NCM-ELISA se estableció una dilución de 1/ 768000 (columna 10) para el antisuero obtenido de coneja T1 (inoculado con la banda inferior de la purificación) luego de la primera sangría resultando de mayor calidad que el de R1 (Fig. 29). A esa dilución se detectó claramente plantas enfermas sin ocurrencia de reacción en plantas sanas a altas diluciones. El antisuero R1 tiene que ser adsorbido contra proteína de planta sana para determinar su dilución de empleo.

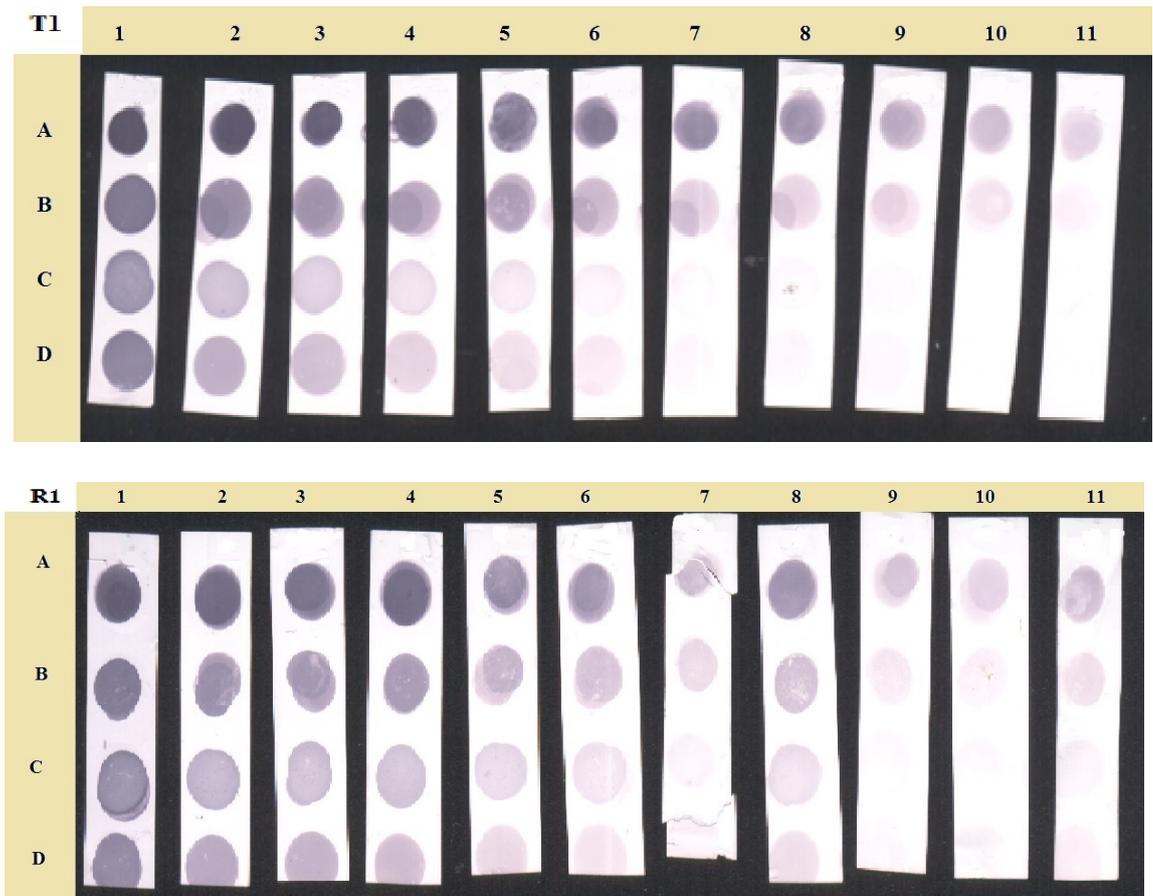


Figura 29: Titulaciones en NCM ELISA del antisuero obtenido luego de la primer sangría del conejo T1 y R1. A) *I. setosa* con SPFMV, B) batata Arapey con SPFMV, C) *I. setosa* sana y D) batata Arapey INIA sana, contra 12 diluciones seriada distintas (1)1/1.000, 2)1/3.000, 3)1/6.000, 4)1/12.000, 5)1/24.000, 6)1/48.000, 7)1/96.000, 8)1/192.000, 9)1/384.000, 10)1/768.000 y 11)1/1.536.000).

El título del suero de segunda sangría (Fig. 30) no se incrementó respecto al de primera sangría (comparar iguales diluciones) y, el de primera sangría fue más específico (menos reacción contra planta sana). Dicho antisuero es contra SPFMV, ya que la reacción con Okinawa 100 (con SPVG) e *I. setosa* inoculada con Okinawa 100 desaparece con las diluciones.

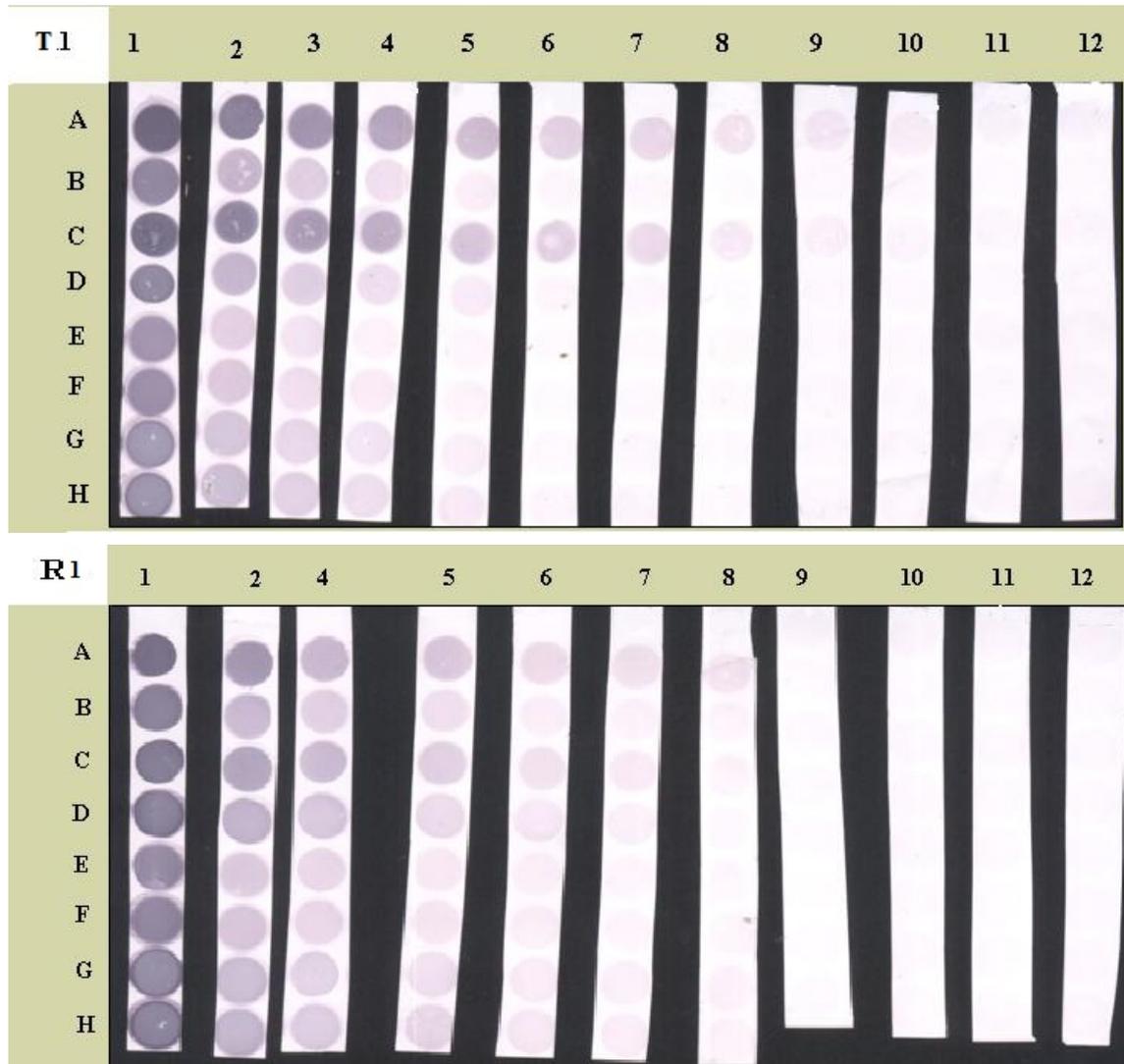


Figura 30: Titulaciones en NCM ELISA del antisuero obtenido luego de la segunda sangría del conejo T1 y R1. A) batata Arapey con SPFMV, B) Okinawa 100 con SPVG, C) *I. setosa* inoculada con Arapey INIA con SPFMV, D) *I. setosa* inoculada con Okinawa 100 con SPVG, E) y F) batata Arapey INIA sana, G) y H) *I. setosa* sana contra 12 diluciones seriada distintas (1)1/6.000, 2)1/12.000, 3)1/24.000, 4)1/48.000, 5)1/96.000, 6)1/192.000, 7)1/384.000, 8)1/768.000, 9)1/1.536.000, 10)1/3.072.000, 11)1/6.144.000 y 12)1/12.288.000).

## 5.5. Caracterización molecular del SPFMV raza local

### 5.5.1. Reacción de amplificación por PCR

A partir de muestras de tejido infectado, hojas basales y apicales, se realizaron extracciones de ARN con el *kit* comercial (*RNAqueous® kit*, *AMBION®*, *USA*) y síntesis de ADNc empleando la enzima transcriptasa reversa *SuperScript III RT* y siguiendo las instrucciones del fabricante. En la Figura 31 se presenta un esquema del

genoma viral de Potyvirus, especificando las regiones del genoma viral que se amplifica con los respectivos cebadores.

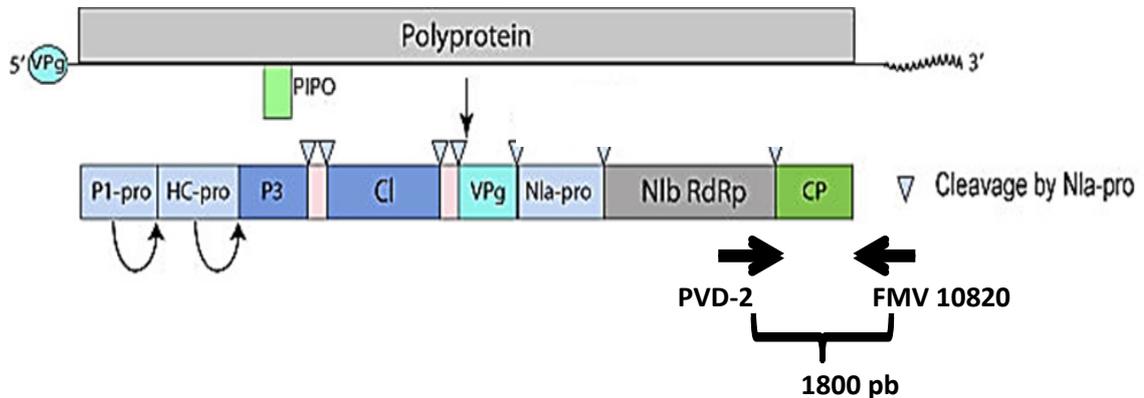


Figura 31: Esquema del fragmento amplificado de 1800 pb (correspondiente a la región 3' Terminal, que incluye parte del gen NIB, la cápside proteica completa y la región 3' no codificante de los Potyvirus). Figura adaptada del esquema de la página de Expaty ([http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/50.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/50.html)) no realizada a escala. Es un genoma monopartito, linear, ssRNA (+) de 10 kb. En el extremo 3' posee una cola de poly (A) y en el 5' una proteína (genome-linked protein=VPg).

De las muestras analizadas mediante la técnica de PCR resultaron positivas para SPFMV las hojas basales y una de las hojas apicales. Como puede verse en la Figura 32 se visualizaron otras bandas distintas a la esperada, sin embargo las de mayor masa correspondían a las bandas del tamaño esperado (aprox. 1800 pb), para evitar una exposición prolongada a los rayos UV, la foto que se muestra exhibe un hueco en el correspondiente gel de agarosa a la altura esperada. Dichas bandas fueron colectadas por separado para cada templado para continuar su estudio.



Figura 32: Patrón de electroforesis en gel de agarosa 1% de los fragmentos amplificados por PCR. *ladder*: marcador, HA1: hoja apical 1 de *I. setosa* inoculada con SPFMV, HA2: hoja apical 2 de *I. setosa* inoculada con SPFMV, HB1: hoja basal 1 de *I. setosa* inoculada con SPFMV, HB2: hoja basal 2 de *I. setosa* inoculada con SPFMV, C(+): control positivo PVY y C(-): control negativo *mix* de PCR sin ADNc.

## 5.5.2. Clonado y secuenciación

### 5.5.2.1. Ligación con el vector pGEM®-T easy y transformación de bacterias *E. coli* competentes.

El templado obtenido mediante amplificación por PCR fue purificado y empleado para ligar en el vector pGEM®-T easy. La cantidad del inserto utilizado fue de **30 ng de inserto** contemplando la regla básica que considera el peso del inserto, el del vector y la masa de este descrito en Materiales y Métodos.

Luego se transformaron células competentes de *E. coli*, DH5 $\alpha$ . Se obtuvo un número variable de colonias blancas y azules (gracias al marcador de selección del vector) y a partir de ellas fueron tomados 10 clones transformados (color blanco) (Fig. 33). A partir de ellos, se realizaron lisis alcalina con SDS, basado en el protocolo de Sambrook *et al.*

1989, las cuales fueron digeridas con la enzima EcoRI y resueltas en un gel de agarosa a fin de confirmar la presencia del inserto.

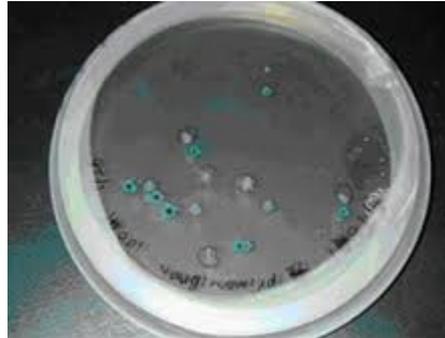


Figura 33: Foto ilustrativa de células transformadas (color blanco) y no transformadas (color azul)  
Fuente: <http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1&note=4>

La Figura 34 muestra un total de nueve clones transformados, de allí se seleccionaron cinco que portaban el inserto esperado y se realizó para ellos una minipreparación comercial (*QIAGene, Alemania*), para su posterior secuenciación.

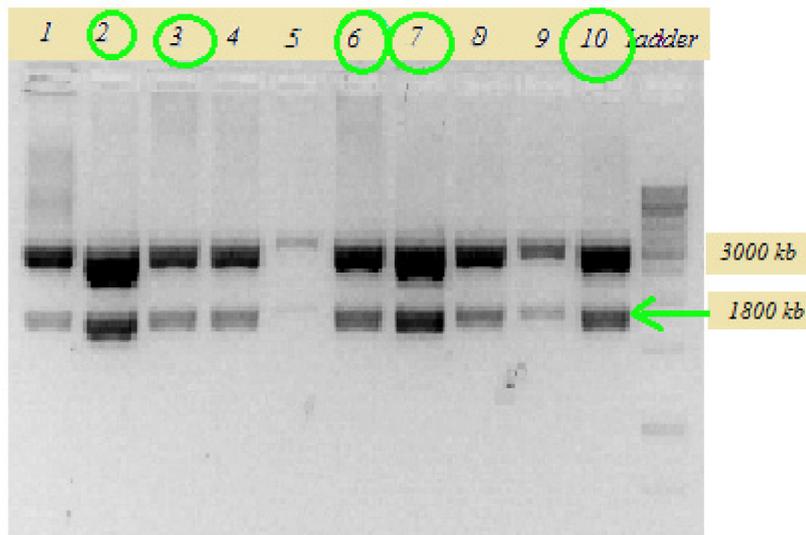


Figura 34: Patrón de electroforesis en gel de agarosa 1% de los posibles fragmentos de ADN viral clonados en el vector comercial pGEM®-T easy. *ladder*: marcador, 1 a 10: clones muestras. En círculo verde: clones seleccionados que se secuenciaron.

### 5.5.2.2. Análisis de secuencias

Todas las secuencias analizadas (Tabla 7) presentaron entre 96-99% de homología con *Sweet potato virus C* y en un porcentaje menor (entre 94-96%) con *Sweet potato feathery mottle*. Las secuencias que presentaron un 99% homología con *Sweet potato*

*virus C* lo hicieron con el número de acceso del *Genbank*: KF386015.1, siendo su referencia de Bejerman, *et al.* 2014.

Homología (%)						
Virus	Nº Acceso	clon 2	clon 3	clon 6	clon 7	clon 10
<i>Sweet potato virus C</i>	<a href="#">KF386015.1</a>	99%	98%	96%	99%	99%
<i>Sweet potato virus C</i>	<a href="#">KP115621.1</a>	96%	95%	94%	96%	97%
<i>Sweet potato feathery mottle virus</i>	<a href="#">AM076411.1</a>	96%	96%	94%	96%	97%

Tabla 7: Resumen de las homologías de los clones secuenciados contrastados utilizando el programa *Blast* del *NCBI* (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Según estableció la ICTV (*International Comitee for Virus Taxonomy*) se reconoció a la raza C del SPFMV como un virus separado de éste desde el 2010 (Jari Valkonen, 2010).

Acorde a lo esperado y a partir de tejido infectado fue posible extraer y secuenciar un fragmento del virus SPVC.

### 5.5.3. Preparación de la sonda de hibridación molecular. Prueba *Dot blot*

La eficiencia del marcado resulto aproximadamente que 1 ng/ul coincidente con la dilución 1/100 de la sonda para SPVC marcada desde el ADNc obtenido. (Fig. 35). Siendo entonces, la concentración de la sonda de **100ng/ul**.



Figura 35: Membrana de *nylon* para la estimación de la eficiencia de marcado del ADNc. A) Plásmido sin marcar (control negativo); B) ADNc marcado y C) ADN marcado (control positivo)

### 5.5.3.1. Hibridación molecular: Prueba *Dot blot*

La prueba de hibridación con la sonda marcada sobre las muestras utilizadas (Fig. 36) resultado reaccionar sólo para el control positivo hasta una dilución 1/1000.

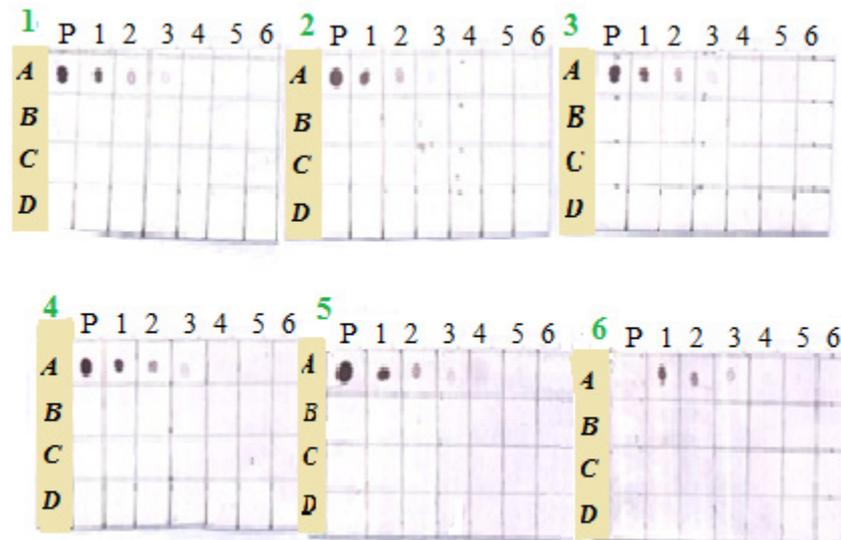


Figura 36: Membranas de *nylon* de la prueba de hibridación con ADNc marcado con digoxigenina. A) Plásmido sin marcar (control positivo); B) ARN Arapey sana, C) ARN Arapey enferma con EA y D) ARN Arapey enferma con SPVC (control positivo). P: puro. Diluciones 1)1/10 2)1/100 3)1/1.000 4)1/5.000 5)1/10.000 6)1/20.000. Diluciones de sonda marcada (1) 1.25 ng/ml (2) 2.5 ng/ml (3) 5 ng/ml (4) 10 ng/ml (5) 15 ng/ml (6) 20 ng/ml.

Esto se podría deber a que hubo fallas en la extracción o que el virus no se encontraba presente en la batata enferma.

### 5.5.4. Preparación de la sonda de hibridación molecular. Prueba *Southern blot*.

Las bandas obtenidas de las digestiones con enzimas combinadas fueron de 3000pb, 1050pb y 750pb para las realizadas con BE y 3000pb y 1590pb para las efectuadas con SE. Para esta última combinación no se visualizó una tercera banda posible correspondiente a 259pb en los geles “explorativo” y “preparatorio” (Fig. 37 y 38).

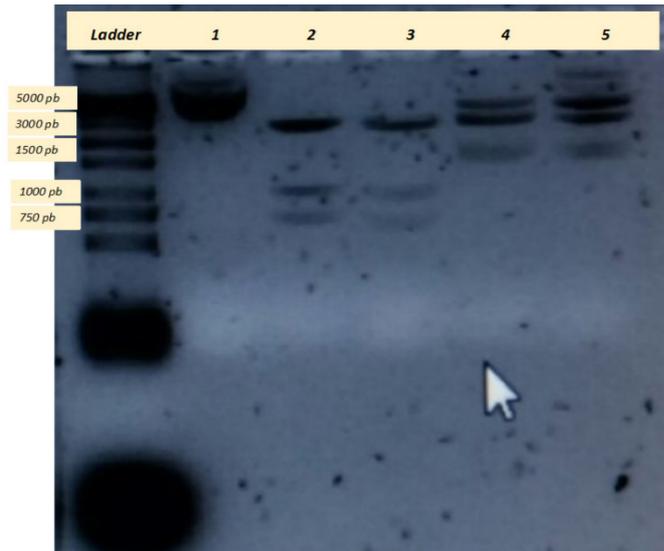


Figura 37: Patrón de electroforesis en gel de agarosa 2% “Gel exploratorio”. *Ladder*: marcador, 1)Plásmido sin digerir, 2)Plásmido digerido con BE<sub>1</sub>, 3) Plásmido digerido con BE<sub>2</sub>, 4)Plásmido digerido con SE<sub>1</sub> y 5)Plásmido digerido con SE<sub>2</sub>.

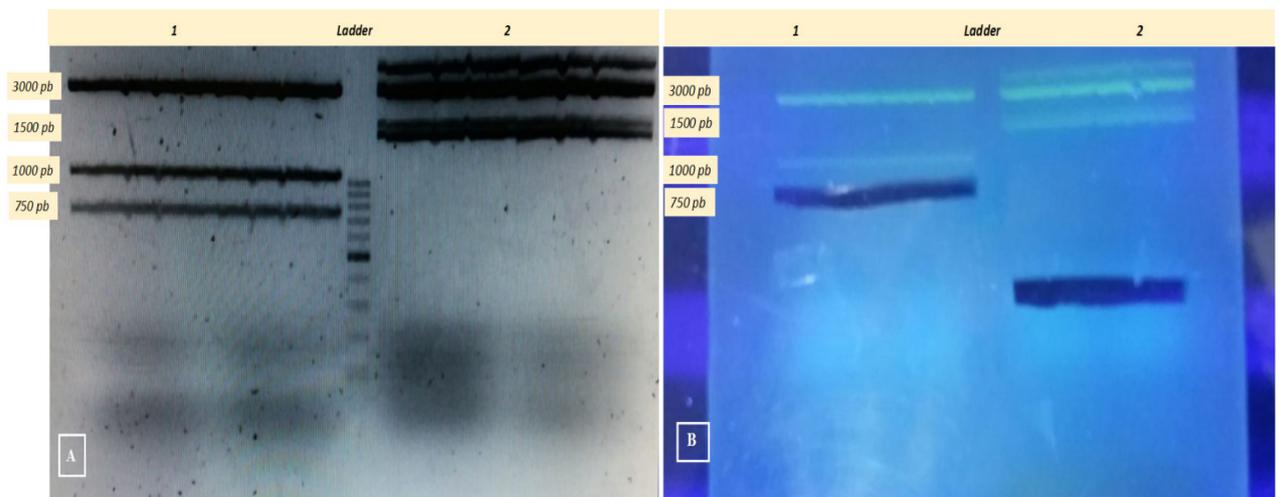


Figura 38: **A)** Patrón de electroforesis en gel de agarosa 2% “Gel preparativo”. *Ladder*: marcador, 1) Plásmido digerido con BE y 2) Plásmido digerido con SE. **B)** El mismo gel visto en luz UV donde se escindió las bandas a extraer el ADN.

Las bandas escindidas del “gel preparativo” fueron las de 750pb y 250pb aproximadamente, si bien no se visualizó ésta última, en el gel se intentó extraer el ADN. Se obtuvo sólo ADN y se armó la sonda de hibridación con lo extraído de la banda de 750pb (confirmado en el gel corrido de agarosa 1% de la Fig.39).

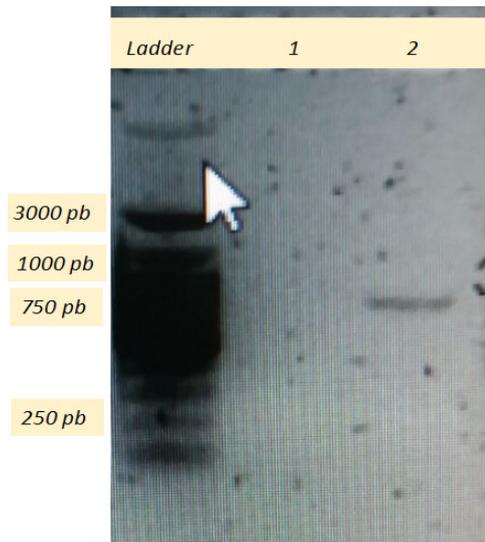


Figura 39: Patrón de electroforesis en gel de agarosa 1% de las extracciones del gel preparativo. 1) Banda 250pb, 2) Banda 750pb.

#### 5.5.4.1. Hibridación molecular: Prueba *Southern blot*

La prueba de hibridación con la sonda marcada sobre las muestras utilizadas (Fig. 40) detectó sólo control positivo: el plásmido del que se extrajo la sonda. No se detectó hibridación con ningún ADNc viral, ni siquiera en las muestras control. Posiblemente, las muestras poseían poco ADNc específico, deben ajustarse las condiciones de hibridación para aumentar la eficiencia de la misma en el contexto de las muestras de tejido.

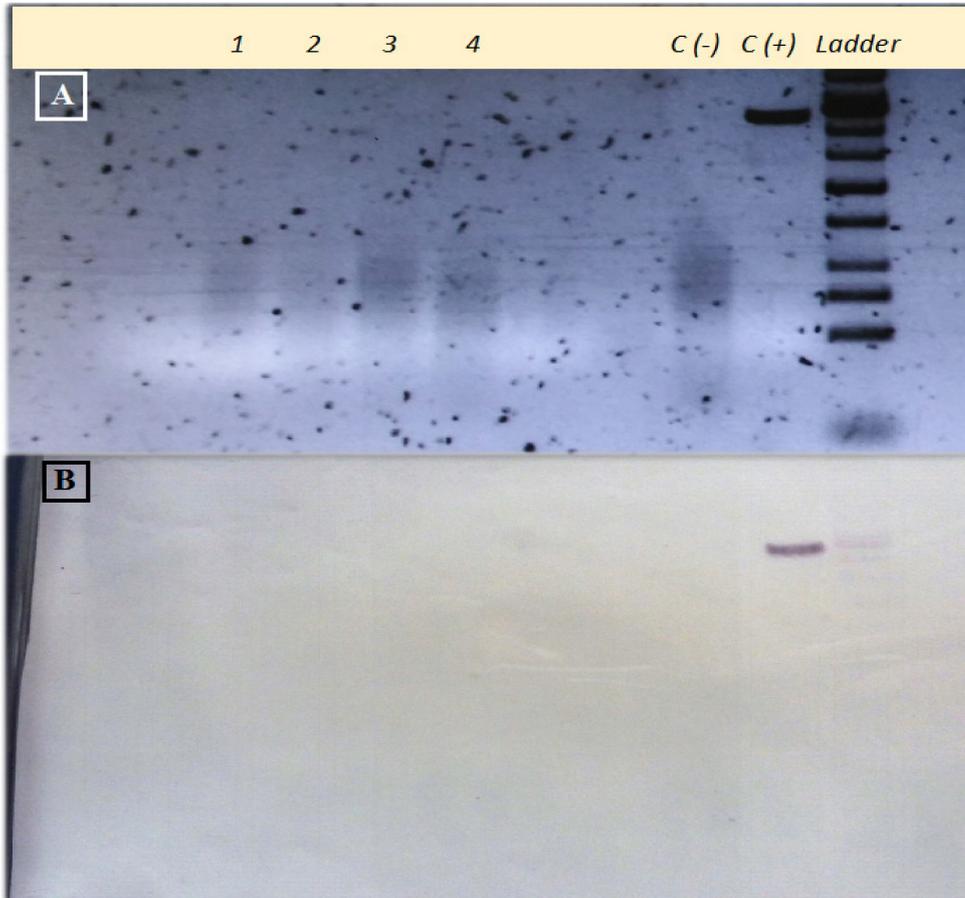


Figura 40: **A)** Patrón de electroforesis en gel de agarosa 1% de las muestras extraídas con Trizol. 1) Batata enferma con “encrespamiento amarillo” (contiene al SPVC), 2) *I. setosa* enferma con SPFMV, 3) Batata enferma con SPFMV, 4) Batata enferma sin diagnóstico, C(-): planta de batata sana, C(+): Plásmido y *Ladder*: marcador. **B)** membrana de hibridación.

## **6. DISCUSIÓN**

Respecto a la transmisión de *Sweetpotato feathery mottle virus* (SPFMV), la más efectiva fue a través de injerto de púa sobre la indicadora *I. setosa*, alcanzando un porcentaje del 100%. En la transmisión mecánica, sólo 17% de las plantas inoculadas de *I. nil* y 6% de las de *I. setosa* se infectaron. En el resto de las especies que constituyó el rango de hospedantes, no presentaron síntomas.

Mediante la separación de virus por áfidos (*oneprobe*), el porcentaje de transmisión fue también bajo, del 12% y la aparición de la sintomatología de las plantas infectadas fue a partir de los 17 días desde la inoculación. La misma consistió en "moteado plumoso" de venas (*vein banding*) y punteado clorótico, principalmente en hojas medias. Posteriormente, en hojas superiores, hubo remisión de síntomas, lo que ya fue informado en *I. setosa* con SPFMV (Kreuze and Fuentes, 2008). Se detectó por NCM-ELISA, la presencia del SPFMV, previamente separado por *one probe*, desde el complejo viral, y esto fue corroborado mediante los preparados de ISEM + D. Si bien en infecciones simples, este virus no se manifiesta fenotípicamente, o bien sólo causa síntomas leves, en infecciones mixtas con *Sweetpotato chlorotic stunt virus* (SPCSV), genera síntomas severos y pérdidas de rendimiento (Di Feo *et al.* 2000).

En cuanto a la caracterización serológica de SPFMV, mediante titulación por DAS-ELISA, se pudo determinar que de los antisueros locales obtenidos luego de su purificación, T1 fue el que dio mejores resultados (mayor diferencia entre lecturas de A<sub>405</sub> entre controles sanos y enfermos y ausencia de reacción en plantas sanas al emplear la inmunoglobulina y conjugado enzimático elaborados a partir del mismo)

Luego de la purificación viral que se realizó a partir de *I. setosa* inoculada con SPFMV aislado en la misma indicadora por *one probe*, se obtuvo, a través de las lecturas en nanodrop, que la banda superior fue la más limpia (por mayor pureza (1,227) (el valor de pureza de los *potyviruses* cercano a 1,20) (Zulaykha A. & Nabeel A., 2014.), aunque tuvo la mitad de concentración de virus que la banda inferior (0,070 y 0,142 mg/ml, respectivamente). Sin embargo, en la titulación con NCM-ELISA resultó ser de mayor calidad y más específico (menos reacción contra planta sana) el antisuero obtenido a partir de la inmunización con la banda inferior del preparado viral de la coneja T1, proveniente de 1° sangría a una dilución de 1/ 768000. Con el mismo, la

reacción colorimétrica de las muestras infectadas con SPFMV, fue intensa. Estos resultados se corroboraron con observaciones al M.E. de preparados de tinción negativa efectuados a partir de dicha banda de virus, donde hubo una notable decoración de las partículas virales.

Con respecto a la caracterización molecular del virus, del análisis de las secuencias obtenidas, resultó una homología del 99% con el virus *Sweet potato virus C (SPVC)*, contrastadas en el programa *Blast* del *NCBI*. Al respecto, según el ICTV que aprobó la propuesta de Valkonen (2010), SPVC, especie diferente del género *Potyvirus*, es la antigua raza C del SPFMV (SPFMV-C). SPVC forma parte del complejo viral EA junto a SPFMV-O, SPFMV-RC, SPVG, SPCSV y SPLCV, de acuerdo a Bejerman *et al*, 2016. A partir de su ácido nucleico fueron elaboradas dos sondas de hibridación molecular para su detección mediante sendas pruebas de hibridación (*Dot* y *Southern blot*). En primera instancia, una sonda de plásmido más inserto completo (4800pb) y otra de fragmento más corto (750pb), del ADNc del control positivo, no se obtuvo señal a partir de la hibridación de ADNc aislado de muestras infectadas en ninguna de las dos pruebas. Esto indicaría la necesidad de ajustar las diferentes variables de la hibridación, y de concentración de las muestras.

## **7. CONCLUSIONES GENERALES**

A través de este trabajo, se logró caracterizar biológica, serológica y molecularmente a *Sweet potato virus C* (aislado del cv Arapey INIA), presente en Argentina y, sumado a los aspectos moleculares previamente estudiados (Bejerman, *et al.* 2016), se completó la caracterización del patógeno, que forma parte del complejo “encrespamiento amarillo” que afecta de manera severa al cultivar de batata en nuestro país en el actualidad.

La banda inferior obtenida de la purificación resultó ser la más adecuada para la obtención del antisuero para este virus (mayor concentración viral)

Los ensayos biológicos y/o serológicos no logran diferenciar a SPFMV de SPVC cuando las plantas están infectadas ya sea con una o más razas del primer virus o con ambos virus no resultando fiables para su diagnóstico. Ensayos basados en ácidos nucleicos proporcionan la ventaja de una detección confiable de virus en las plantas infectadas y la sonda de hibridación es un instrumento específico para diagnóstico, el presente estudio permitió obtener una sonda de hibridación para detectar específicamente al *Sweet potato virus C*, aunque son necesarias pruebas ulteriores que permitan concluir al respecto.

## **8. BIBLIOGRAFIA**

Abad, J.A. and Moyer, J.W. 1992. Detection and distribution of sweetpotato feathery mottle virus in sweetpotato by in vitro-transcribed RNA probes (riboprobes), membrane immunobinding assay, and direct blotting. *Phytopathology* 82: 300-305.

Adams, M.J., Antoniw, J.F., Fauquet C.M. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Arch Virol* 150:459–479

Alvarez, V., Ducasse, D. A., Biderbost, E., and Nome, S. F. 1997. Sequencing and characterization of the coat protein and 3' non-coding region of a new sweet potato potyvirus. *Arch. Virol.* 142:1635-1644.

Ateka, E. M., Barg, E, Njeru, R. W., Lesemann, D.-E., and Vetten, H. J. 2004. Further characterization of “sweetpotato virus 2”. *Arch. Virol.* 149: 225-239.

Bejerman, N., Zanini, A., Luque, A., Rodríguez Pardina, P. y Di Feo, L. del V. 2014. Uso de *next-generation sequencing* para la caracterización de los aislamientos argentinos de *Sweet potato virus C* (SPVC) y *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) y desarrollo de *multiplex RT-PCR* para su detección simultánea. XXXVII Congreso Argentino de Horticultura. Resumen N° 141. pp 42. Mendoza. Argentina.

Bejerman, N.; Zanini, A.; Rodriguez Pardina, P.; Di Feo, L. 2016. Use of next-generation sequencing for the characterization of Sweet potato virus C and Sweet potato feathery mottle virus isolates from Argentina and development of a multiplex one-step RT-PCR for their simultaneous detection. *Journal of Phytopathology*.

Biderbost, E., Brugnoli, E., Mollinedo, V. y Di Feo, L. 1990. Estimación de daños producidos por el *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) en la cv Morada INTA de batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Revista de Investigaciones Agropecuarias (RIA)*. Volumen XXII (1): 251-255.

Biderbost, E.; Di Feo, L. y Mollinedo, V. 1993. Prospección de virosis en cultivos de batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) en zonas productoras de las

provincias de Córdoba, Buenos Aires, Santiago del Estero, Tucumán y Formosa. *Horticultura Argentina* 8-12 (18-32): 41-46.

Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). 'Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996'.

Carey, E.E., Gibson, R.W., Fuentes, S., Machmud, M., Mwanza, R.O.M., Turyamureeba, G., Zhang, L. Ma, D., Abo El-Abbas, F., El-Bedewy, R. and Salazar L.F. 1999. The causes and control of virus diseases of sweet potato in developing countries: is sweet potato virus disease the main problem? In: *Impact on a changing world, Program Report 1997-1998*. The International Potato Center. Lima. Perú, pp. 241-248.

Castellano, P.; Biderbost, E.; Ducasse, D. y Di Feo, L. 1995. Influencia del ambiente en la manifestación del "enanismo clorótico" de la batata. *Actas del XVIII Congreso Argentino de Horticultura*. pp 79. Termas de Río Hondo. Santiago del Estero. Argentina.

Castellano, P.; Biderbost, E.; Ducasse, D. y Di Feo, L. 1996. Relación *planta- patógeno- ambiente* en la expresión del enanismo clorótico de la batata. *Actas del XIX Congreso Argentino de Horticultura*. pp 24. San Juan. Argentina.

CIP, 1999. *CIP Sweetpotato Facts, a compendium of key figures and analysis for 33 important sweetpotato-producing countries*. International Potato Center, Lima, Peru.

CIP, 2000. *Annual Report*. International Potato Center, Lima, Peru.

CIP, 2006. *Annual Report*. International Potato Center, Lima, Peru.

Clark, M. F., and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.

Clark, C. A., and Moyer, J. W. 1988. *Compendium of Sweet Potato Diseases*. The American Phytopathology Society, St. Paul, MN.

Cohen, J., Franck, A., Vetten, H. J., Lesemann, D. E., and Loebenstein, G. 1992. Purification and properties of closterovirus-like particles associated with a whitefly-transmitted disease of sweet potato. *Ann. Appl. Biol.* 121:257-268.

Colinet, D., Kummert, J., Lepoivre, P., and Semall, J. 1994. Identification of distinct potyvirus in mixedly-infected sweetpotato by polymerase chain reaction with degenerate primers. *Phytopathology* 84: 65-69.

Colinet, D., Kummert, J., and Lepoivre, P. 1997. Evidence for the assignment of two strains of SPLV to the genus Potyvirus based on coat protein and 3' non-coding region sequence data. *Virus Res.* 49: 91-100.

Colinet, D., Nguyen, M., Kummert, J., Lepoivre, P., and Xia, F.Z. 1998. Differentiation among potyviruses infecting sweetpotato based on genus- and virus-specific reverse transcription polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 82: 223-229.

Conci L.R. y Guzmán, F.A. 1999. Sondas de hibridación molecular para la detección del mal de Río Cuarto (MRCV). In: Métodos para detectar patógenos sistémicos. D.M. Docampo and S.L. Lenardon, eds. FFIVE-INTA-JICA, Córdoba, pp. 95-98.

Di Feo, L. 1988. Nueva enfermedad de batata en Argentina. Boletín de la Filial Córdoba de la Asociación Argentina de Microbiología 2.

Di Feo, L. and S. Nome. 1990a. Chlorotic Dwarf: a New Sweet Potato Disease in Argentina. Newsletter International Working Group on Sweet Potato Viruses (IWGSPV) N°3.

Di Feo, L., M.P. Giménez Pecci and S. F. Nome. 1990b. Purification and Serology of the Causal Agent of "Chlorotic Dwarf" in Sweet Potato in Argentina. Newsletter International Working Group on Sweet Potato Viruses (IWGSPV) N°3.

Di Feo, L. del V.; Ducasse, D.A. y Nome S.F. 1992. Un método eficiente y rápido de purificación de el o los agentes causales del "enanismo clorótico" en batata. Resúmenes de las VIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Paraná. Argentina.

Di Feo, L. y Córdoba, A. 1993. Implementación de una técnica eficaz para la detección del "enanismo clorótico" en batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). Revista Simiente (Chile) 63(1): 59-60.

Di Feo, L.; S.F. Nome, E. Biderbost, S. Fuentes y L. Salazar. 1998. Aportes al esclarecimiento de la etiología del enanismo clorótico de la batata. Fitopatología 33(1): 24 (abstract). ISSN 0430-6155.

Di Feo, L.; Castellano, P.; Biderbost, E. and Nome, S. 1999a. Resistant Reaction of the sweet potato (*Ipomoea batatas*) cultivar Morada INTA to the sweet potato feathery mottle virus and sweet potato mild speckling virus complex. *Fitopatología Brasileira* 24 (3): 451- 454. ISSN 0100-4158.

Di Feo, L. del V. y Nome, S. F. 1999b. Potyvirus del complejo viral del enanismo clorótico de la batata (*Ipomoea batatas*). En: Métodos para detectar patógenos sistémicos. Docampo, D.M. y Lenardon, S.L. eds. IFFIVE-INTA-JICA. Córdoba. Argentina. Pp 123- 126.

Di Feo, L., Nome, S.F., Biderbost, E., Fuentes, S. and Salazar, L. 2000. Etiology of Sweet potato chlorotic dwarf disease in Argentina. *Plant Disease* 84: 35- 39.

Faostat 2014. [Food and Agriculture Organization of the United Nations. DOWNLOAD DATA. Disponible en: http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E.](http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E)

Fauquet, C.M.; Mayo, M. A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, L. 2005. *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* 1259 pp. Edit. Elsevier. Academic Press.

Flugie, K. 2007. Priorities for sweet potato research in developing countries. Results of a survey. *HortScience* 42: 1200-1206.

Fuentes, S. and Salazar, L.F. 1992. Identification of a new sweetpotato virus. *Fitopatologia* 27: 50 (Abstr., in Spanish).

Fuentes, S. 1994. Preliminary identification of a sweetpotato virus (C-6). *Fitopatologia* 29: 38 (Abstr., in Spanish).

Fuentes, S., Mayo, M., Jolly, C.A., Nakano, M., Querci, M., and Salazar, L.F. 1996. A novel luteovirus from sweetpotato, sweetpotato leaf speckling virus. *Ann. appl. Biol.* 128: 491-504.

Gibbs A. and Mackenzie, A. 1997. A primer pair for amplifying part of the genome of all 'potyvirids' by RT-PCR. *J. Virol. Methods* 63:9–16.

Grion, A. 2008. Relevamiento de la producción de batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) en el norte de la provincia de Córdoba. Campaña 2007- 2008. AER Jesús María.

Gutiérrez, D., Fuentes, S., Salazar, L.F. 2003. Sweet potato virus disease (SPVD): Distribution, incidence and effect on sweet potato yield in Peru. *Plant Disease* 87: 297-302.

Green, S.K., Kuo, Y.J., and Lee, D.R. 1988. Uneven distribution of two potyviruses (feathery mottle virus and sweetpotato latent virus) in sweetpotato plants and its implication on virus indexing of meristem derived plants. *Tropical Pest Management* 34: 298-302.

Hollings, M., Stone, O.M. and Bock, K.R. 1976. Purification and properties of sweet potato mild mottle, a white-fly borne virus from sweet potato (*Ipomoea batatas*) in East Africa *Ann. appl. Biol.* 82: 511.

ICTV, 2015. Master Species List (MSL29) Versión 3. Disponible en: <http://ictvonline.org/>

Italia, R. 1991. Difusión de plantines de batata libres de virus en jaulas antiáfidos y zonas aisladas. Seis años de experiencia a campo con productores en la provincia de Córdoba. Informe Técnico N° 22. Agencia de Extensión Rural Jesús María. Pcia de Córdoba. 15 pp.

Italia, R. 2003. La batata en la provincia de Córdoba. Ciclo 2002-2003. Boletín Informativo N° 5. Ediciones INTA. ISBN: 1666-6720. Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/manfredi/info/boletines/extension/frutales/lf-bole5.pdf>

Jordan, R. and Hammond, J. 1991. Comparison and differentiation of potyvirus isolates and identification of strain-, virus- subgroup-specific and potyvirus group-common epitopes using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 72: 25-36.

Karyeija, R.F., Gibson, R.W. and Valkonen, J.P.T. 1998. The significance of sweet potato feathery mottle virus in subsistence sweet potato production in Africa. *Plant Disease* 82, 4-15.

Karyeija, R.F., Kreuze, J.F., Gibson, R.W., and Valkonen, J.P.T. 2000. Synergistic interactions of a potyvirus and a phloem-limited crinivirus in sweetpotato plants. *Virology* 269: 26-36.

Kennedy, G. G. and Moyer, J. M. 1982. Aphid transmission and separation of two strains of sweet potato feathery mottle virus from sweet potato. *J. Econ. Entomol.* 75: 130-133.

King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. 2012. Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1327 pp. Editorial San Diego: Elsevier Academic Press. ISBN : 978-0-12-384684-6

Kokkinos, C. D. and Clark, C. A. 2006a. Interactions among *Sweetpotato chlorotic stunt virus* and different potyviruses and potyvirus strains infecting sweetpotato in the United States. *Plant Dis.* 90:1347-1352.

Kreuze J.F., Karyeija R.F., Gibson R.W. y Valkonen J.P.T. 2000. Comparisons of coat protein gene sequences show that East African isolates of Sweet potato feathery mottle virus form a genetically distinct group. *Archives of Virology* 145: 567-574.

Kreuze, J. y Fuentes, S. (2008). "Sweetpotato Viruses." International Potato Center (CIP), Lima, Perú. Ed. Elseiver.

Kreuze, J. F., Pérez, A. Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barrer, I. and Simon R. 2009. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology* 388: 1-7.

Kwak, H., Kim, M., Shin, J., Lee, Y., Seo, J., Lee, H., Jung, M., Kim, S. and Choi, H. 2014. The Current Incidence of Viral Disease in Korean Sweet Potatoes and Development of Multiplex RT-PCR Assays for Simultaneous Detection of Eight Sweet Potato Viruses. *Plant Pathol J.* 30 (4):416-424

Lawson, RH, Hearon, S.S. and Smith, F.F. (1971). Development of pinwheel inclusions associated with sweet potato russet crack virus. *Virology* 46:453-463.

Liao, C.H., Chien, K., Chung, M.L., Chiu, R.J., and Han, Y.H. 1979. A study of a sweetpotato virus disease in Taiwan. I. Sweetpotato yellow spot virus disease. *J. agric. Res. China* 28: 127-137.

Lizarraga, C. and Fernandez-Northcote, E. N. 1989. Detection of potato viruses X and Y in sap extracts by a modified indirect enzymelinked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (NCM-ELISA). *Plant Dis.* 73:11- 14.

Loebenstein, G and Thottappilly. G., Fuentes, S. and Cohen, J. 2009. Virus and Phytoplasma Diseases. En: *The Sweet Potato*. Ed.: Loebenstein, G and Thottappilly. Springer, Holanda. Pp: 105-134.

Lommel, S. A. and McCain, A.H. and Morris, T. J. 1982. Evaluation of indirect enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Phytopathology* 72: 1018-1022.

Lotrakul, P. and Valverde, R.A. 1999. Cloning of a DNA-like genomic component of *Sweetpotato leaf curl virus*: nucleotide sequence and phylogenetic relationships. *Mol. Plant Path.* On-line <http://www.bspp.org.uk/mppol/1999/0422lotrakul/index.htm>

Lotrakul, P., Valverde, R.A., Clark, C.A., Fauquet C.M. 2003 Properties of a begomovirus isolated from sweetpotato (*Ipomoea batata* (L) Lam.) infected with *Sweetpotato leaf curl virus*. *Rev. Mexicana de Fitopatología* 21: 128-136.

Lyerly, J.H., New, S.L., Abad, J.A., and Moyer, J.W. 2003. Identification of sweetpotato viruses using an RT-PCR based method. *Phytopathology* 93: S55.

Luque, A., Nome, C., López Colomba, E., Faroni, A., Rodríguez Pardina, P., Fuentes Delgado, S. y Di Feo, L. 2010. Nueva etiología viral de batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) en Argentina. Libro de Resúmenes XXXIII Congreso Argentino de Horticultura. pp: 395

Martí, H. 2007. Nutritiva, saludable, “casi perfecta”. *Revista Alimentos Argentinos* 39: 48-50.

Martí, H. 2009. La batata: oportunidades para una hortaliza subutilizada. Disponible en: [http://inta.gob.ar/documentos/la-batata-opportunidades-para-una-hortaliza-subutilizada/at\\_multi\\_download/file/hm\\_0901.pdf](http://inta.gob.ar/documentos/la-batata-opportunidades-para-una-hortaliza-subutilizada/at_multi_download/file/hm_0901.pdf) Modificado 10/10/2011.

Martino, J.; Di feo, L.; Pardina, P. 2015. Begomovirus de batata en argentina. Editorial Académica Española. ISBN 978-3-659-09489-7. pp 97

Milgram, M., Cohen, J., and Loebenstein, G. 1996. Effects of sweetpotato feathery mottle virus and sweetpotato sunken vein virus on sweetpotato yields and rate of reinfection on virus-free planting material in Israel. *Phytoparasitica* 24: 189-193.

Milne, R.G. and D. E. Leseman. 1978. An immuno-electron microscopy investigation of oat sterile dwarf and related viruses. *Virology* 90: 299-304.

Moyer, J. W., and Kennedy, G. G. 1978. Purification and properties of sweet potato feathery mottle virus. *Phytopathology* 68:998-1004.

Moyer, J.W. and Cali, B.B. 1985. Properties of sweetpotato feathery mottle virus RNA and capsid protein. *J. Gen. Virol.* 65: 1185-1189.

Moyer, J.F. 1986. Variability among strains of sweetpotato feathery mottle virus *Phytopathology* 76: 1126. (Abstr.).

Moyer, J. W., and Salazar, L. F. 1989. Viruses and viruslike diseases of sweet potato. *Plant Dis.* 73:451-455.

Mukasa, S. B., Rubaihayo, P.R., Valkonen, J.P.T. 2006. Interactions between a crinivirus, an ipomovirus and a potyvirus in coinfecting sweet potato plants. *Plant Pathol.* 55: 458- 467.

Njeru, R. W. ; Mburu, M.W. K., Cheramgoi, E., Gibson, R. G., Kiburi, Z.M. Obudho, E., Yobera, D. 2004. Studies on the physiological effects of viruses on sweet potato yield in Kenya. *Ann. Appl. Biol.* 145: 71-76.

Nome, S.F. 1973. Sweetpotato vein mosaic in Argentina. *Phytopatho Z.* 77: 44-45.

Nome, S. F., and Docampo, D. 1974. Incidencia del virus del mosaico de las nervaduras (sweet potato vein mosaic virus) en rendimientos en batata. Pages 1-6 in: IDIA-INTA No. 315-316.

Nome, S. F., Giorda, L. M., and Vázquez, A. 1980. El virus del moteado plumoso de la batata (sweet potato feathery mottle virus) en Argentina. *Rev. Invest. Agropecuarias.* Vol. 15, no. 4: 625-634. INTA, Buenos Aires, República Argentina.

Nome, S. F. y Di Feo, L. 1999 Virosis del Enanismo Clorótico de la batata. 5pp. En: Enfermedades Causadas por Virus y Fitoplasmas en Cultivos Extensivos-

Intensivos. Proyecto de Investigaciones en Fitovirología. IFFIVE INTA-JICA. Editorial: Biglia Impresores. Editor. Sergio Lenardon. ISSN 1514 – 2736. Córdoba. Argentina

Nome, S.F.; Di Feo, L.; Martí, H.; Mitidieri, I.; Nome, C.; Pérez, B.A. 2007. Enfermedades de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (batata, camote). En: Atlas e Índice de las Enfermedades de las Plantas Cultivadas y Nativas Explotadas de Argentina. Eds: Nome, S.F.; Docampo, D.M.; Laguna, I.G. INTA, Córdoba, Argentina. URL: <http://www.fitopatoatlas.org.ar/default.asp?hospedante=712>

Nome, C. F., Laguna, I. G. and Nome, S. F. 2006. Cytological alterations produced by Sweetpotato mild speckling virus. J. Phytopathol. 154: 504-507.

Onwueme, I.C. and Charles, W.B. 1994. Tropical root and tuber crops. FAO Plant Production and Protection Paper 126 FAO of UN, Rome, Italy.

Parent, J. G., Berlinger, F., Desjardins, S., and Brisson, J. D. 1985. Dot-immunobinding for detection of tomato mosaic virus and potato virus X, infecting greenhouse tomatoes. Phytoprotection 66:53-57.

Pozzer, I., Dusi, A.N., Lima, M.I., and Kitajima, E.W. 1995. Characterization of a Brazilian isolate of sweetpotato feathery mottle virus infecting sweetpotato. *Fitopat. Brasil*. 20: 65-71.

Roche Applied Science. 2004. *Dig DNA Labeling and Detection Kit*. Instruction Manual, for filter hybridization.

Rodríguez Pardina, P., Luque, A., Nome, C., López Colomba, E., Fuentes Delgado, S. y Di Feo, L. (2012 a). "Caracterización de un aislamiento argentino del *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV) y ajuste de un método para su detección." XXXV Congreso Argentino de Horticultura, Corrientes.

Rodríguez Pardina, P., Luque, A., Nome, C., López Colomba, E., Fuentes Delgado, S. y Di Feo, L. (2012 b). "First report of *Sweet potato leaf curl virus* infecting sweet potato in Argentina." Australasian Plant Pathology Society.

Rodríguez Pardina, P., Bejerman, N., Luque, A. y Di Feo, L. (2012 c). "Complete nucleotide sequence of an Argentinean isolate of *Sweet potato virus G*." *Virus Genes*: 1-3.

SAGPyA. 2008. Información de Producción Hortícola. Dirección de Mercados Agroalimentarios. [en línea] Disponible en: <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas/dma/hortalizas/hortalizas.php>.

Sakai, J., Mori, M., Morishita, T., Tanaka, M., Hanada, K., Usugi, T. and Nishiguchi, M. 1997. Complete nucleotide sequence and genome organization of sweet potato feathery mottle virus (S strain) genomic RNA: the large coding region of the P1 gene. *Arch. Virol.* 142: 1553-1562.

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1.74-1.84.

Scott, G. J., Best, R., Rosegrant, M., and Bokanga, M. 2000. Roots and tubers in the global food system: a vision statement for the year 2020. CIP, CIAT, IFPRI, IITA, IPGRI. Lima, Perú.

Shaefers, G. A., and Terry, E. R. 1976. Insect transmission of sweet potato disease agents in Nigeria. *Phytopathology* 66:642-645.

Sheffield, F.M.L. 1957. Virus diseases of sweetpotato in East Africa. I. Identification of the viruses and their insect vectors. *Phytopathology* 47: 582-590.

Shinkai, A. 1979. Sweetpotato leaf curl disease. *Agric. and Hortic.* 54: (1).

Souto, E. R., Sim, J., Chen, J., Valverde, R. A., and Clark, C. A. 2003. Properties of strains of Sweetpotato feathery mottle virus and two newly recognized potyviruses infecting sweetpotato in the United States. *Plant Dis.* 87:1226-1232

Tairo F., Mukasa, S.B., Jones, R.A.C., Kullaya, A., Rubaihayo, P.B., Valkonen, J.P.T. 2005 Unraveling the genetic diversity of the three main viruses involved in Sweet Potato Virus Disease (SPVD) and its implications. *Mol. Plant Pathol.* 6:199–211

Untiveros, M., Fuentes, S., and Salazar, L.F. 2006. Synergistic Interaction of *Sweetpotato chlorotic stunt virus (Crinivirus)* with Carla-, Cucumo-, Ipomo-, and Potyviruses Infecting Sweetpotato. *Plant Dis.* 91:669-676

Untiveros, M., Fuentes, S., and Kreuze, J. 2007. Molecular variability of sweetpotato feathery mottle virus and other potyviruses infecting sweetpotato in Peru. *Arch. Virol.* Online (DOI 10.1007/s00705-007-0019-0)

Untiveros, M., Fuentes, S. and Kreuze, J. 2008. Molecular variability of sweet potato feathery mottle virus and other potyviruses infecting sweet potato in Peru. *Archives of Virology* 153: 473-483.

Untiveros, M., Quispe, D. and Kreuze, J. 2010. Analysis of complete genomic sequences of isolates of the Sweet potato feathery mottle virus strains C and EA: molecular evidence for two distinct potyvirus species and two P1 protein domains. *Archives of Virology* 155(12): 2059-2063

Woolfe, J.A. 1992. Sweetpotato, an untapped food resource. Cambridge University Press, New York.

Yamasaki, S., Goto, H., Hanada, K. and Sakai, J. 2008. A Protective mild strain of sweetpotato feathery mottle virus (SPFMV), its use for control of sweetpotato russet crack disease, and successful production of sweet potato resistant to SPFMV severe strain. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DL174876.1>

Yamasaki, S., Sakai, J., Fuji, S., Kamisoyama, S., Emoto, K., Ohshima, K. and Hanada, K. 2010. Comparisons among isolates of Sweet potato feathery mottle virus using complete genomic RNA sequences. *Arch. Virol.* 155: 795-800.

Zhang, D., Ghislain, M., Huaman, Z., Golmirzaie, A. and Hijmans, R.J. 1998. RAPD variation in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars from South America and Papua New Guinea. *Genetic Resources and Crop Evolution* 45: 271-277.

Zhang, D., Cervantes, J., Huaman, Z., Carey, E. and Ghislain, M. 2000. Assessing genetic diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars from tropical America using AFLP. *Genetic Resources Crop Evolution* 47: 659-665.

Zulaykha A. A. N. And Nabeel A. K., 2014. Potato Virus Y (PVY) Purification and Antiserum Preparation. *Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)*. Volume 7, PP 09-12 e-ISSN: 2319-2380, p-ISSN: 2319-2372

## **ANEXO**

### **PROTOCOLO 1: *Nitrocellulose membrane* - ELISA (NCM-ELISA)**

- 1- Macerar 1 disco de hoja sintomática de 1cm en 1 ml de tampón de extracción (1/50 P/V). Dejar la muestra por 30-45 min. a temperatura ambiente hasta separación de fases.
- 2- Prehumedecer la membrana de nitrocelulosa en tampón TBS, durante 5 min. previo a su uso.
- 3- Colocar la membrana sobre la placa de ELISA perforada, conectada a bomba de vacío.
- 4- Sembrar 30 µl de sobrenadante de muestra macerada en cada celdilla.
- 5- Remover la membrana de nitrocelulosa del aparato y permitir que se airee por 30 min.
- 6- Colocar en tampón de bloqueo. Incubar 1hora a temperatura ambiente sobre agitador vaivén.
- 7- Colocar la membrana en el primer antisuero (As específico) diluido en tampón de antisuero. Incubar toda la noche sobre agitador vaivén a temperatura ambiente. Lavar la membrana en TTBS tres veces por 3 min. sobre agitador vaivén.
- 8- Incubar la membrana por 1hora en el segundo antisuero (cabra anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina de Biorad) diluido 1: 3000 en tampón antisuero (sobre agitador vaivén, a temperatura ambiente).
- 9- Lavar la membrana en TTBS cuatro veces por 3 min. sobre agitador vaivén
- 10- Incubar la membrana en sustrato (NBT + BCIP) diluido en tampón sustrato (solución de revelado). Generalmente se incuba por 30 min. en la solución de sustrato.
- 11- Parar cortar la reacción de color sumergir la membrana de nitrocelulosa en agua destilada por 10 min.

**TAMPONES 1:****TBS:**

Tris Base 0,02M

NaCl 0,5M

Na<sub>3</sub>N 0,02%

Ajustar el pH con HCl puro hasta 7,5

**Tampón de extracción:**

TBS

SO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> 0,2%

**Tampón de bloqueo**

TBS

Leche descremada 2%

Tritón X-100 2%

**Tampón de antisuero**

TBS

Leche en polvo 2%

**Tampón de lavado (TTBS)**

TBS

Tween 20 0,05%

**Tampón de sustrato (500 cm<sup>3</sup>)**

Tris base 6,05g (0,1M)

NaCl 2,92g (0,1M)

MgCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O 0,51g (5mM)

Na<sub>3</sub>N 0,1g (0,2%)

**Soluciones stock de NBT (Nitro Blue Tetrazolium) y BCIP (5 Bromo, 4-Cloro, 3-Indolyl Phosphate)**

**NBT:** 40 mg de NBT se disuelven en 2 cm<sup>3</sup> N-N dimetilformamida

**BCIP:** 20 mg de BCIP se disuelven en 2 cm<sup>3</sup> N-N dimetilformamida

Mezclar bien y guardar protegido de la luz

**Solución de revelado:**

En 20 cm<sup>3</sup> de tampón sustrato disolver 100 µl de solución stock de NBT. Una vez disuelto agregar 100 µl de solución stock de BCIP gota a gota.

**PROTOCOLO 2: ISEM + D en Microscopio electrónico de transmisión (Zeiss)**

- 1- Diluir el antisuero 1/2 con tampón fosfato
- 2- Colocar la grilla sobre una gota de la dilución 1/50.
- 3- Llevar a cámara húmeda durante 5 min. Lavar con 25-30 gotas de tampón fosfato, secar el exceso con papel de filtro.
- 4- Macerar el material vegetal 1/10 (P/V) con tampón extracción. Llevar a cámara húmeda durante 15min.
- 5- Lavar con 50 gotas de tampón extracción y secar.
- 6- Colocar la grilla sobre una gota del antígeno (material macerado con tampón)
- 7- Llevar a cámara húmeda durante 15 min.
- 8- Lavar con 50 gotas de tampón y secar con papel de filtro.
- 9- Agregar 1 gota de antisuero diluido 1/2
- 10- Llevar a cámara húmeda durante 15min.
- 11- Lavar con 60 gotas de agua destilada, sólo retirar el exceso y agregar 7 gotas de acetato de uranilo 2%. Retirar el exceso secando con papel de filtro (pasándolo a éste dentro de la pinza, por debajo de la pinza y por debajo de la rejilla, nunca por arriba porque removeríamos lo que está sobre ella.

**TAMPONES 2**

**Buffer fosfato salino, PBS [10 mM]**

ClNa: 8g

PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K: 0.2g

PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub> · 12 H<sub>2</sub>O: 2,9g

ClK: 0,2g

NaN<sub>3</sub>: 0,2g

Medir pH= 7,4 y llevar a 1000 ml con agua destilada.

### **Tampón extracción**

PBS: 1000ml

Tween 20 0,05%

PVP 2%

SO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> 0,2%

### **PROTOCOLO 3: Purificación de Inmunoglobulina (IgG)**

- 1- Tomar 1 ml de IgG añadir 9 ml de H<sub>2</sub>O destilada y colocar en un tubo de centrifuga.
- 2- Agregar gota a gota y bajo agitación 10 ml sulfato de amonio saturado [SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (750 g/L)], dejar en reposo a temperatura ambiente durante 45 min.
- 3- Precipitar la proteína centrifugando a 13.000 rpm por 15 min. a 4°C.
- 4- Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 1 ml de tampón de dializado (**ver Tampones 3**).
- 5- Colocar la muestra en tubos de dializado y dializar a 4°C contra tampón de dializado, haciendo tres cambios de este tampón de 500ml cada uno (a las 4 horas, después de toda la noche y a las 4 horas siguientes).
- 6- Pasar a tubos *ependorf* rotulados y hacer diluciones para cuantificar la IgG mediante uso de espectrofotometría A<sub>280</sub>, a fin de determinar 1mg/ml corresponde A<sub>280</sub>=1,4.
- 7- Añadir unos granos de ázida sódica como preservante.

**PROTOCOLO 4: Preparación de conjugado enzimático con enzima fosfatasa alcalina**

- 1- Preparar 1ml IgG con 2500 unidades de fosfatasa alcalina y 20µl glutaraldehído 25% (1/10 en PBS; ver **Tampones 2**).
- 2- Dejar reposar por 2 horas a temperatura ambiente.
- 3- Dializar a 4°C contra PBS conteniendo 1 % glicina, realizar cuatro cambios de PBS de 1000 ml cada uno, cada 3 horas.
- 4- Dializar, por último, contra PBS conteniendo MgCl<sub>2</sub> 1mM y ZnCl<sub>2</sub> 1mM hasta el día siguiente.
- 5- Pasar a tubos *ependorf* rotulados, añadir 5 mg de albúmina de suero bovino por cada 1 ml de conjugado enzimáticos y unos granos de azida sódica.

**TAMPONES 3**

**Tampón de dializado, PBS 1/2**

CINa: 4g

PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K: 0,1g

PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub>. 12 H<sub>2</sub>O: 1,45g

ClK: 1g

NaN<sub>3</sub>: 0,1g

Medir pH= 7,4 y llevar a 1000 ml con agua destilada.

**Tampón *Coating***

CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>: 1,59g

CO<sub>3</sub>HNa: 2,93g

NaN<sub>3</sub>: 0,20g

Medir pH= 9,6 y llevar a 1000 ml con agua destilada

**Tampón Enzima**

PBS: 1000 ml

Tween 20 0,05%

PVP 2%

Leche descremada 2%

### **PROTOCOLO 5: Purificación viral**

- 1- Cosechar aproximadamente 120 g de hojas sintomáticas.
- 2- Macerar con licuadora en tampón borato 0,5M + EDTA 0,01M, pH 8 (1/2 P/V: 240 ml). Luego trasvasar el homogenato a *beaker* y, bajo campana de extracción, agregar 120 ml de cloroformo (1/1 P/V), 120 ml de tetracloruro de carbono (1/1 P/V) y 120µl de ácido tioglicólico, y homogeneizar con politrón.
- 3- Pasar el homogenato a botellas de acero
- 4- Centrifugar a 11.000 rpm por 15 min.
- 5- Trasvasar la fase acuosa con pipeta, sin tocar el *precipitado*.
- 6- Sembrar la fase acuosa recogida en el paso anterior en colchón de sacarosa al 25% en tampón borato 0,05M + EDTA 0,001 M pH 8.
- 7- Ultracentrifugar a 33.500 rpm durante 2hs.
- 8- Resuspender el precipitado en 800µl de tampón borato 0,05M + EDTA 0,001 M pH 8 con pipeta Pasteur.
- 9- Dejar el resuspendido viral a 4°C toda la noche.
- 10- Realizar un *step gradient*, en tubos de nitrocelulosa de 39 ml, de CICs (40, 30, 20, 10 y 0%) en tampón borato 0,05M + EDTA 0,001 M pH 8 conteniendo 20% de sacarosa.
- 11- Sembrar el resuspendido viral clarificado agregando tampón en la parte superior para completar el tubo.
- 12- Centrifugar el gradiente a 25800 rpm durante 5 horas.
- 13- Obtener cuidadosamente las bandas formadas y dializarlas toda la noche contra tampón borato 0,05M + EDTA 0,001 M pH 8 para extraer el CICs.

### **PROTOCOLO 6: Decoración estándar**

- 1- Tomar una gota de la muestra y colocar sobre *parafilm* y sobre la gota.
- 2- Dejar 1 minuto en incubación.
- 3- Lavar con 20 gotas de tampón fosfato y secar el exceso con papel de filtro (sin secar completamente).
- 4- Colocar una gota del antisuero (diluido 1/100). Dejar 15 min. en cámara húmeda.
- 5- Lavar con 30-60 gotas de agua destilada.
- 6- Colocar la grilla sobre una gota de acetato de uranilo al 2%.
- 7- Dejar 1 minuto. Secar con papel de filtro.

#### **PROTOCOLO 7: Tinción negativa para virus purificado**

- 1- Tomar del virus purificado 1 gota y colocar sobre *parafilm*. Sobre la gota poner la grilla por la cara que tiene la película de *Formvar*.
- 2- Dejar 1 minuto.
- 3- Lavar con agua destilada (4-5 gotas). Secar el exceso con papel de filtro.
- 4- Luego colocar la grilla sobre una gota de acetato de uranilo 2%.
- 5- Dejar 1 minuto. Secar con papel de filtro.

#### **PROTOCOLO 8: Tratamiento con ADNsa y síntesis de ADN copia**

- 1- Añadir 1µl de ADNsa y 1µl del tampón a 1,5 µg de ARN.
- 2- Llevar a volumen de 10µl con agua libre de ARNsas.
- 3- Luego de incubar 15 min. a temperatura ambiente agregar 1µl de EDTA (25 mM) y calentar a 65°C 10 min.
- 4- Agregar 1µl del oligonucleótido FMV 10820 (5' GGCTCGATCACGAACCAA-3') (50 ng/µl), 1µl de dNTPs (10 mM) y llevar a un volumen de 13µl con agua destilada.
- 5- Calentar a 65°C durante 5 min. e incubar en hielo 1 min.

6- Luego agregar 4µl de tampón *First Strand 5X*, 1µl de DTT (0,1 M), 1µl ARNsa *OUT* y 1µl de transcriptasa reversa *SuperScript III RT* ó *M-MLV* (200 U/µl).

7- Incubar a 50°C durante 45 min. y luego calentar a 70°C durante 15 min. y colocar en hielo.

### **PROTOCOLO 9: Medio LB**

1- Preparar 950ml agua bidestilada con Bacto-triptona (*DIFCO Laboratories, EUA*) 10 g, Extracto de levadura 5 g y NaCl 10 g.

2- Medir pH= 7 con NaOH.

3- Llevar a 1000ml con agua bidestilada.

\*Para preparar **LB agar**, agregar agar 1,5%. Autoclavar durante 20 min. a 1,5 atmosfera.

### **PROTOCOLO 10: Preparación de bacterias *E. coli* competentes**

1- Diluir el cultivo 1/100 en 100ml de medio LB.

2- Colocar a 37°C con agitación (100 rpm) hasta que la DO<sub>600</sub> del cultivo llegando a 0,48.

3- Enfriar 5 min. en hielo y se centrifugó a 4000 rpm, a 4°C.

4- Resuspender el precipitado en el 40% del volumen inicial con la solución TFB I fría [KAc (0,5 M), KCl (1 M), CaCl<sub>2</sub> (0,5 M), MnCl<sub>2</sub> (0,5 M), pH 5,8 con ácido acético (0,2 M)].

5- Dejar en hielo durante 5 min.

6- Centrifugar a 4000 rpm durante 10 min. a 4°C.

7- Resuspender el precipitado en 4 ml de TFB II frío [MOPS o PIPES (0,1 M), CaCl<sub>2</sub> (0,5 mM), KCl (0,1 M), glicerol 15%, pH 6,5 con KOH].

8- Dejar durante 15 min. en hielo.

9- Dividir las células competentes se en alícuotas de 250µl en tubos *eppendorf* y congelar rápidamente en nitrógeno líquido y guardar a - 70°C.

### **PROTOCOLO 11: Minipreparación casera**

1- Resuspender el precipitado con 100µl de solución I [TEG: Glucosa (50 mM), EDTA (10 mM), Tris-HCl (25 mM, pH 8)].

2- Agregar 200 µl de solución II [NaOH (0,2 M), SDS 1%] para la lisis celular.

3- Mezclar suavemente por inversión y dejar 5 min. en hielo.

4- Luego agregar 150µl de solución III fría (KAc (3 M) y repetir el procedimiento anterior.

5- Centrifugar en microcentrífuga a 12.000 rpm durante 15 min. a 4°C.

6- Transferir el sobrenadante obtenido a un nuevo tubo (aproximadamente 350µl) y agregar 0,6 volúmenes de isopropanol para precipitar el ADN plasmídico.

7- Mezclar por inversión y dejar 3 min. a temperatura ambiente.

8- Centrifugar a 12.000 rpm durante 10 min. a temperatura ambiente.

9- Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con 300µl de etanol 70%.

10- Agitar hasta despegar el precipitado.

11- Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 min. a temperatura ambiente.

12- Secar el precipitado durante 5 min. en cámara de flujo laminar.

13- Resuspender en 50µl de agua destilada ó de TE.

### **PROTOCOLO 12: Marcación del ADNc con digoxigenina (sonda)**

1- Desnaturalizar el ADNc en termociclador a 95°C durante 10 min. Luego poner en hielo hasta su empleo, con el fin de estabilizar el ADN como simple cadena.

2- En el mismo tubo agregar 12µl de ADNc linealizado y desnaturalizado, 4µl del tampón *Klenow* (5X), 2µl de dNTPs + Dig-dUTP (10X) y 1µl de la enzima *Klenow* (ADN polimerasa I) (2 U/µl). Llevar a volumen final con agua de 25µl.

3- Incubar la reacción en termociclador a 37°C durante 20 horas, para lograr de este modo un marcado más eficiente.

4- Adicionar 2µl de EDTA 0,2M (pH 8) para detener la reacción.

5- Precipitar el ADN marcado con 2,5µl de LiCl 4M y 75µl etanol 100% frío. Mezclar bien y dejar a -80°C durante 30 min.

6- Centrifugar a 4°C, 13.000rpm durante 15 min. y lavar el precipitado en 50µl etanol 70% frío, permite que el precipitado se seque, y resuspender en 50µl de agua.

### **PROTOCOLO 13: Rendimiento del material marcado.**

1- Sembrar 1µl de cada dilución en membrana de *nylon*, secar unos min. y fijar por irradiación con luz UV durante 3 min. (la membrana se cuadriculó 0,5 x 0,5 mm).

2- Colocar sobre papel de filtro para sembrar y luego la cara sembrada exponer contra el transiluminador de luz UV.

3- Equilibrar la membrana en tampón maleico (**ver Tampones 4**).pH 7,5 durante 3-5 min.

4- Luego incubar la membrana en tampón 2 durante 30 min. a temperatura ambiente (bloqueo). Luego incubar el anticuerpo (antidigoxigenina-conjugada con fosfatasa alcalina) en una relación de 1/ 5.000 en tampón 2.

5- Mantener la membrana 30 min. a temperatura ambiente y en agitación constante.

6- Lavar la membrana dos veces en tampón maleico pH 7,5 durante 15 min. y mantener en agitación constante.

7- Equilibrar la membrana en tampón 3 pH 9,5 durante 5 min. para equilibrar pH.

8- Agregar a 10ml de tampón 3 pH 9,5 más 200µl de la solución NBT/BCIP, que al unirse con la enzima fosfatasa alcalina produce un precipitado insoluble de color púrpura (resultante de la desfosforilación del BCIP y la inmediata oxidación con el tinte del NBT)

9- Incubar aproximadamente una hora.

### **PROTOCOLO 14: Extracción RNA batata por método CTAB**

- 1- Moler hojas frescas en bolsas de plástico, agregar 10x (V/P) de tampón CTAB y pasar a un tubo *ependorf*.
- 2- Centrifugar 5 min a temperatura ambiente.
- 3- Pasar 700µl del sobrenadante a un nuevo tubo
- 4- Agregar igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (IAA) (24:1), mezclar por inversión y centrifugar 5 min. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo.
- 5- Repetir el paso 4-
- 6- Agregar igual volumen de LiCl (4M). Mezclar por inversión y dejar toda la noche a -20°C.
- 7- Centrifugar 20 min a 4°C, descartar el sobrenadante.
- 8- Agregar 200µl de etanol 70% centrifugar por 2 min.
- 9- Descartar el sobrenadante y secar el precipitado.
- 10- Resuspender el precipitado en 100µl de agua libre de nucleasas.

**Tampón CTAB:**

CTAB 2%

Tris-HCl 100 mM a pH 8

EDTA 20mM

NaCl 1,4M

**\*Na sulphite 1%**

**\*PVP-40 2%**

**\*Agregarlos en alícuotas al tampón stock conteniendo los primeros cuatro componentes, previamente autoclavados.**

**PROTOCOLO 15: Detección con el ADN marcado con digoxigenina. (*Dot Blot*)**

**A) Preparación de membrana de nylon**

1- Desnaturalizar las muestras a 100°C durante 3 min. y transferir las muestras inmediatamente a hielo por 3 min.

2- Sembrar en membrana de *nylon* 1µl de las muestras y controles.

3- Dejar secar a temperatura ambiente.

4- Fijar el ácido nucleico (como simple cadena) a la membrana, por exposición a luz UV durante 3 min.

### **B) Prehibridación e hibridación**

5- Prehibridar la membrana durante 90 min. a 65°C y en agitación constante.

6- Desnaturalizar la sonda 10 min. a 100°C y colocarla en hielo durante 3 min. y centrifugar.

7- Transferir la membrana a una solución nueva (en bolsa, 2 ml de solución de pre-hibridación).

8- Agregar la sonda desnaturalizada en concentración adecuada.

9- Hacer distintas diluciones.

10- Hibridar la membrana a 65°C toda la noche en agitación constante.

11- Lavar con bajas condiciones de astringencia la membrana 2 veces a temperatura ambiente durante 5min. en solución de 2X SSC/0,1% SDS (agitar la solución antes de usarla).

12- Mantener la membrana en agitación constante

13- Lavar con altas condiciones de astringencia (recipiente cerrado) la membrana 2 veces a 65°C durante 15min. en solución de 0.5X SSC/0,1% SDS.

14- Mantener la membrana en agitación constante.

### **C) Detección inmunológica**

15- Incubar la membrana en tampón 2 (**ver Tampones 4**) durante 30 min. y mantener en agitación constante.

16- Transferir la membrana a una nueva solución de tampón 2.

17- Agregar el anticuerpo (antidigoxigenina-conjugada con fosfatasa alcalina) en una relación de 1/ 5.000.

18- Mantener incubando la membrana durante 30 min. a temperatura ambiente y en agitación constante.

19- Lavar la membrana dos veces en tampón maleico pH 7,5 durante 15 min. y agitación constante.

20- Equilibrar la membrana en tampón 3 pH 9,5 durante 3 min.

**D)Revelado de la membrana**

21- Agregar a 10 ml de tampón 3 pH 9,5 200 µl de la solución NBT/BCIP.

22- Incubar la membrana en oscuridad y sin agitación.

23- Detener la reacción lavando la membrana con agua bidestilada estéril.

**PROTOCOLO 16: Extracción ARN batata por método TRIZOL**

- 1- Homogeneizar 100 mg de tejido vegetal en nitrógeno líquido.
- 2- Colocar en *ependorf* la muestra con 1 ml de Trizol (*Invitrogen*) incubar 3 min.
- 3- Agregar 0,2 ml de Cloroformo y agitar vigorosamente a mano por 15 segundos.
- 4- Centrifugar a no más de 12.000xg por 15 min. a 4°C.
- 5- Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo y agregar 0,5ml de isopropanol. Incubar a temperatura ambiente (15-30°C) por 10 min.
- 6- Centrifugar a 12.000xg por 15 min. a 4°C.
- 7- Remover el sobrenadante, agregar 1ml de etanol 70% al precipitado y mezclar la muestra. Centrifugar a no más de 7500xg por 5 min. a 4°C.
- 8- Remover el etanol 70% y dejar secar el precipitado durante 2 horas. Luego secar 30 min. más a 65°C.
- 9- Resuspender en 50µl de agua libre de nucleasas. Incubar en estufa a 65°C durante 30 min.

**PROTOCOLO 17: Detección con el ADN marcado con digoxigenina.  
(Southern Blot)**

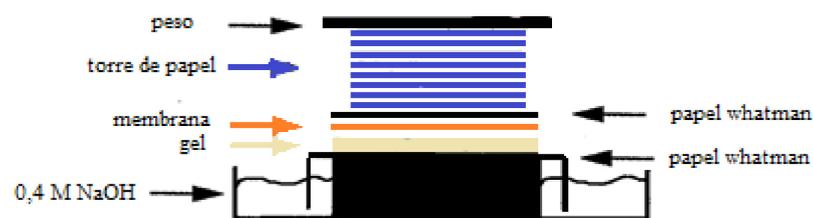
**A) Transferencia:**

1. Enjuagar brevemente el gel con agua *Milli-Q*.

2. Remojar el gel en HCl 0,25 M durante 15-30 minutos hasta que el cambio de color de bandas a verde. Esto es para fragmentar el ADN (depurinación). Enjuagar dos veces con agua *Milli-Q*.

3. Remojar en gel en NaOH 0,4 M durante 10 minutos. Enjuagar brevemente el gel con agua *Milli-Q*. Esto es para desnaturalizar el ADN.

4. Para el *Blot* ver diagrama a continuación. Esto se debe dejar durante la noche para asegurar la transferencia completa de ADN sobre la membrana de hibridación.



### **B) Pre-hibridación:**

1. Retirar la membrana de hibridación del dispositivo de transferencia y remojar brevemente la membrana en 5X SSC, y colocarla en el cilindro de la incubadora de hibridación.

2. Añadir tampón de pre-hibridación 10-15ml al cilindro (el volumen depende del tamaño de la membrana). Asegurar que burbujas de aire se eliminan haciendo rodar una pipeta o mover la membrana con un fórceps.

3. Incubar la membrana a 68°C durante al menos 2 horas. La membrana puede dejarse durante la noche.

### **C) Hibridación:**

1. Retirar la membrana de la incubadora.

2. Añadir aproximadamente 1 µg de la sonda desnaturalizada al tampón de pre-hibridación dentro del cilindro.

3. Sellar el cilindro (asegurarse que no queden burbujas de aire entre la membrana y el vidrio)

4. Incubar a 68°C durante al menos 6 horas y preferiblemente durante la noche.

5. Retirar la membrana del cilindro y colocarla en recipiente limpio.

6. Lavar con 2X SSC/0,1% SDS a temperatura ambiente durante 5 min. y en agitador (dos lavados).

7. Lavar usando 0,2X SSC /0,1% SDS a 68°C durante 15 min. en agitador.
8. Lavar usando 0,1X SSC /0,1% SDS a 68°C durante 15 min. en agitador.

***D) Immunodetección:***

1. Lavar la membrana en tampón 1 durante 5 min. a temperatura ambiente.
2. Bloquear la membrana en tampón 2 durante 30-60 minutos a temperatura ambiente, agitando suavemente.
3. Diluir la anti-digoxigenina conjugado con la fosfatasa alcalina contra 150mU / ml en tampón 2 (7µl de digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina en 20 ml de tampón 2).
4. Incubar la membrana en el conjugado diluido durante 30 min. a temperatura ambiente en agitador.
5. Lavar la membrana en tampón 1 durante 10 min. en agitador (4 lavados).
6. Equilibrar la membrana en tampón 3 durante 5 min. en agitador.
7. Retirar el exceso del tampón 3.
8. Incubar con el tampón color-sustrato recién preparado.
9. Dejar a temperatura ambiente cubierto con papel de aluminio o caja cerrada para protegerlo de la luz, el color puede aparecer en 5-10 min., cuando la banda de ADN es muy abundante, pero para aquellos que no son tan abundantes incubar hasta 12 horas.
10. Detener la reacción, lavando la membrana en tampón 4 durante 5 min.
11. Tomar una fotografía a los 5 min. después de la incubación, si alguna banda es detectable, y también una vez que la reacción ha finalizado.

**TAMPONES 4**

**20X SSC pH 7,5**

Citrato Na 0,3M

NaCl 3M

**Tampón de pre-hibridación**

5X SSC

Agente bloqueante 1%

N-Laurilsarcosine 0,1%

SDS 0,02 %

**Tampón maleico**

Ácido maleico 0,1M

NaCl 0,15M

pH 8 (con NaOH sólido, 8g/l aproximadamente) y autoclavar

### **Tampón 1**

Tampón maleico

Tween 20 0,3%

### **Tampón 2**

Tampón maleico 83,3%

Agente bloqueante 1%

Agua *Milli Q* 16,6%, hervir en agitación para disolver.

### **Tampón 3**

1M TrisHCl pH 9,5

MgCl<sub>2</sub> 2M

NaCl 1M

Agua *Milli Q* hasta completar volumen

### **1M TrisHCl pH 9,5**

Tris 121,1g

HCl 12N 6-8 ml

Agua *Milli Q* hasta completar volumen de 1000ml. Medir pH

### **Tampón color-sustrato**

Tampón 3 15 ml

NBT (nitroazul de tetrazolio) 67,5 µl

X- fosfato 52,5 µl

**1M TrisHCl pH 8**

Tris 121,1g

HCl 12N 42 ml

Agua *Milli Q* hasta completar volumen de 1000ml. Medir pH

**Tampón 4**

1M TrisHCl pH 8

EDTA 0,5M

Agua *Milli Q* hasta completar el volumen.