

Estudio de *Potyvirus* y *Nigrospora oryzae* como agentes patógenos del género *Calibrachoa*

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Facultad de
Ciencias Agrarias y Forestales

Ing. Agr. Leticia Tombion

Director: Ing. Agr. Dra. María Silvina Soto

Co Directora: Ing. Agr. Dra. Marta Carolina Rivera

Asesor Académico: Ing. Agr. Dr. Pedro Alberto Balatti



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

Junio, 2022

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente al Ing. Agr. MSc. Miguel Ángel Sangiacomo por su ayuda incondicional en todo momento, a la Dra. Ana Julia Distefano por su tiempo y colaboración, y a todos los que contribuyeron para que este trabajo fuera posible.

ÍNDICE

Resumen	3
Abstract	6
Capítulo I: introducción general	9
Fundamentación	20
Objetivo general	21
Capítulo II: identificación del <i>Potyvirus</i> que infecta a <i>Calibrachoa</i> cv. Pampa Salmón INTA y C. cv. Overá Fucsia INTA: <i>Potato virus Y</i>	27
Capítulo III: estudio de la transmisión de <i>Potato virus Y</i> por semillas de <i>Calibrachoa</i>	46
Capítulo IV: búsqueda de fuentes de resistencia a <i>Potato virus Y</i> en plantas silvestres de <i>Calibrachoa</i> de la Argentina	61
Capítulo V: puesta a punto del cultivo de meristemas de <i>calibrachoa</i> cv. Pampa Salmón INTA y su posterior implementación para el saneamiento de <i>Potato virus Y</i>	81
Capítulo VI: estudio de la influencia de <i>Potato virus Y</i> sobre la sintomatología de <i>Nigrospora oryzae</i> en <i>Calibrachoa</i> cv. Pampa Salmón INTA y evaluación del comportamiento de <i>Calibrachoa thymifolia</i> y de <i>Petunia integrifolia</i> frente a infecciones por <i>N. oryzae</i>	101
Publicaciones realizadas	116
Anexo	117

RESUMEN

El germoplasma proveniente de especies nativas es una importante fuente de variabilidad para la obtención de nuevos productos o la resolución de problemas sanitarios y agronómicos en los sistemas productivos de plantas ornamentales.

Dado que los recursos genéticos son pilares estratégicos para el desarrollo productivo, la Argentina se encuentra en un lugar clave debido a su riqueza biológica y a su historia en el intercambio de fitogermoplasma con otras naciones. En este sentido, el Instituto de Floricultura, perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) lleva a cabo diversos proyectos relacionados con el acceso y el uso sustentable de los recursos fitogenéticos nativos del país con fines de investigación y productivos. Dentro de estas actividades, y desde 2002, dicho Instituto realiza el mejoramiento del género *Calibrachoa* (plantas conocidas vulgarmente como calibrachos) con la finalidad de obtener variedades ornamentales para el mercado nacional e internacional. Actualmente, se encuentran registradas tres variedades denominadas Pampa Salmón INTA, Overá Fucsia INTA y Garden Rose. *Calibrachoa* se encuentra entre los géneros de mayor importancia en la comercialización de plantines florales a nivel mundial y, según datos que surgen de entrevistas a referentes de la empresa Sakata Seed, los Estados Unidos importan y demandan alrededor de 230 millones de esquejes de *Calibrachoa hybrida* por año, lo cual representa un ingreso potencial de 40 millones de dólares anuales.

Calibrachoa es un género que pertenece a la familia *Solanaceae* Adans, subfamilia *Cestroideae* Schlttdl., tribu *Nicotianae* G. Don. y está constituido por 28 especies. En la Argentina habitan 12 especies nativas cuyo centro de distribución es la Región Mesopotamia. Se caracteriza por poseer crecimiento vigoroso y flores de corola infundibuliforme de diferentes tamaños y colores tales como rosa, violeta, fucsia, rojo, amarillo y salmón.

En relación con los aspectos agronómicos, la infección por patógenos es uno de los factores de mayor importancia que limitan la producción de *Calibrachoa*. Con respecto a las enfermedades virales, en los Estados Unidos se ha reportado que este género es afectado por *Calibrachoa mottle virus*, especie incluida dentro del género *Carmovirus* y en Israel por *Tobacco mild green mosaic virus*, del género *Tobamovirus*. En la Argentina, desde 2009, en el Instituto de Floricultura INTA se realizan detecciones de virosis de cultivos ornamentales mediante la técnica ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) en sus diferentes variantes. Desde ese año hasta la actualidad no se registraron casos de *Groundnut ringspot virus* ni *Tomato chlorotic spot virus* en *Calibrachoa*. Solamente en 2012 se detectaron dos plantas con *Calibrachoa mottle virus* (1,8 % de incidencia) y en 2010 y 2011, se observó 8 y 3 % de incidencia de *Cucumber mosaic*

virus, respectivamente. A su vez, se encontraron valores similares de incidencia de *Tomato spotted wilt virus* durante esos dos años. En cambio, durante todos los años de análisis se detectó la presencia del grupo *Potyvirus* con mayores porcentajes de incidencia, por lo que resultó necesaria la profundización de los estudios relacionados con la identificación de los potyvirus patógenos de *Calibrachoa hybrida*. Esto permitió detectar, mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa) y posterior secuenciación, que la especie viral presente en estas plantas era *Potato virus Y* (PVY).

Con respecto a las estrategias de manejo de las enfermedades de calibrachoa, fue fundamental analizar el rol de las semillas en la transmisión de PVY y la evaluación de la influencia de los factores ambientales sobre este proceso. Por ello, se realizaron cruzamientos dirigidos entre plantas infectadas con PVY, y entre plantas infectadas con PVY y plantas sin infectar, durante el verano, el otoño y la primavera. A partir de la técnica RT-PCR, se confirmó que esta especie viral se transmite por semillas tanto en el caso de uno como de ambos padres infectados, independientemente de las condiciones de temperatura ambiente y época del año, y que existe una incidencia importante del tejido materno sobre la cantidad de semillas producidas y la cantidad de plantas logradas a partir de los cruzamientos.

Además, se llevó a cabo la identificación de genotipos resistentes a patógenos, cuyo conocimiento permite incorporar fuentes de variabilidad a los programas de mejoramiento, evitando problemas sanitarios. Las variedades resistentes representan una estrategia simple, segura y efectiva para limitar las pérdidas ocasionadas por enfermedades y, a su vez, impiden su diseminación hacia otros cultivos de la zona que también puedan ser sus hospedantes. Para ello, se llevó a cabo la inoculación (por transmisión mecánica) de plantas silvestres de *Calibrachoa* y de *Petunia* provenientes del banco de germoplasma del Instituto de floricultura (*Calibrachoa caesia*, *C. thymifolia*, *C. linoides*, *Petunia inflata* y *P. integrifolia*) con un extracto proveniente de plantas de *Calibrachoa* fehacientemente infectadas con PVY. Posteriormente, mediante observación de la sintomatología y detección mediante ELISA y RT-PCR, se vio que todas las plantas analizadas se infectaron con el virus, lo que mostró la ausencia de resistencia en estas plantas a PVY.

Por otro lado, la producción de plantas con sanidad controlada constituye otra forma eficaz de reducir el efecto perjudicial de las enfermedades, pero para ello se requiere el desarrollo de métodos de eliminación de patógenos. La regeneración de plantas *in vitro* a partir del cultivo de meristemas o de ápices caulinares es la técnica utilizada con mayor frecuencia para la liberación de virus, por lo que en este trabajo se llevó a cabo la optimización de un protocolo de regeneración de plantas de *Calibrachoa* cv. Pampa

Salmón INTA a partir de meristemas apicales, mediante el análisis comparativo de diferentes medios de cultivo. Finalmente, se vio que la combinación de MS ½ (Murashige y Skoog ½) + 0,01 mg L⁻¹ 6-bencilaminopurina (BAP) resultó en la obtención de un alto porcentaje de regeneración de plantas completas, además de una mayor producción aérea y radical que, consecuentemente, permitieron una alta tasa de sobrevivencia de plantas luego de su transferencia al invernáculo. A partir de este avance, se pudo realizar el cultivo de meristemas con el objetivo de sanear las plantas de *C. cv. Pampa Salmón INTA* infectadas con PVY y, concluyendo que esta técnica permitió erradicar el PVY en el 74% de los casos, confirmado mediante RT-PCR.

En cuanto a las enfermedades causadas por hongos y organismos afines sobre *C. hybrida*, a nivel mundial se ha informado la presencia de los Oomycetes *Phytophthora nicotianae*, *P. infestans*, *P. capsici* y *P. tropicalis*, y de hongos como *Thielaviopsis basicola*, mientras que en la producción nacional las variedades de *Calibrachoa* también se han mostrado susceptibles a infecciones por *Fusarium* sp., *Alternaria* spp. y *Nigrospora oryzae*. En plantas de *Calibrachoa* producidas en el Instituto de Floricultura e infectadas con potyvirus, se ha observado el desarrollo de manchas foliares ocasionadas por *Nigrospora oryzae*, por lo que resultó necesario analizar el patosistema de una forma integrada a partir del estudio de la interacción patógenos-hospedante. Para ello, plantas de *C. cv. Pampa Salmón INTA* infectadas con PVY y plantas de *C. cv. Pampa Salmón INTA* sin infectar fueron inoculadas con *N. oryzae*. No se logró la infección fúngica bajo una temperatura promedio de 20 °C, la cual pudo haber sido menos conductiva para la enfermedad. A su vez, plantas de *C. thymifolia* y *P. integrifolia* fueron inoculadas con el mismo patógeno y se vio que *C. thymifolia* presenta resistencia a *N. oryzae*, mientras que *P. integrifolia* es susceptible.

Dada la importancia comercial de *C. hybrida* y frente al escaso conocimiento de la etiología de las enfermedades que la afectan, este trabajo permitió generar información sobre la interacción patógenos-hospedante y su manejo.

ABSTRACT

The germplasm of native species is an important source of variability to obtain new products or to solve health and agronomic problems in production systems of existing ornamental varieties.

The genetic resources are key strategies for the productive development, and Argentina has biological wealth and history in the germplasm interchange. In that way, the National Institute of Agricultural Technology (INTA) carries out several projects related to the access and the sustainable use of the native genetic resources of the country for research and crop production. Since 2002, the Floriculture Institute INTA conducts the genetic improvement of *Calibrachoa* genus with the aim of obtaining ornamental varieties for the national and international market.

Currently, "Pampa Salmón INTA", "Overá Fucsia INTA" and "Garden Rose" are the three registered varieties. This genus is one of the most important in the global commercialization of potted ornamental plants and, according to Sakata Seed, the USA import and demand 230 million of annual cuttings of *Calibrachoa hybrida*, representing u\$s 40 million per year.

Calibrachoa belongs to *Solanaceae* Adans family, to the subfamily *Cestroideae* Schtdl., and the tribe *Nicotianae* G.Don., it includes 28 species, 12 of them native to Argentina, especially distributed in the Mesopotamia region. It is characterized by having vigorous growth and flowers of different size and colors, like pink, violet, fuchsia, red, yellow, and salmon.

The infection by pathogens is one of the most important factors that limits the production of *Calibrachoa*. Regarding viral diseases, it has been reported in the USA that *Calibrachoa* is affected by *Calibrachoa mottle virus* (*Carmovirus*) and in Israel by Tobacco mild green mosaic virus (*Tobamovirus*). From 2009, the Floriculture Institute INTA from Argentina carries out viral detections in ornamental cultures by means of the Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). From that year to date, there were no cases of *Groundnut ringspot virus* nor *Tomato chlorotic spot virus* in *Calibrachoa*. In 2012, only two plants were reported to be infected with *Calibrachoa mottle virus*. During 2010 and 2011, 8 and 3 % of incidence of *Cucumber mosaic virus*, were estimated, respectively. In addition, there were similar reports of infection by *Tomato spotted wilt virus* at the same time. On the other hand, the presence of *Potyvirus* group has been detected with higher incidence rates, during all those years. So, it became necessary to consider the identification of the potyvirus pathogens of *Calibrachoa*. Thus, we concluded that *Potato virus Y* (PVY) is the viral species present in those plants,

confirmed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and subsequent sequencing.

In addition, it was essential to analyze the role of the seeds in PVY transmission and the influence of the environment on disease development in calibrachoa. Therefore, crosses were made between plants infected with PVY, and between plants infected with PVY and plants without PVY, during summer, autumn and spring. In conclusion, and confirmed by RT-PCR, we reported that this viral species is transmitted by seeds independently of the season of the year, and that there is an important incidence of the maternal tissue on the quantity of the produced seeds and the quantity of the plants achieved from the crossings.

On the other hand, the identification of resistant genotypes was carried out so as to be able to include variability sources in the genetic improvement programs. Resistant varieties represent a safe and effective strategy to limit the losses caused by diseases and prevent their spread to others crops. For this purpose, mechanical inoculation with a PVY extract was carried out in wild plants of *Calibrachoa* and *Petunia* obtained from the germplasm bank of the Floriculture Institute INTA (*Calibrachoa caesia*, *C. thymifolia*, *C. linooides*, *Petunia inflata* y *P. integrifolia*). The symptomatology was observed and the virus was detected by ELISA and RT-PCR, showing that all the plants were infected with PVY. This confirmed the absence of resistance to PVY in these plants.

Furthermore, the production of healthy plants represents another effective way to reduce the harmful effect of diseases, but this requires the development of methods for pathogen elimination. In vitro regeneration of apical meristems is the most frequently used technique to eliminate viruses, so the optimization of the apical meristem regeneration protocol of *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA was carried out for the comparative analyses of different culture media. The combination of MS (Murashige & Skoog ½) + 0,01 mg L⁻¹ 6-bencilaminopurine (BAP) resulted in a high percentage of regeneration of plants in addition to a greater aerial (shoot) and radical (root) production that, consequently, allowed for a high rate of plant survival after transfer to the greenhouse. From this advance, the *C.* cv. Pampa Salmón INTA plants infected with PVY were cleaned up by 74 %, which was corroborated by RT-PCR.

Regarding fungal diseases of *C. hybrida*, the pathogens *Phytophthora nicotianae*, *P. infestans*, *P. capsici* y *P. tropicalis*, and *Thielaviopsis basicola* have been reported globally, while in the national production, the calibrachoa varieties have been found to be susceptible to *Fusarium* sp., *Alternaria tenuissima* and *Nigrospora oryzae*. It had been observed that calibrachoa plants infected with PVY, developed leaf spots caused by *N. oryzae*, so it was necessary to study that pathogens-host interaction. For this purpose, plants of *C.* cv. Pampa Salmón INTA infected with PVY and healthy were inoculated with

Nigrospora oryzae. As a result, no fungal infection was achieved under an average temperature of 20 °C, which could have been not conducive for the disease. Also, health plants of *C. thymifolia* and *P. integrifolia* were inoculated with *N. oryzae* and, after an incubation period, *C. thymifolia* presented resistance to *N. oryzae*, while *P. integrifolia* did not.

Given the commercial importance of calibrachoa and the limited knowledge of the etiology of the diseases that affect it, this work allowed to generate valuable information on pathogen-host interaction and its management.

Introducción general

La floricultura en la Argentina y en el mundo

A nivel mundial, la producción de flores y plantas en maceta está dominada por la Unión Europea con el 34 % del total. Seguidamente, se encuentran la República Popular de la China (16 %) y los Estados Unidos (14 %). En Europa, los Países Bajos producen el 32 % de las plantas ornamentales, seguidos de Alemania (13 %) e Italia (12 %). Las ventas anuales mundiales de flores oscilan entre 40 y 60 mil millones de dólares y es un sector que se encuentra actualmente en crecimiento en los países en desarrollo. Sin embargo, las producciones de Europa, América y Asia cubren más del 90 % de los requerimientos del mercado (Lecomte *et al.*, 2016).

En la Argentina, la producción comercial de flores y plantas ornamentales se originó en 1920, a partir del desarrollo de empresas familiares de inmigrantes japoneses, portugueses, alemanes e italianos en los alrededores del Gran Buenos Aires (Morisigue *et al.*, 2004). Durante los últimos años, la producción se concentra en el Cinturón Verde de Buenos Aires y en La Plata (Mónaco *et al.*, 2008) y, en menor medida, en Santa Fe (Gabriel *et al.*, 2010), Córdoba (Suárez *et al.*, 2010), Misiones (Bischoff *et al.*, 2008) y la Patagonia (Mazzoni *et al.*, 2008) donde se comenzó a desarrollar esta actividad durante las últimas décadas debido a un incremento de la demanda de flores y plantas para la decoración de parques, jardines e interiores (Mónaco *et al.*, 2008). Si bien no existen datos actualizados sobre la producción florícola local, se sabe que durante el último relevamiento realizado por el Censo Nacional Agropecuario (INDEC, 2002) la superficie cultivada era de 2800 hectáreas, de las cuales un 70 % pertenecía a la región Pampeana y se destacó Buenos Aires como la principal provincia productora (Villanova y Morisigue, 2016).

Desde el 2002, el Instituto de Floricultura (INTA Argentina) se dedica a la domesticación y al mejoramiento genético de plantas nativas con los propósitos de obtener variedades ornamentales comerciales adaptadas al mercado local e internacional y de conservar la flora autóctona bajo un marco legal y sustentable del uso de los recursos. Entre los géneros nativos que se emplean actualmente se destacan *Glandularia*, *Mecardonia*, *Nierembergia*, *Alstroemeria* y *Calibrachoa*. Con respecto a este último, la Institución logró dar origen a tres variedades comerciales registradas: *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA, C. cv. Overá Fucsia INTA y C. cv. Garden Rose, las cuales se comercializan en el mercado interno y en América del Norte. Los Estados Unidos y Canadá lograron las licencias para su producción y cultivo durante los últimos

5 años, en cuyo acuerdo se manifestó que las regalías obtenidas se destinarían, por un lado, al gobierno nacional y, por otro, al gobierno de Misiones, por ser esta provincia el lugar de origen de las plantas madre de *Calibrachoa* a partir de las que se obtuvieron estas variedades (Hagiwara, 2016).

Actualmente, *Calibrachoa* se encuentra dentro del grupo de mayor importancia de plantas para uso en canteros y macetas empleado por paisajistas y viveristas tanto a nivel local (Milicia *et al.*, 2010) como internacional (Chu *et al.*, 2014).

Según datos que surgen de entrevistas a referentes de la empresa Sakata Seed, los Estados Unidos importan y demandan alrededor de 230 millones de esquejes de *Calibrachoa hybrida* por año, lo cual representa un ingreso potencial de 40 millones de dólares anuales. Con un crecimiento anual del 15 % este género se ubica en segundo lugar de importancia luego del geranio (*Pelargonium hortorum*) (Kanaya, 2016).

Características del género *Calibrachoa*

Calibrachoa es un género de plantas nativo de Sudamérica que pertenece a la familia *Solanaceae* Adans, subfamilia *Cestroideae* Schldl., tribu *Nicotianae* G.Don. (Jhon *et al.*, 2019). Inicialmente, sus especies fueron incluidas dentro del género *Petunia* Juss hasta que Wijsman y Jong (1985) a partir de un análisis citogenético pudieron establecer que aquellas que tenían $2n=14$ cromosomas correspondían al género *Petunia*, mientras que las que tenían $2n=18$ cromosomas pertenecían a otro género que se denominó *Calibrachoa* (Chu *et al.*, 2014). Además, estos géneros difieren entre sí porque el hábito de crecimiento de las plantas de *Petunia* es herbáceo mientras que el de *Calibrachoa* es subarborescente (Kanaya *et al.*, 2010 b) y porque la morfología de las flores y de las hojas también es distinto (Greppi *et al.*, 2013 a).

Calibrachoa abarca 27 especies que se distribuyen desde el Sur de Brasil hasta el Noreste de la Argentina y Uruguay (Mäder y Freitas, 2019), más específicamente entre los paralelos 18° y 37° Sur, predominantemente en los estados de Santa Catarina y Río Grande do Sul, Brasil (Tsukamoto *et al.*, 2002). Excepcionalmente, *Calibrachoa parviflora* también se encuentra en América del Norte y Europa como planta invasora (Mäder y Freitas, 2019). En la Argentina existen 12 especies nativas de *Calibrachoa*, las cuales son: *C. parviflora*, *C. pygmaea*, *C. longistyla*, *C. caesia*, *C. irgangiana*, *C. excellens*, *C. linoides*, *C. thymifolia*, *C. missionica*, *C. humilis*, *C. pubescens* y *C. ovalifolia* (Greppi *et al.*, 2013 b). Estas se pueden encontrar en las praderas y en los afloramientos rocosos de las regiones subtropicales y templadas del país (Jhon *et al.*, 2019; Mäder y Freitas, 2019). En líneas generales, estas plantas se caracterizan por ser hierbas perennes, menos frecuentemente anuales, o subarborescentes pequeñas, erectas o decumbentes con tricomas simples, glandulares y rara vez eglandulares. Poseen raíz

axial evidente y tallos cilíndricos de base leñosa. A su vez, presentan hojas sésiles o subsésiles, alternas, solitarias, de lámina entera, linear, linear-espatulada, oblonga, ovada o elíptica; base cordada, cuneada o atenuada con nervadura primaria evidente y nervaduras secundarias en general no evidentes. La inflorescencia es terminal, formada por una secuencia de unidades simpodiales con flor axial y asociadas a un par de hojas opuestas en cada nudo. Por su parte, las flores son perfectas, generalmente no aromáticas, con pedicelos suberectos (Flora Argentina, 2018). La corola es infundibuliforme de diferentes tamaños y amplia variedad de colores, tales como rosa, violeta, fucsia y amarillo (Greppi *et al.*, 2013 a).

El lanzamiento de la primera variedad comercial de *Calibrachoa* fue en la década de 1990, por Suntury Ltp (Kanaya *et al.*, 2010 a) y desde entonces se han registrado numerosos cultivares por diferentes compañías de mejoramiento genético (Kanaya *et al.*, 2010 b) tales como Goldsmith Plants, Ball Flora Plant y Selecta First Class (Soto *et al.*, 2008).

Tal como se mencionó anteriormente, entre los géneros de importancia en los programas de mejoramiento del Instituto de Floricultura del INTA se encuentra *Calibrachoa*, con tres exitosas variedades en el mercado las variedades “Pampa Salmón INTA”, “Overá Fucsia INTA” y “Garden Rose”. La primera presenta flores simples pequeñas medianamente lobuladas, de color rojo anaranjado, con fuerte evidencia de los nervios de la parte superior del lóbulo de la corola (Figura I.1). El período de floración es prolongado, primavera-estival, el cual abarca desde septiembre a abril en el hemisferio sur (Figura I.2). Se destaca por su óptimo comportamiento en canteros y por su tolerancia al cultivo en sustratos con pH elevado (alcalinos). La propagación es agámica, a través del enraizamiento de esquejes (Hagiwara, 2013 a).



Figura I.1. Flor simple de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA
(Hagiwara, 2013 a)



Figura I.2. *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA en floración
(Hagiwara, 2013 a)

Por otro lado, C. “Overá Fucsia INTA” es una variedad que se destaca por tener flores simples medianas, de 3,1 cm de diámetro y medianamente lobuladas, de color rojo púrpura, con fuerte evidencia de los nervios de la parte superior del lóbulo de la corola (Figura I.3). Se caracteriza principalmente por su precocidad y duración del período de floración, que abarca desde fines de invierno hasta mediados de otoño (agosto-mayo) (Figura I.4), y puede ocurrir incluso con fotoperíodo neutro. Al igual que “Pampa Salmón INTA”, posee un óptimo comportamiento en canteros y en macetas, y la propagación es agámica mediante el enraizamiento de esquejes. Por su parte, no necesita poda de formación (Hagiwara, 2013 b).



Figura I.3. Flor abierta de *Calibrachoa* cv. Overá Fucsia INTA
(Hagiwara, 2013 b)



Figura I.4. *Calibrachoa* cv. Overá Fucsia INTA en floración
(Hagiwara, 2013 b)

Con respecto a la variedad “Garden Rose”, registrada en los EE. UU., se caracteriza por poseer abundantes flores de color rosa intenso y brillante (Figura I.5), y por adaptarse a ser cultivada en climas templados. Su floración es constante y se da durante todo el verano, inclusive con altas temperaturas. Se puede cultivar a pleno sol tanto en

macetas como en canteros, por lo que requiere mucha luz y gran amplitud térmica diaria (Hagiwara, 2016).



Figura I.5. *Calibrachoa* cv. Garden Rose en floración
(Hagiwara, 2016)

En cuanto a los requerimientos de estas tres variedades, se encuentra la alta luminosidad y el suelo ácido ya que, al ser poco eficientes para asimilar el hierro a pH alcalino, frecuentemente suelen padecer clorosis en los brotes apicales y disminución de su tasa de crecimiento, por lo que requieren altos niveles de fertilización (Hagiwara *et al.*, 2010). Con respecto a las necesidades hídricas, no requieren agua en exceso y sus temperaturas óptimas de crecimiento diurnas son de 21 a 25 °C, mientras que las nocturnas varían de 12 a 15 °C (Hagiwara y Pannunzio, 2015).

A pesar de cierta rusticidad, estas variedades ornamentales presentan la problemática de ser susceptibles al ataque de los siguientes insectos fitófagos: mosca blanca, trips, cochinillas y pulgones (Hagiwara, 2013 a,b). Todos ellos, además de causarles daños que comprometen su calidad comercial, presentan la desventaja de que son transmisores de enfermedades sistémicas, tales como las causadas por virus fitopatógenos (Whitfield *et al.*, 2015), los cuales son los responsables de originar graves pérdidas económicas en las producciones ornamentales. Por su parte, también presentan el inconveniente de ser susceptibles a las enfermedades fúngicas causadas por *Fusarium oxysporum* (Borrelli *et al.*, 2021 b), *Rhizoctonia solani* (Borrelli *et al.*, 2018),

Sclerotinia sclerotiorum (Borrelli *et al.*, 2020 b; Borrelli *et al.*, 2021 c), *Alternaria tenuissima* (Borrelli *et al.*, 2021 a) y *Nigrospora oryzae* (Borrelli *et al.*, 2020 a).

Virus fitopatógenos. Características generales

Los virus son partículas infectivas compuestas por una o más moléculas de ácido nucleico, ya sea ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN), capaces de organizar su propia replicación, pero requieren de la maquinaria celular de otro ser vivo para ser funcionalmente activos, por lo que se los considera parásitos intracelulares obligados (Stange, 2006). Además, están compuestos por una serie de proteínas multifuncionales, las cuales pueden ser estructurales, de movimiento, de replicación, de cubierta, reguladoras de la expresión y de la traducción (Hull, 2009).

En una primera instancia, cuando el virus toma contacto con el hospedante se desencadena una serie de interacciones entre ambos. Si el hospedante reconoce la partícula infectiva, se desarrolla una interacción incompatible que aumenta el sistema de defensa de la planta y limita la replicación y el movimiento del virus, y lo circunscribe al sitio inicial de infección. Por el contrario, si la planta desconoce la partícula viral, se establece una interacción compatible que favorece la infección y la planta se enferma (Jones y Dangl, 2006). Cuando esto sucede, el virus ingresa al citoplasma de la célula hospedante a partir de una ruptura en la pared celular y, luego de su desencapsidación (Stange, 2006), se replica y genera sus propias proteínas a partir de la traducción de sus ARN mensajeros para seguidamente realizar un movimiento intercelular a la célula siguiente y así sucesivamente hasta desencadenar una respuesta sistémica que permite la infección de la totalidad de la planta (Hull, 2009).

Dado que los virus no pueden penetrar la cutícula de las plantas ni la pared celular por sí mismos, requieren de una asistencia externa que posibilite este contacto (Brault *et al.*, 2010). Una forma de ingreso es mediante la transmisión mecánica en la cual el virus penetra las células a partir de daños físicos que pueden ser causados por herramientas de trabajo que estuvieron previamente en contacto con plantas enfermas o bien por el uso de agentes abrasivos que, junto con un buffer especial más la savia de una planta infectada, se utilizan como parte de experimentos de investigación (Hull, 2009). La forma de inoculación de mayor relevancia es mediante vectores. Estos pueden ser insectos (Brault *et al.*, 2010; Whitfield *et al.*, 2015), ácaros, hongos y nematodos (Hull, 2009). Existen 7 órdenes de insectos capaces de transmitir enfermedades virales a partir de la ingesta del tejido vegetal, los cuales son: Orthópteros, Dermápteros, Coleópteros, Lepidópteros, Dípteros, Tisanópteros y Hemípteros (Whitfield *et al.*, 2015). Como regla general, los virus que son transmitidos por un tipo de vector no son transmitidos por ningún otro (Hull, 2009). Cuando el virus no persiste en el cuerpo del insecto con los

cambios de muda se habla de transmisión no persistente. Por el contrario, cuando el virus circula en el tracto intestinal del artrópodo y se traspasa a la descendencia, se dice que la transmisión es de tipo persistente (Brault *et al.*, 2010).

Por su parte, se ha visto que los hongos capaces de transmitir virus corresponden al género *Olpidium*, los cuales son habitantes de suelo y pertenece al Reino Fungi, Filo Olpidiomycota. Otros organismos capaces de transmitir virus son los pertenecientes a los géneros *Polymyxa* y *Spongospora*, los cuales corresponden al Reino Protozoa, División Plasmodiophoromycota (Hull, 2009).

Otra forma de transmisión viral es por medio de semillas que, si bien sólo para una minoría de las interacciones virus-planta resulta en infección, es un medio de considerable importancia ecológica para la perpetuación y diseminación de estos patógenos que genera graves consecuencias económicas. Por otro lado, los virus también pueden ser transmitidos mediante polen, cuya producción y calidad pueden ser afectados por la presencia de los mismos virus (Johansen *et al.*, 1994).

Dada la diversidad existente de virus vegetales en la naturaleza, éstos se clasifican de acuerdo con el tipo de ácido nucleico, la organización genómica y el mecanismo de replicación, la forma y el tamaño de la partícula viral, la presencia de cubierta proteica, las características de las proteínas virales, los hospedantes, la patogenicidad y el modo de transmisión (Gómez Aix, 2015). Por ello, el Comité Internacional para Taxonomía Viral (ICTV) desarrolló un sistema de clasificación regido por una serie de pautas que permiten mantener una unidad familiar. Actualmente, reconoce más de 1000 especies de virus vegetales agrupadas en familias y géneros.

Los virus son una de las principales causas de la disminución de la producción de cultivos hortícolas y florícolas (Quenouille *et al.*, 2013). Entre los síntomas que producen se destacan clorosis, mosaicos y moteados foliares, raquitismo, enanismo, epinastía, deformación de hojas, flores y frutos, producción de ampollas (Pérez- Moreno *et al.*, 2008) y, en ciertos casos, necrosis que pueden culminar en la muerte de la planta (Bravo-Almonacid *et al.*, 2011).

Durante los últimos años, la globalización de la industria de las plantas ornamentales ha ocasionado notables cambios, entre ellos el aumento de la cantidad de variedades, su rápida rotación y un incremento masivo del alcance del comercio a nivel mundial, lo que podría originar riesgos epidemiológicos de gravedad debido a la transmisión de enfermedades virales (Verdin *et al.*, 2017). Este tipo de afecciones tiene una alta importancia económica en las plantas ornamentales, especialmente en las que se multiplican en forma agámica, ya que con este procedimiento los virus se propagan fácilmente y con ello la carga viral se incrementa de generación en generación, lo cual afecta marcadamente la calidad del producto.

Dado que existe una alta cantidad de especies y variedades ornamentales con orígenes filogenéticos y geográficos que varían considerablemente, el número de agentes infecciosos, tales como los virus, varía en consecuencia, lo que ocasiona una amplia gama de sistemas patológicos de plantas con virus (Engelmann y Hamacher, 2008). Por ello, la presencia de virus conocidos y aún sin explorar en las plantas ornamentales tiene un claro potencial para ser la fuente de los principales patógenos de los cultivos (Verdin *et al.*, 2017), por lo que ciertos estudios indican que las pérdidas económicas originadas por estas enfermedades podrían mitigarse mediante la aplicación de distintas tecnologías (Cutler *et al.*, 2018). Por lo tanto, el estudio de la interacción planta-patógeno, el uso de cultivares resistentes y el cultivo de meristemas resultan de suma importancia para contribuir con la formulación de medidas preventivas contra estos agentes de infección.

Hongos fitopatógenos. Características generales

Frecuentemente, las plantas ornamentales se ven afectadas por hongos patógenos e incluso por oportunistas saprófitos (Orberá Ratón *et al.*, 2009). Las enfermedades fúngicas constituyen la mayor causa de pérdidas en las producciones, tanto durante el cultivo como en la postcosecha. El impacto negativo incrementa los costos de producción porque requiere de la implementación de estrategias de manejo (Quintero-Domínguez *et al.*, 2019).

Los hongos son microorganismos eucariotas cuyas células están conformadas por un núcleo delimitado por una membrana nuclear, mitocondrias, vacuolas, retículo endoplasmático, aparato de Golgi y ribosomas contenidos en el citoplasma. Este se encuentra rodeado por la membrana citoplasmática que controla la permeabilidad celular y participa de la síntesis de la pared celular. Esta pared se compone por polisacáridos como quitina, pectina y glucanos, y es la responsable de la forma y de la protección frente a los cambios osmóticos. Estas células se diferencian de las células de las plantas en la composición de la pared y en que carecen de cloroplastos y clorofila (Liébana Ureña, 2002).

Literalmente, los hongos se pueden encontrar en todas partes, por ejemplo, en la estratósfera (Wainwright *et al.*, 2003), en sedimentos oceánicos profundos (Nagahama *et al.*, 2011) y en cualquier punto intermedio. Estos microorganismos intervienen en la biogeoquímica global, pues reciclan carbono y movilizan elementos como el nitrógeno y el fósforo. A su vez, proporcionan un apoyo esencial para la vida vegetal en forma de endófitos y micorrizas, mientras que los patógenos pueden diezmar poblaciones de plantas y animales. Las singularidades metabólicas de varios tipos de hongos han

proporcionado a la humanidad alimentos y bebidas fermentados, medicinas otros compuestos con importantes usos industriales (Naranjo-Ortíz y Gabaldón, 2019).

Para los hongos fitopatógenos el ciclo de la enfermedad comienza a partir de la sobrevivencia mediante estructuras especiales –órganos sexuales o de origen vegetativo- que les permiten afrontar condiciones ambientales adversas hasta encontrar al hospedante. La dispersión de estas estructuras puede darse por acción del viento, de la lluvia, de insectos, animales, herramientas sin desinfectar y por tierra contaminada. La penetración del patógeno en la planta se puede dar en forma directa mediante la producción de apresorios y la secreción de enzimas o bien en forma indirecta por estomas, lenticelas o heridas en los tejidos. Luego de que el patógeno ingresa a la planta se establece la infección, coloniza tejidos, genera síntomas, se reproduce en forma asexual o sexual y las estructuras generadas pueden volver a iniciar el ciclo (Agris, 2005).

La taxonomía fúngica ha sufrido grandes cambios desde el reconocimiento de este grupo en la taxonomía linneana, donde se consideraba parte del 'Regnum Vegetabile'. Las primeras clasificaciones incluían varios grupos de eucariotas heterótrofos caracterizados por su nutrición osmotrófica con afinidad filogenética diversa, así como un núcleo de clados considerados colectivamente como los "hongos verdaderos" o Eumycota. En un principio, se definieron cuatro filos principales dentro de los hongos verdaderos, en función de sus rasgos morfológicos y reproductivos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Naranjo-Ortíz y Gabaldón, 2019).

Actualmente, los hongos pertenecen al dominio Eucaryota y al reino Fungi. En los últimos años, se han llevado a cabo estudios de secuenciación de alto rendimiento que han posibilitado recategorizar al reino en 9 subreinos y 18 filos a partir de distintos estudios filogenéticos (Tabla I.1) (Tendersoo *et al.*, 2018).

Tabla I.1. Clasificación de hongos según reino, subreino y filo (Tendersoo *et al.*, 2018)

Reino	Subreino	Filo
Fungi	Rozellomyceta	Rozellomycota
	Aphelidiomyceta	Aphelidiomycota
	Blastocladiomyceta	Blastocladiomycota
	Chytridiomyceta	Chytridiomycota
		Monoblepharomycota
		Neocallimastigomycota
	Olpidiomyceta	Olpidiomycota
	Basidiobolomyceta	Basidiobolomycota
	Zoopagomyceta	Entomophthoromycota

		Kickxellomycota
		Zoopagomycota
	Mucoromyceta	Mucoromycota
		Martierellomycota
		Calcariosporiellomycota
		Glomeromycota
	Dikarya	Entorrhizomycota
		Basidiomycota
		Ascomycota

El estado sexual de los hongos se denomina perfecto o teleomorfo y el asexual se llama imperfecto o anamorfo, el cual es el estado más frecuente de reproducción. Para agrupar provisoriamente a los hongos asexuales aún no conectados con un estado teleomorfo, se originó la clase artificial Deuteromycetes. Cuando aparecen las formas sexuales habitualmente se asignan a Ascomycota (excepcionalmente Basidiomycota) (Rivera y Wright, 2020). Dentro de los Deuteromycetes fitopatógenos asociados a Ascomycota se destacan los que ocasionan los mohos negros y verde-azules (género *Aspergillus*), los mohos verdes (género *Penicillium*), los mohos grises (*Botrytis*), *Fusarium* y *Cercospora* (Rivera y Wright, 2020). En cuanto a los Ascomycota, su distribución es cosmopolita porque se pueden encontrar en hábitats continentales y marinos, ya sea como saprófitos, parásitos o simbioses, lo cual les permite participar en interacciones ecológicas importantes para el funcionamiento de los ecosistemas (Ávalos Lázaro *et al.*, 2018). En su mayoría, son hongos filamentosos, que poseen hifas septadas y ramificadas, y producen cuerpos reproductivos (ascos). Su forma de reproducción sexual es mediante ascosporas, en órganos llamados ascos. Dentro de los grupos de importancia desde el punto de vista de este trabajo se encuentran las levaduras (género *Saccharomyces*) y los hongos fitopatógenos tales como el cornezuelo del centeno (*Claviceps purpurea*) (Menzies y Turkington, 2015) y *Nigrospora oryzae* (Borrelli, 2020 a).

El filo Chytridiomycota es el único filo de hongos verdaderos que se reproduce con esporas móviles (zoosporas), los cuales se clasifican en cinco órdenes según el hábitat, los caracteres de las zoosporas y los ciclos de vida (James *et al.*, 2006).

El filo Mucoromycota está compuesto por hongos inferiores con talos cenocíticos, que producen zigosporas después de la fusión de órganos sexuales (Richardson, 2009). Son ubicuos, extremadamente frecuentes, provocan podredumbres en los alimentos y en las plantas, pero también los hay parásitos de diversos organismos, como protozoos, insectos y mamíferos. Además, algunas especies son micorrizógenas (Gallego y

Sánchez, 2021). Dentro de los hongos fitopatógenos pertenecientes a este filo se destacan *Choanephora cucurbitarum* y *Rhizopus stolonifer*.

El filo Basidiomycota reúne más de 30.000 especies de alta complejidad morfológica que poseen basidios (órganos donde se desarrollan las esporas de origen sexual), (Rojas Ramírez, 2013). Estos hongos tienen una amplia intervención en la naturaleza debido a que algunos de ellos son capaces de descomponer o degradar la lignina, tales como *Lentinus hirtus*, *Schizophyllum commune* y *Trametes versicolor*, otros causan royas y carbones, como *Puccinia graminis*, *Puccinia melanocephala*, *Hemileia vastatrix*, *Ustilago scitaminea* y *Tilletia tritici* (Agrios, 2005) y algunos forman ectomicorrizas como *Amanita boletus* (Rojas Ramírez, 2013).

Como consecuencia de la implantación de un elevado número de plantas ornamentales de la misma especie en espacios a veces reducidos, han aparecido brotes de enfermedades, principalmente micosis, lo cual crea inquietud permanente en los productores (Sosa López *et al.*, 2014) y en los institutos de investigación. Estas enfermedades se esparcen rápidamente y dañan flores, destruyen tallos, hojas y raíces, lo que acaba con toda la producción y con cultivos cercanos (Sandoval Pillajo *et al.*, 2021), lo que constituye generalmente la mayor causa de pérdidas en la producción agrícola. Estos microorganismos comprenden uno de los principales grupos de patógenos de importancia, tanto por su diversidad como por las pérdidas que originan a nivel económico (Rudy *et al.*, 2011). En el caso de *Calibrachoa*, se detectó el hongo fitopatógeno *Nigrospora oryzae* como el agente causal de daños importantes en plantas del Instituto de Floricultura del INTA, lo que originó, en consecuencia, serios inconvenientes en el programa de mejoramiento de la especie. Dado que uno de los objetivos del Instituto es el desarrollo de cultivares provenientes de especies nativas y, ante la falta de información que existe hasta el momento, resulta importante profundizar sobre diversos aspectos de esta micosis.

Fundamentación

En el Instituto de Floricultura del INTA (IF), el género *Calibrachoa* se encuentra dentro de los planes de mejoramiento clásico para la obtención de cultivares comerciales a partir de germoplasma nativo. Por ello, realiza la transferencia de los cultivares mediante convenios con empresas nacionales (Geoplant S.R.L.) e internacionales (Proven Winners, EE. UU.) que los comercializan, lo cual se encuentra enmarcado dentro de los objetivos del INTA de generar conocimientos y especies mejoradas para el sector florícola.

Durante la revisión bibliográfica no se han encontrado resultados sobre los problemas sanitarios de *Calibrachoa* ni de especies afines en la Argentina y la información internacional es muy escasa. La consulta a profesionales, como extensionistas y distintos agentes que desarrollan actividades relacionadas con la producción, señaló que los problemas encontrados coincidían con los del IF. Por ello, a través de este trabajo se buscó generar información y dar una posible solución a la problemática sanitaria actual de *Calibrachoa* basada en *Potyvirus* y *Nigrospora oryzae*. El enfoque buscó lograr herramientas que posibiliten a los mejoradores y a los productores una mayor comprensión de la temática a fin de desarrollar técnicas y alternativas que permitan enfrentar con éxito esta situación problema.

El desarrollo de esta tesis permite cubrir una de las necesidades del Instituto y poseer información para los planes de mejoramiento y obtención de cultivares de *Calibrachoa* con mayor grado de adaptación a la situación sanitaria de la zona y a los requerimientos del medio productivo.

El trabajo fue financiado y realizado en el marco del Proyecto de Investigación Científica y Tecnológica (PICT) Start Up 2015-0018, que tuvo como investigadora responsable a la Dra. María Silvana Soto y estuvo articulado con el PICT 2016 N° 2589, sobre manejo fitosanitario en ornamentales, dirigido por la Dra. Marta C. Rivera.

Objetivo general

Conocer la problemática sanitaria que presenta *Calibrachoa hybrida* y desarrollar un protocolo de manejo que incluya distintas tecnologías para obtener plantas de calidad.

BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. EE. UU. Editorial: Elsevier Academic Press, 922 pp. 5^{ta} edición.

- Ávalos Lázaro, A.; Gil, R.; García, S.; Ordaz, J. (2018). "Ascomycetes (Fungi: Ascomycota) del Parque Estatal Agua Blanca, Macuspana, Tabasco, México". *Acta Botánica Mexicana*. 122:141-154.
- Bischoff, D.; Morisigue, D. (2008). "Caracterización del sector florícola en la provincia de Misiones". *IV Congreso argentino de Floricultura y plantas ornamentales; X jornadas nacionales de floricultura*. (p.605). Corrientes, Argentina: Ediciones INTA.
- Borrelli, N. P.; Stancanelli, S.; Hagiwara, J. C.; Rivera, M. C. (2018). "Primer reporte de *Rhizoctonia solani* como patógeno de *Calibrachoa hybrida* en Buenos Aires". *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*. 38(27).
- Borrelli, N.P.; Stancanelli, S.; Papone, M.L.; Moreno, M.V.; Stenglein, S.; Wright, E.R.; Hagiwara, J.C.; Rivera, M.C. (2020 a). "Leaf spots of calibrachoa caused by *Nigrospora oryzae*". *Ornamental Horticulture*. 26(4):590-596.
- Borrelli, N.P.; Papone, M.L.; Moreno, M.V.; Stenglein, S.A.; Stancanelli, S.; Wright, E.R.; Hagiwara, J.C.; Rivera, M.C. (2020 b). "First report of basal rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on *Calibrachoa hybrida*". *Plant Disease*.104(12):3254.
- Borrelli, N. P.; Cureses, D.; Calicanton, S. A.; Stancanelli, S.; Hagiwara, J. C.; Wright, E. R.; Rivera, M. C. (2021a). Respuesta de cultivares de calibrachoa a *Alternaria tenuissima* y *Nigrospora oryzae*. *V Congreso Argentino de Fitopatología*. Resúmenes. <https://congreso.caf2021.com.ar/nota/bsq?ID=402||RESPUESTA-DE-CULTIVARES-DE-CALIBRACHOA-A-Alternaria-tenuissima-Y-Nigrospora-oryzae>.
- Borrelli, N. P.; Hagiwara, J. C.; Stancanelli, S.; Wright, E. R.; Rivera, M. C. (2021b). Interacción cepa-variedad para el patosistema *Fusarium oxysporum-Calibrachoa hybrida*. *V Congreso Argentino de Fitopatología*. Resúmenes. <https://congreso.caf2021.com.ar/nota/bsq?ID=267||INTERACCION-CEPA-VARIEDAD-PARA-EL-PATOSISTEMA-Fusarium-oxysporum-Calibrachoa-hybrida>.
- Borrelli, N. P.; Stancanelli, S.; Hagiwara, J. C.; Wright, E. R.; Rivera, M. C. (2021c). Primer reporte de *Sclerotinia sclerotiorum* causando tizón en *Calibrachoa hybrida*. *V Congreso Argentino de Fitopatología*. Resúmenes. <https://congreso.caf2021.com.ar/nota/bsq?ID=196||PRIMER-REPORTE-DE-Sclerotinia-sclerotiorum-CAUSANDO-TIZON-EN-Calibrachoa-hybrida>.
- Bravo-Almonacid, F.; Rudoy, V.; Welin, B.; Segretin, M.E; Bedogni, M. C; Stolicz F.; Criscuolo, M.; Foti, M.; Gomez, M.; López, M.; Serino, G.; Cabral, S.; Dos Santos, C.; Huarte, M.; Mentaberry, A. (2011). "Field testing, gene flow assessment and pre-commercial studies on transgenic *Solanum tuberosum* spp. tuberosum (cv. Spunta) selected for PVY resistance in Argentina". *Transgenic Research*. 21, 967-982.
- Brault, V.; Uzest, M.; Monsion, B.; Jacquot, E.; Blanc, S. (2010) "Aphids as transport devices for plant viruses". *Comptes Rendus Biologies*. 333 :524–538.
- Chu, Y.; Pan, J.; Wua, A.; Cai, R.; Chen, H. (2014). "Molecular cloning and functional characterization of dihydroflavonol-4-reductase gene from *Calibrachoa hybrida*". *Scientia Horticulturae*. 165:398-403.

- Cutler, J.; Langer, S.; Von Bargen, O.; Acosta-Losada, F. (2018). "Preliminary evaluation of associated viruses in production systems of cape gooseberry, purple passion fruit, and rose". *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 12(2):390-396.
- Engelmann, J. y Hamacher, J. (2008). Plant virus diseases: ornamental plants. Encyclopedia of Virology. Editors: Brian W.J. Mahy, Marc H.V. Van Regenmortel. Pp. 207-229. Academic Press. 3^{era} Edición.
- Flora Argentina. (2018). <http://www.floraargentina.edu.ar/>. Fecha de acceso: 03/04/2021.
- Gabriel, P. M.; Maina, M.; Buyatti, M. (2010). "Formulación y evaluación de un proyecto de inversión en una plantación de crisantemo del cinturón verde de la ciudad de Santa Fe". V *Congreso Argentino de Floricultura y plantas ornamentales*. (p. 306). Concordia, Entre Ríos. Argentina: Imprenta Italia.
- Gallego, E. y Sánchez, J. (2021). "MYCO-UAL". Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Almería, España. Disponible en: <https://w3.ual.es/GruposInv/myco-ual/zigos.htm>. Fecha de último acceso: 14/10/2021.
- Greppi J. A.; Hagiwara J. C.; Stehmann R. (2013 a). "Novedades en *Calibrachoa* (*Solanaceae*) y notas taxonómicas sobre el género para la Argentina". *Darwiniana*. 1(1).
- Greppi J. A.; Hagiwara J. C.; Stehmann R. (2013 b). "Las especies argentinas de *Calibrachoa* (*Solanaceae*)". *XXXIV Jornadas Argentinas de Botánica*. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Gómez Aix, C. (2015). Interacción MNSV-planta de melón: una aproximación transcriptómica y celular. Trabajo final para optar por el título de Doctor en Biología. Facultad de Biología, Universidad de Murcia, España.
- Hagiwara, J. C. (2013 a). "Pampa Salmón-INTA". Disponible en: <https://inta.gob.ar/variedades/pampa-salmon-inta>. Fecha de acceso: 03/04/2021.
- Hagiwara, J. C. (2013 b). "Overá Fucsia-INTA". Disponible en: <https://inta.gob.ar/variedades/overa-fucsia-inta>. Fecha de acceso: 03/04/2021.
- Hagiwara, J. C.; Pannunzio, M. J. (2015). *Calibrachoa* variedades INTA 'Pampa Salmón INTA' y 'Overá Fucsia INTA'. Instituto de Floricultura. INTA. JICA. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.
- Hagiwara, J. C. (2016). "Calibrachoa: una flor que conquista nuevos jardines". Disponible en: <https://intainforma.inta.gob.ar/calibrachoa-una-flor-que-conquista-nuevos-jardines/>. Fecha de acceso: 03/04/21.
- Hawksworth, D.L.; Lücking, R. (2017). "Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species". *Microbiology Spectrum*. 5:1-17.
- Hull, R. (2009). *Comparative plant virology*. Editorial: Academic Press. Norwich, Reino Unido. 2^{da} edición.
- James, T.Y.; Letcher, P.M.; Longcore, J. E.; Mozley-Standridge, S. E.; Porter, D.; Powell, M. J.; Vilgalys, R. (2006). "A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota)". *Mycologia*. 98(6):860-871.

- Johansen, E.; Edwards, M.; Hampton, R. (1994). "Seed transmission of viruses: current perspectives". *Annual Review of Phytopathology*. 32:363-383.
- John, A.L.W.; Mäder, G.; Fregonezi, J.N.; Freitas, L. (2019). "Genetic diversity and population structure of naturally rare *Calibrachoa* species with small distribution in southern Brazil". *Genetics and Molecular Biology*. 42(1):108-119.
- Jones, J.D.G.; Dangl, J.L. (2006). "The plant immune system". *Nature*. 444:323–329
- Kanaya, T.; Watanabe, H.; Kokubun, H.; Matsubarab, K.; Hashimotoc, G.; Marchesi, E.; Bullrich, L. (2010 a). "Current status of commercial *Calibrachoa* cultivars as assessed by morphology and other traits". *Scientia Horticulturae*. 123(4):488-495.
- Kanaya, T.; Watanabe, H.; Kokubun, H.; Matsubarab, K.; Hashimotoc, G.; Marchesi, E.; Bullrich, L. (2010 b). "Flowering ability of commercial cultivars as compared to that of natural species". *Scientia Horticulturae*. 126(2):276-283.
- Kanaya, T. (2016). Tendencias del mercado mundial de plantas ornamentales. Curso INTA-JICA "Mejoramiento Genético de Plantas Ornamentales a partir de Recursos Genéticos Nativos". Hurnlingham, Buenos Aires, Argentina.
- Lecomte, C.; Alabouvette, V.; Robert, F.; Steinberg, C. (2016). "Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: a review". *Biological Control*. 101:17-30.
- Liébana Ureña, J. (2002). *Microbiología oral*. Editorial: McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid, España. 2^{da} edición.
- Mäder, G.; Freitas, L.B. (2019). "Biogeographical, ecological and phylogenetic analyses clarifying the evolutionary history of *Calibrachoa* in South American grasslands". *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 141:1-10.
- Mazzoni, A.; Segui, M. F.; Morisigue, D.; Villanova, I. (2008). "Caracterización del consumidor de plantas ornamentales en maceta en la Patagonia Argentina". *IV Congreso argentino de Floricultura y plantas ornamentales; X jornadas nacionales de floricultura*. (p. 599). Corrientes, Argentina: Ediciones INTA.
- Menzies, J. G.; Turkington, T. K. (2015). "An overview of the ergot (*Claviceps purpurea*) issue in western Canada: challenges and solutions". *Canadian Journal of Plant Pathology*. 37(1):40-51.
- Milicia, V. J.; Facciuto, G.; Coviella, A.; Soto, S. (2010). "Estudios preliminares en cruzamientos intergenéricos entre el género *Nierembergia* y *Calibrachoa*". *V Congreso argentino de Floricultura y plantas ornamentales*. (p.247). Concordia, Entre Ríos. Argentina: Imprenta Italia.
- Milicia, V. J.; Coviella, A.; Soto, M. S.; Chiesa, A. (2016). "Mejoramiento de plantas nativas sudamericanas: altas temperaturas como herramienta para superar barreras precigóticas en el complejo *Calibrachoa-Nierembergia*". *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*. 32 (2).
- Mónaco, E.; Rocha, M. S.; Medina, J.; Morisigue, D. (2008). "Principales zonas de producción de plantines para jardinería y macetas con flores en la provincia de Buenos Aires". *IV Congreso argentino de Floricultura y plantas ornamentales; X jornadas nacionales de floricultura*. (p. 639). Corrientes, Argentina: Ediciones INTA.

- Morisigue, D.; Facciuto, G.; Nishiyama, L.; Suárez, E. (2004). *Veintisiete años de CETEFFHO en la floricultura argentina. II Congreso argentino de floricultura y plantas ornamentales, VI Jornadas nacionales de floricultura*. Buenos Aires, Argentina. Libro de resúmenes. P 320.
- Nagahama, T.; Takahashi, E.; Nagano, Y.; Abdel-Wahab, M. A.; Miyazaki, M. (2011). "Molecular evidence that deep-branching fungi are major fungal components in deep-sea methane cold-seep sediments". *Environmental Microbiology*. 13:2359-2370.
- Naranjo-Ortiz, M. A.; Gabaldón, T. (2019). "Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi." *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* vol. 94(6):2101-2137.
- Orberá Ratón, T.; Serrat Díaz, M.; González Giro, S. (2009). "Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales". *Fitosanidad*. 13(2):95-100.
- Oren, A. y Gunde-Cimerman, N. (2012). "Fungal life in the dead sea". En: Raghukumar, C. (eds) *Biology of Marine Fungi. Progress in Molecular and Subcellular Biology*, vol 53. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Pérez-Moreno, L.; Gómez, D.; Jaramillo, E.; Malagón, R.; Celedón, B. (2008). "Efecto de virus fitopatógenos sobre características agronómicas y calidad del ajo (*Allium sativum* L.) en el estado de Guanajato, México". *Revista Mexicana de Fitopatología*. 26(1):40-48.
- Quenouille, J.; Vassilakos, N.; Moury, B. (2013). "Potato virus Y: a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity". *Molecular Plant Pathology*. 14(5):439-452.
- Quintero-Domínguez, L.; Rodríguez, L.; Sánchez, D.; Ávila, B. (2019). "Sistema experto para el diagnóstico presuntivo de enfermedades fúngicas en los cultivos". *Revista Cubana de Ciencias Informáticas*. 13(1):61-75.
- Richardson, M. (2009). "The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure". *Clinical, microbiology and infection*. 15(5):2-9.
- Rivera, M.C.; Wright, E.R. (2020). *Apuntes de patología vegetal. Fundamentos y prácticas para la salud de las plantas*. Editorial: Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina. 1^{era} edición.
- Rojas Ramírez, L. (2013). "Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisoriosa con impacto en la agricultura". *Fitosanidad*. 17(1):49-55.
- Rudy, N.; Smeltekop, H.; Almanza J.C.; Loza-Murguía, M. (2011). "Evaluación de la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Trichoderma* spp sobre *Rhizoctonia* sp y *Fusarium* sp en café (*Coffea arabica*) en condiciones experimentales". *Journal of the Selva Andina Research Society*. 2(1):43-52.
- Sandoval Pillajo, A. L.; Checa Cabrera, M. A.; Díaz Vásquez, R. A.; Acosta Espinoza, J. L. (2021). "Sistema experto para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades y plagas en plantas ornamentales". *Revista Universidad y Sociedad*. 13(3):505-51.

- Sosa López, A.; Rennis, L.; Cabrera, M. G.; Castillo, A. G. (2014). "Determinación de hongos patógenos en cultivos ornamentales y su control con soluciones de propóleos". *Agrotecnia*. 22:13-17.
- Soto, M. S.; Hagiwara, J. C.; Pannunzio, M. J.; Stancanelli, S.; Facciuto, G. (2008). "Evaluación de clones selectos del género *Calibrachoa* para su uso en cantero". *IV Congreso argentino de Floricultura y plantas ornamentales*. (p. 143). Corrientes, Argentina: Ediciones INTA.
- Stange, C. (2006). "Interacción planta-virus durante el proceso infeccioso". *Ciencia e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura*. 33(1):3-21.
- Suárez, M.; Imhof, I.; Paganelli, F.; Soto, S.; Hagiwara, J. C.; Facciuto, G. (2010). "Avances en la incorporación de clones selectos provenientes de especies nativas al mercado ornamental de la provincia de Córdoba". *V Congreso argentino de Floricultura y plantas ornamentales*. (p. 314). Concordia, Entre Ríos. Argentina: Imprenta Italia.
- Tedersoo, L.; Sánchez-Ramírez, S.; Kõljalg, U. *et al.* (2018). "High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses". *Fungal Diversity*. 90:135–159.
- Tsukamoto, T.; Ando, T.; Watanabe, H.; Kokubun, H.; Hashimoto, G.; Sakazaki, U.; Suárez, E.; Marchesi, E.; Oyama, K.; Kao T. (2002). "Differentiation in the status of self-incompatibility among *Calibrachoa* species (*Solanaceae*)". *Journal of Plant Research*. 115, 185-193.
- Verdin, E.; Wipf-Scheibel, C.; Gognalons, P.; Aller, F.; Jacquemond, M. (2017). "Sequencing viral siRNAs to identify previously undescribed viruses and viroids in a panel of ornamental plants samples structured as a matrix of pools". *Virus Research*. 241:19-28.
- Villanova, I.; Morisigue, D. (2016). *Relevamiento de la producción de flores y plantas ornamentales en el área Metropolitana de Buenos Aires y el partido de San Pedro, Provincia de Buenos Aires. Plan de Mejora Competitiva*. Buenos Aires, Argentina. Editorial: Ediciones INTA.
- Wainwright, M.; Wickramasinghe, N. C.; Narlikar, J. V.; Rajaratnam, P. (2003). "Microorganisms cultured from stratospheric air samples obtained at 41 km". *FEMS Microbiology Letters*. 218: 161–165.
- Whitfield, A., B. Falk, and D. Rotenberg. (2015). "Insect vector-mediated transmission of plant viruses". *Virology*. 2015:278-289.
- Wijsman, H.; de Jong, J. (1985). "On the inter-relationships of certain species of *Petunia* IV. Hybridization between *P. linearis* and *P. calicyna* and nomenclatorial consequences in the *Petunia* group". *Acta Botanica Neerlandica*. 34: 337-349.

CAPÍTULO II

Identificación del *Potyvirus* que infecta a *Calibrachoa* cv. *Pampa Salmón INTA* y *C. cv. Overá Fucsia INTA: Potato virus Y*

INTRODUCCIÓN

Potyvirus es un género de la familia Potyviridae formado por más de 180 especies (Arous *et al.*, 2018) que le debe su nombre a la especie tipo, el *Potato virus Y* (PVY). Los miembros de este género se caracterizan por tener una estructura flexible y filamentosa que forma inclusiones cilíndricas con aspecto de aspas de molino en el citoplasma de las células infectadas (Martínez-García *et al.*, 2001). La partícula viral está compuesta por una cadena simple de ARN de 10 kb con una cola poli A en su extremo 3' y una proteína VPg en su extremo 5' (Green *et al.*, 2017). A su vez, la cadena contiene una fase de lectura abierta que da lugar a un factor de transmisión HC-Pro, una proteína de las inclusiones cilíndricas (CI), una proteína "a" de las inclusiones celulares (NIa), una proteína "b" de las inclusiones celulares (NIb) y una cápside proteica (CP) (Martínez-García *et al.*, 2001) (Figura II.1).

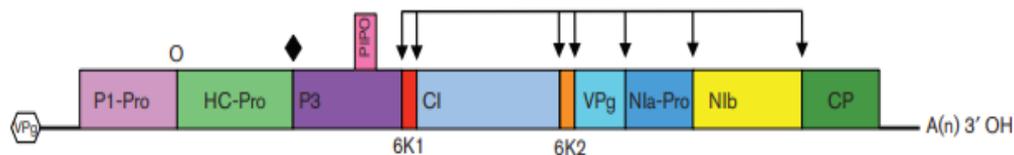


Figura II.1. Organización genómica de un miembro típico del género *Potyvirus* (Wylie *et al.* 2017)

Los síntomas que provocan los *Potyvirus* dependen del aislamiento, del cultivar hospedante y de las condiciones ambientales presentes (Quenouille *et al.*, 2013). Aparecen entre los 7 y 21 días después de la infección y pueden producirse en todos los estadios de crecimiento de las plantas (Díaz *et al.*, 2010). Generalmente, provocan mosaicos, distorsiones foliares, moteados y estriados (Cafrune *et al.*, 2011), caída de hojas, raquitismo (Quenouille *et al.*, 2013) y, en casos avanzados, necrosis y muerte de la planta (Bravo-Almonacid *et al.*, 2011).

Los potyvirus pueden ser transmitidos en forma mecánica, mediante semillas, polen y vectores, fundamentalmente áfidos (Kraus *et al.*, 2010). Este último tipo de transmisión es no circulativa y no persistente. Dicha transmisión no circulativa, implica que los virus se asocian a la cutícula y no pueden atravesar las barreras del sistema digestivo del insecto (Garrido, 2018). Al ser no persistente, los virus se mantienen en el estilete del insecto y se caracterizan por tener períodos muy cortos para su adquisición y retención. Se asocian con el estilete del áfido, donde son retenidos durante unos minutos, e

inoculados posteriormente. La adquisición y la inoculación se producen durante las breves inserciones de prueba que realiza el áfido sobre la planta para comprobar si es un hospedante apropiado (Moreno Lozano, 2005; Garrido, 2018). A su vez, en la transmisión de potyvirus por áfidos es necesaria la presencia de proteínas no estructurales de origen viral, también denominadas *helper component*, como la HC-Pro, la cual permite su posterior inoculación en la planta (Martínez-García *et al.*, 2001; Garrido, 2018).

Los miembros del género *Potyvirus* son responsables de graves pérdidas económicas ocasionadas por sus daños a los cultivos (Damsteegt *et al.*, 2012). Algunos ejemplos a nivel mundial se encuentran en Cuba, donde se detectaron infecciones en cultivos de begonia, dalia, lirio y oreja de elefante (González Arias y Loreto Reyes, 2013). A su vez, en Costa Rica se detectó la presencia de los potyvirus *Bean common mosaic virus* (BCMV) y *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), los cuales causaron daños en especies nativas de orquídeas de alta importancia comercial (Ortiz Arias, 2002). Por su parte, en la Argentina, se ha detectado el *Potyvirus sunflower chlorotic mosaic virus* en girasol (Dujovny *et al.*, 2000), el sweet potato virus G en batata (Rodríguez Pardina *et al.*, 2012), el *Dasheen mosaic virus* en cala (Cafrune *et al.*, 2011), el *Sugarcane mosaic virus* en caña de azúcar (Perera *et al.*, 2009) y el *Potato virus Y* (PVY) en *Solanum tuberosum* (papa) (González y Huarte, 2016), entre otros.

Particularmente, el PVY se convirtió en el virus económicamente más importante de la papa en la década de 1980, después de la aparición de los recombinantes de PVY que causan la 'enfermedad de la mancha anular necrótica del tubérculo de la papa', ya que además de transmitirse por áfidos, se transporta en los tubérculos infectados (Fuentes *et al.*, 2019). Además de afectar al cultivo de papa, puede encontrarse en otros cultivos en hortalizas, como tomate y pimiento, y en industriales, como tabaco (Ximb *et al.*, 2017), al cual le puede provocar una reducción del 80 % del rendimiento (Babujee *et al.*, 2019). A su vez, se ha reportado en cultivos ornamentales como dalia y petunia (Quenouille *et al.*, 2013), la cual está estrechamente emparentada con el género *Calibrachoa* (Greppi *et al.*, 2013).

El PVY es un virus variable a nivel biológico y molecular debido a su alta tasa de mutación y de recombinación genética (Karasev y Gray, 2013). Los principales grupos biológicos comúnmente reconocidos son el PVY ordinario (PVY^O), el cual provoca mosaicos y las agrupaciones que causan necrosis en los haces vasculares (PVY^N) (Coutts y Jones, 2015). Además, existen otras tres agrupaciones, las cuales son PVY^C, PVY^E y PVY^Z (Coutts y Jones, 2015). PVY^C produce estriado puntiforme en papa, PVY^E induce síntomas de mosaico (Fuentes *et al.*, 2019), mientras que PVY^Z causa síntomas no necróticos, pero es serológicamente diferente a PVY^O (Singh *et al.*, 2008). Por su

parte, la recombinación entre estos grupos como eventos de mutación han dado lugar a nuevos grupos definidos filogenéticamente como PVY^{NTN}, PVY^{N-Wi}, y PVY^{N:O} (Coutts y Jones, 2015). Este último ha sido denominado de esta manera, ya que induce necrosis de venas en tabaco (como PVY^N), pero tiene una reacción serológica similar a la raza PVY^O, por lo que se ha demostrado que dicha variante es producto de eventos recombinatorios entre aislamientos de PVY^N y PVY^O (Muñoz-Baena *et al.*, 2016). Como consecuencia de estas recombinaciones, la composición de las poblaciones de PVY dentro de las áreas de crecimiento de la papa en varias partes del mundo ha cambiado con el tiempo, lo que incluyó la generación de variantes que causan necrosis de tubérculos en cultivares de papa susceptibles (Coutts y Jones, 2015).

Desde 2009, en el Instituto de Floricultura INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) se realizan detecciones de las virosis de mayor frecuencia en cultivos ornamentales mediante la técnica ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) en sus diferentes variantes. Hasta el momento no se han registrado casos de *Groundnut ringspot virus* ni *Tomato chlorotic spot virus* en *Calibrachoa*. Solamente en 2012 se detectaron 2 plantas con *Calibrachoa mottle virus* (1,8 % de incidencia) y, en 2010 y 2011, se observó 8 y 3 % de incidencia de *Cucumber mosaic virus*, respectivamente. A su vez, se encontraron valores similares de incidencia de *Tomato spotted wilt virus* durante esos dos años (Alderete *et al.*, 2012). En cambio, durante todos los años de análisis se detectó la presencia del grupo *Potyvirus* en las plantas de *Calibrachoa* pertenecientes a los programas de mejoramiento genético del Instituto. En 2009, la incidencia de este género fue del 5 %, pero surgió un aumento conforme al tiempo: en 2010, hubo 48 % de incidencia y en 2011, 38 %. Desde 2012 a 2014, los valores de incidencia de potyvirus fueron menores (16 %), pero en 2015 aumentaron al 84 % y luego disminuyeron al 50 % en 2016, los cuales se mantienen hasta la actualidad (Alderete, comunicación personal). Por este motivo, resultó entonces de suma importancia profundizar los estudios relacionados con la identificación de los potyvirus patógenos de las variedades de calibrachoa originadas en la institución. Además, porque hasta el momento, en la Argentina, no se ha reportado información sobre las especies de *Potyvirus* que infectan a calibrachoa.

HIPÓTESIS

Las plantas de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA y de C. cv. Overá Fucsia INTA del Instituto de Floricultura que presentan moteados, arrugados foliares y decoloración de flores se encuentran infectadas por el *Potyvirus Potato virus Y* (PVY).

OBJETIVO

Determinar la presencia e identificar el/los *Potyvirus* que infecta/n a *Calibrachoa* cv. *Pampa Salmón INTA* y *C. cv. Overá Fucsia INTA*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Muestras de hojas de 19 plantas de *Calibrachoa* (10 plantas de *C. cv. Pampa Salmón INTA* y 9 de *C. cv. Overá Fucsia INTA*) que presentaban moteados y arrugados foliares, flores manchadas y raquitismo fueron colectadas de un invernadero del Instituto de Floricultura del INTA, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina (Latitud Sur: 34,67; Longitud Oeste: 58,65).

Análisis serológico

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (test de ELISA indirecto)

Para evaluar la presencia de *Potyvirus* en las plantas de *Calibrachoa* se utilizó el kit comercial BIOREBA® de tipo indirecto para el grupo *Potyvirus*. Se pesaron 1,5 g de cada muestra (hojas con moteados y arrugados foliares) mediante balanza electrónica y luego se agregaron 75 ml de buffer en una dilución 1:50 (P/V). Seguidamente, se procedió a la molienda de las muestras mediante mortero y se agregaron 200 µl del extracto acuoso de cada muestra a los pocillos de una placa de microtitulación, por duplicado. A su vez, se incluyeron los controles positivos y negativos, consistentes de tejidos vegetales suministrados en forma liofilizada por el kit BIOREBA®. Posteriormente, se conservó la placa a 4°C durante 12 horas.

Finalizado el período de incubación, se lavó la placa con buffer de lavado (buffer fosfato salino más Tween-20 0,05 %) por triplicado y se agregaron 200 µl a cada pocillo de la solución de Inmunoglobulina G. Seguidamente, la placa fue colocada en cámara húmeda a 37°C durante 2 horas. A continuación, la placa fue lavada por triplicado con el buffer de lavado. Luego, los pocillos fueron cargados con 200 µl de solución buffer conjugado BIOREBA®, conformado por la enzima fosfatasa alcalina, y la placa fue colocada nuevamente en cámara húmeda a 37°C, durante 2 horas. Finalizado ese tiempo, la placa fue lavada nuevamente con el buffer de lavado y se agregaron 200 µl de buffer sustrato BIOREBA® a cada pocillo y se dejó la placa en reposo a temperatura ambiente, durante 1 hora.

Finalmente, se procedió a la lectura de la placa mediante un espectrofotómetro de placa Bio-Rad® a 405 nm de absorbancia. La reacción fue considerada positiva cuando la lectura fue mayor al valor promedio de los controles negativos más dos veces la desviación estándar (Sutula *et al.*, 1986; Tun Suárez *et al.*, 2007).

Análisis moleculares

- Identificación del *Potyvirus* en estudio

Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se siguió un protocolo que utilizó Trizol (ThermoFisher Science ®).

En primer lugar, 0,1 g de muestras de hojas de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA y *C. cv. Overá Fucsia* INTA que resultaron positivas por la prueba de ELISA y que presentaban síntomas fueron molidas en mortero con N₂ líquido y colocadas en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Seguidamente, se agregó 1 mL de trizol a cada tubo y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 11000 rpm y a 4°C, en una microcentrífuga Hermle ® Z 323 K, durante 10 minutos. Posteriormente, se agregaron 0,2 mL de cloroformo y los tubos fueron agitados manualmente durante 15 segundos e incubados a temperatura ambiente durante 3 minutos. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 rpm y a 4 °C, durante 15 minutos. La fase acuosa fue transferida a un tubo limpio y luego se agregaron 0,5 mL de isopropanol. Posteriormente, fue incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas a 11.000 rpm a 4 °C, durante 10 minutos. Luego, se extrajo el sobrenadante, se lavó el pellet con 1 mL de etanol 75 % y se centrifugó a 4 °C a 6.000 rpm, durante 10 minutos. Se realizó un segundo lavado y luego las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente, el ARN fue re-suspendido en 50 µl de agua libre de RNAsas e incubado en baño termostático (“baño maría”) a 55 °C durante 10 minutos.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

Síntesis de ADN copia (ADNc)

La concentración de ARN fue determinada con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) a partir de la absorbancia a 260 nm, puesto que se estima que A (260 nm) = 1 equivale a 40 µg/ml de ARN. La pureza e integridad del ARN total fue determinada por la relación 260/280 nm y por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Para la síntesis de la primera cadena de ADNc se utilizó como templado 11 µg de ARN total, (25 ng/µl) el primer AP (*Adapter Primer*) 5'GGCCACGCGTCGACTAGTAC (T)₁₇ 3', que hibrida con la cola de poli A del ARN como iniciador, y transcriptasa reversa *SuperScript* III (ThermoFisher Science ®), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Detección del genoma del PVY por RT-PCR

Para la detección del PVY se amplificó la región que codifica para la proteína nuclear Nlb, la proteína de cápside y el extremo 3' UTR del genoma viral (~1.7 kb) mediante PCR, siguiendo la estrategia descrita por Chen *et al.*, (2001). Se utilizaron los *primers* S-primer (5' -GGX AAY AAY AGY GGX CAZ CC-3', X = A, G, C o T; Y = T o C; Z = A o G), que es un cebador degenerado diseñado en base a todas las secuencias disponibles de *Potyvirus* (Figura II.2), y el AUAP (*Abridged Universal Amplification Primer*) (5'GGCCACGCGTCGACTAGTAC 3'), el cual hibrida con el ADNc que se realizó a partir del cebador AP durante la RT-PCR. La mezcla de reacción de la PCR (*premix*) se realizó según la Tabla II.1.

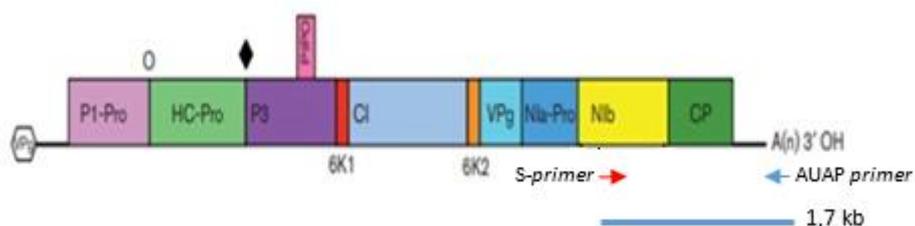


Figura II.2. Organización genómica de un miembro típico del género *Potyvirus* con la hibridación del cebador *S-primer* (5'GGX AAY AAY AGY GGX CAZ CC-3', X = A, G, C o T; Y = T o C; Z = A o G) y del primer AUAP (5'GGCCACGCGTCGACTAGTAC 3'). Se esquematiza el producto de amplificación esperado de aproximadamente 1,7 Kb
(Adaptado de Wylie *et al.* 2017)

Tabla II.1. Mezcla de reacción de la PCR (*premix*)

Reactivos	Concentración final	Volumen (µl)
H ₂ O MilliQ		33,9
Buffer 10X	1X	5
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM	1,5
dNTPs (10 mM)	0,4 mM	2
Oligo AUAP 10 µM	0,2 µM	1
S-Primer 10 µM	0,2 µM	1
Platinum Pfx ADN polimerasa (2,5 U/µl) (Thermo Fisher)	0,5 U/µl	0,2
ADNc		5
Volumen final	50 µl	50

Se agregaron 45 μ l de la *premix* y 5 μ l del ADNc correspondiente a la muestra a analizar a cada tubo. La reacción de PCR se llevó a cabo con un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 min seguido por 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 52 °C, y 1 min a 72 °C, con una extensión final a 72 °C durante 10 min.

Visualización de los productos de amplificación

Los productos de amplificación fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio (concentración final de 0,5 μ g/ml) en *buffer* TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). La corrida electroforética se realizó a voltaje constante (8 V/cm) y los productos de amplificación se visualizaron bajo luz UV.

Clonado y secuenciación del extremo 3' viral

El fragmento de amplificación de ~1,7 kb correspondiente a la región que codifica para la proteína nuclear N1b, la proteína de cápside y el extremo 3' UTR del genoma viral fue cortado del gel y purificado con el *kit* comercial Qiaex II (Qiagen) a partir de las especificaciones del fabricante. Posteriormente, el fragmento fue clonado en el vector pGEMT-easy (Promega), se transformaron bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 α competentes químicamente (Sambrook *et al.*, 1989) y se seleccionaron los clones positivos, es decir, las colonias que crecieron en medio LB con Ampicilina (100 μ g/ml) y presentaron coloración blanca en presencia de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-b-Dgalactopyranoside, 40 μ g/mL en dimetil formamida) e IPTG (Isopropil-1-tio- β -Dgalactósido, 1 mM). Para obtener ADN plasmídico de alta calidad para secuenciación, se partió de 1,5 ml de cultivo bacteriano saturado. Las bacterias se cosecharon por centrifugación en microcentrífuga a 3000 g y se obtuvo el ADN plasmídico, mediante el uso de columnas de Qiaprep Spin Plasmid Miniprep Kit (Qiagen), según las especificaciones del fabricante.

El ADN fue secuenciado en el servicio de secuenciación del Instituto de Biotecnología del INTA-Castelar en un secuenciador automático ABI 3500 XL. Para la secuenciación se utilizaron los cebadores T7 y SP6 presentes en el vector pGEMT easy. Los resultados recibidos se verificaron en cuanto a la calidad de las secuencias: se revisó el archivo.phd que contiene los índices de PHRED de cada posición nucleotídica y se evaluaron las bases con indeterminaciones mediante la revisión del electroferograma (archivo ab1). Por último, las lecturas obtenidas con los cebadores T7 y SP6 se ensamblaron mediante la aplicación "ContigExpress" presente en el *Software* de Bioinformática Vector NTI (Thermo Fisher Scientific).

La secuencia de nucleótidos ensamblada de 1.772 nt fue depositada en la base de datos GenBank bajo el número de acceso MH880833.

- **Diseño de cebadores (*primers*)**

Para efectuar los futuros diagnósticos de la presencia del virus estudiado (PVY) en las plantas de *Calibrachoa* mediante RT-PCR se efectuó el diseño de cebadores que hibridan con una región del marco abierto de lectura (tamaño 804 bases) que codifica para la proteína de la cápside del PVY secuenciada en el presente trabajo.

Para ello, se utilizó el *software web* “*Primer3*” disponible en: <http://primer3.sourceforge.net> y se diseñaron los cebadores *forward* 1 (posición 426 de la región que codifica para la cápside) y *reverse* 1 (posición 802 de la región que codifica para la cápside), cuyo detalle se encuentra en la sección Anexo del capítulo I. Los cebadores fueron manufacturados por Invitrogen®.

- **Análisis de sensibilidad de la técnica RT-PCR**

Extracción de ARN

Con el objetivo de contar con un método de mayor sensibilidad que el ELISA para detectar el virus PVY presente en los cultivares de *Calibrachoa* INTA, se realizó un análisis de sensibilidad de detección de PVY, en el cual se llevaron a cabo diferentes agrupaciones de hojas de *Calibrachoa* denominadas *pooles*, que fueron conformadas de la siguiente manera: 1 hoja infectada con PVY y 4 hojas sanas; 1 hoja infectada con PVY y 9 hojas sanas; 1 hoja infectada con PVY y 19 hojas sanas; 1 hoja infectada con PVY y 29 hojas sanas (Distefano, comunicación personal).

Para la extracción de ARN se siguió un protocolo utilizando Trizol (ThermoFisher Science®), y se realizó la molienda de las hojas de cada *pool* en un mortero con N₂ líquido, cuyo producto se colocó en un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL.

Seguidamente, se agregó 1 mL de trizol a cada tubo y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 11000 rpm y a 4°C, en una microcentrifuga Hermle® Z 323 K, durante 10 minutos. Posteriormente, se agregaron 0,2 mL de cloroformo y los tubos fueron agitados manualmente durante 15 segundos e incubados a temperatura ambiente durante 3 minutos. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 rpm y a 4 °C, durante 15 minutos. La fase acuosa fue transferida a un tubo limpio y luego se agregaron 0,5 mL de isopropanol. Posteriormente, fue incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas a 11.000 rpm a 4°C, durante 10 minutos. Luego, se extrajo el sobrenadante, se lavó el pellet con 1 mL de etanol 75 % y se centrifugó a 4 °C a 6.000 rpm, durante 10 minutos. Se realizó un segundo lavado y luego las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente, el ARN fue

re-suspendido en 50 µl de agua libre de RNAsas e incubado en baño termoestático (“baño maría”) a 55 °C durante 10 minutos.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

Síntesis de ADN copia (ADNc)

La concentración de ARN fue determinada con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (*NanoDrop Technologies*) a partir de la absorbancia a 260 nm, puesto que se estima que $A(260\text{nm}) = 1$ equivale a $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de ARN. La pureza e integridad del ARN total fue determinada por la relación 260/280 nm y por la relación 260/230 nm.

Para la síntesis de la cadena de ADNc se utilizó como templado 1 µg de ARN total, el oligo d(T) *primer* M4T (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC (T)₁₅-3'), que hibrida con la cola de poli A y T del del virus, y la transcriptasa reversa *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) (Promega ®), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Detección de PVY por RT-PCR

Para la detección del PVY se amplificó una porción de la región que codifica para la proteína de la cápside del genoma viral (377 kb) mediante PCR. Se utilizaron los cebadores *forward* 1: 5' ATACCCACTCAAGCCAATCG 3' y *reverse* 1: 5' ACATGTTCTTGACCCCAAGC 3'

La mezcla de reacción de la PCR se realizó según la Tabla II.2.

Tabla II.2. Mezcla de reacción de la PCR

Reactivos	Concentración final	Volumen (µl)
H ₂ O MilliQ*		19,48
Buffer 5X	1X	2,5
MgSO ₄ (25 mM)	0,5 mM	0,5
dNTPs (10 mM)	0,2 mM	0,5
Ceb. <i>Forward</i> 1	0,2 µM	0,5
Ceb. <i>Reverse</i> 1	0,2 µM	0,5
GoTaq DNA Polymerase (5 U. µl ⁻¹) (Promega ®)	0,04 U. µl ⁻¹	0,2
ADNc		1

Volumen final		25
---------------	--	----

*Agua libre de ARNasas

Cada muestra para analizar estuvo conformada por 24 μl de la mezcla de reacción más 1 μl del ADNc correspondiente. La reacción de PCR fue llevada a cabo con un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min seguido por 34 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 56 °C y 2 minutos a 68 °C con una extensión final a 68 °C durante 5 minutos mediante un termociclador (*My Cycler*, Bio-Rad ®).

Visualización de los productos de amplificación

Los productos de amplificación fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % con bromuro de etidio (concentración final de 0,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) en *buffer* TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). La corrida electroforética se realizó a voltaje constante (60 V) durante 1:15 h y los productos de amplificación se visualizaron bajo luz UV.

El análisis de las bandas se realizó mediante el *software* Vision Works®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Identificación del *Potyvirus* en estudio

La presencia del género *Potyvirus* fue detectada mediante ELISA en las 19 plantas de *Calibrachoa* que mostraban síntomas compatibles con la enfermedad, lo que significa que habría una correlación entre la aparición de síntomas e infección por *Potyvirus*, con un nivel de incidencia del 100 %. La validez de las pruebas fue confirmada por el alto valor de absorbancia obtenido para el control positivo (1,90) y los bajos niveles alcanzados para los controles negativos (promedio= 0,025; SD= 0,071); y se definió en el histograma de frecuencias de absorbancia a 405 nm un nivel de 0,167 como el valor de corte del ensayo (Figura II.3).

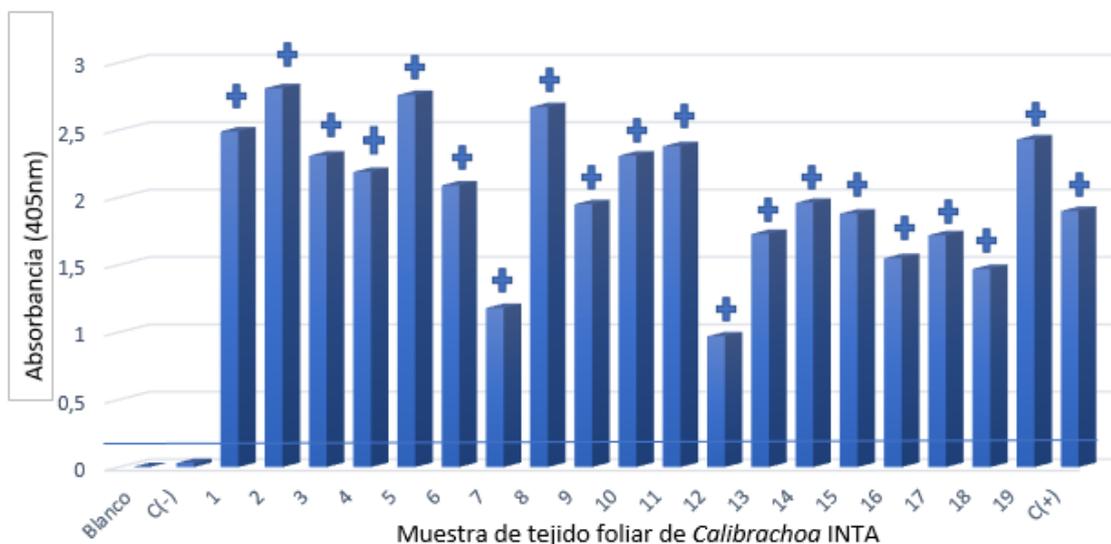


Figura II.3. Resultado de la prueba de ELISA de tipo indirecto para la detección del género *Potyvirus* en tejidos foliares de *Calibrachoa*. Los signos + representan los resultados positivos, mientras que C(-) y C(+) corresponden con los valores de los controles negativos y positivos, respectivamente. La línea horizontal representa el punto de corte de la prueba (absorbancia= 0,167)

Estos resultados coinciden con la observación de los síntomas característicos de la enfermedad que presentaban las plantas al momento de la realización del análisis, tales como moteados foliares y manchado de flores (Figura II.4).

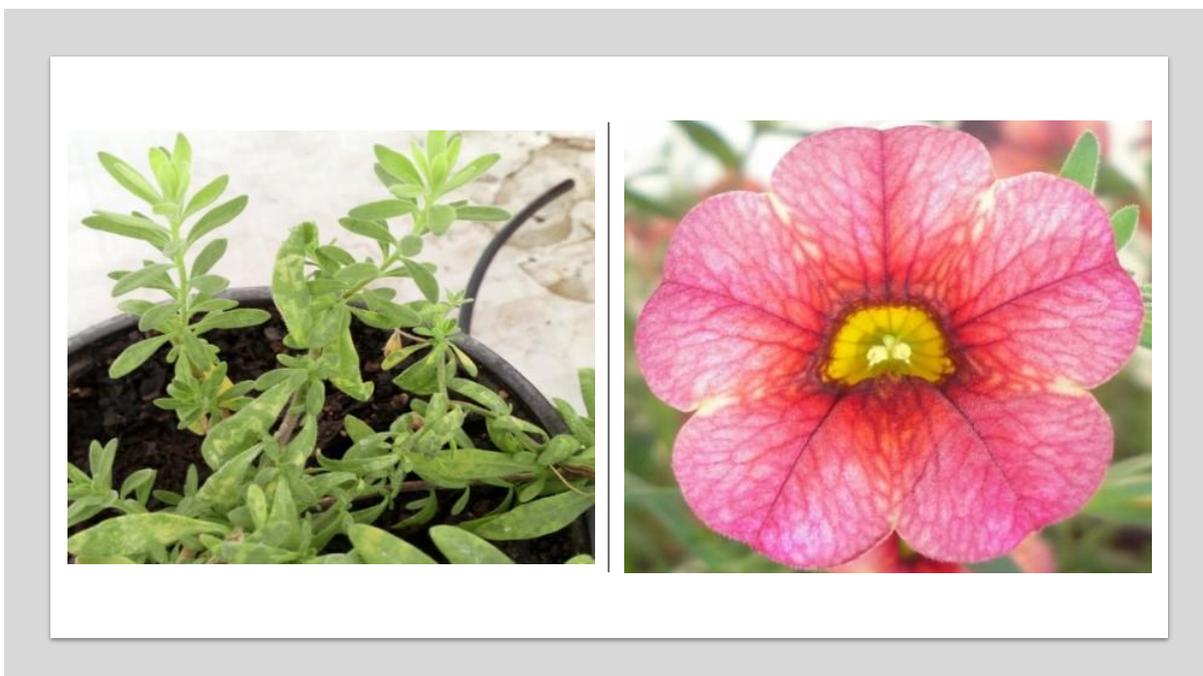


Figura II.4. *Calibrachoa* cv. Pampa salmón INTA con moteados foliares (izquierda) y flor manchada (derecha)

En cuanto a los análisis moleculares, en la Figura II.5 se puede observar la representación de las bandas características de alta calidad de ARN de las últimas dos muestras correspondientes a *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA y *C. cv. Overá Fucsia* INTA (líneas 4 y 5, respectivamente) con lo cual se confirma la extracción de ARN total. Por su parte, las primeras tres muestras mostraron una baja calidad del ARN, por lo que no se logran ver bandas definidas en la imagen (líneas 1 a 3). Esto pudo deberse a que los compuestos fenólicos presentes en las muestras de tejido se oxidaron rápidamente para formar quinonas, las cuales pudieron unirse fácilmente con los ácidos nucleicos y actuar como una barrera para el aislamiento del ARN de óptima calidad (George, 2018).

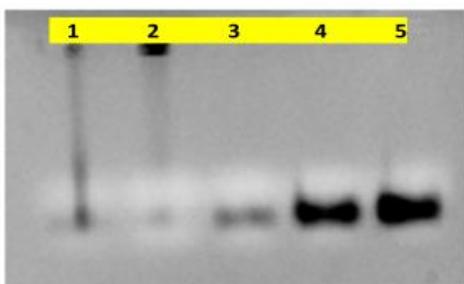


Figura II.5. Electroforesis en gel de agarosa 1% del ARN total extraído de tejido foliar de plantas de *Calibrachoa* INTA. Líneas 1, 2 y 3: muestras de *Calibrachoa* con baja calidad de ARN; línea 4: *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA; línea 5: *C. cv. Overá Fucsia* INTA

A partir del análisis del gel de agarosa se puede observar un fragmento de amplificación de 1,7 Kb (Figura II.6) para *C. cv. Pampa Salmón* INTA (línea 1). Esto indica que las muestras de las variedades evaluadas se encontraron infectadas por *Potyvirus*, tal como lo señaló el diagnóstico realizado mediante la prueba de ELISA. Por su parte, a partir de las muestras de *C. cv. Overá Fucsia* INTA no se logró amplificar el fragmento (línea 3), por lo que se infiere que hubo una falla durante la técnica, ya que resultó positiva para *Potyvirus* mediante ELISA y poseía la misma sintomatología que *C. cv. Pampa Salmón* INTA.

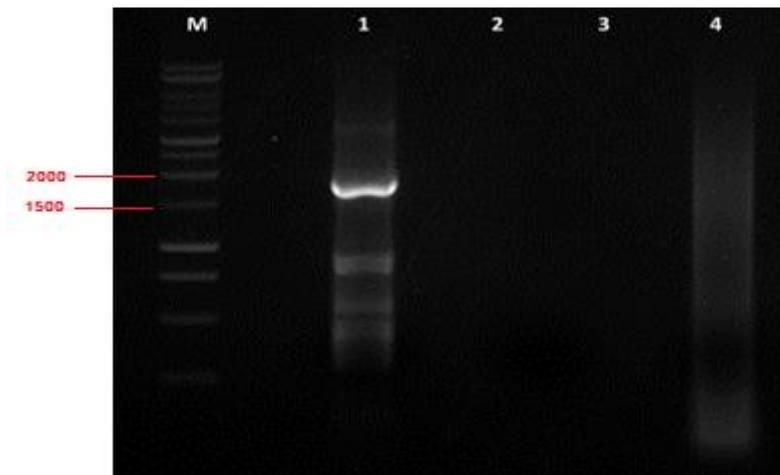


Figura II.6. Perfil de amplificación de ADNc de *Potyvirus*. M: marcador de peso molecular (1000 pb Invitrogen ®); línea 1: *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA infectada; líneas 2: control negativo (reactivos de PCR sin ADNc); línea 3: *Calibrachoa* cv. Overá Fucsia INTA sin amplificar; línea 4: *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA sana

Un análisis BLASTn de la región de 1.772 nt, amplificada a partir de la muestra de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA infectada, con las secuencias de nucleótidos disponibles en la base de datos GenBank mostró una identidad de nucleótidos del 82 al 88 % con diferentes aislamientos de *Potato virus Y* (ver en Anexo la secuencia de nucleótidos completa).

Las identidades de nucleótidos más altas fueron 88% con PVY (KC823271) aislado de *Nicotiana tabacum* en Brasil y 83% con PVY (KC296439) aislado de tabaco en China.

A nivel de aminoácidos, la secuencia de poliproteína parcial de 480 aa mostró 93 % de identidad con el mismo aislado brasileño (AGX27991) y 88 % con el aislado chino (AGH27746). El complejo PVY incluye cinco cepas no recombinantes y 36 patrones recombinantes, que presentan un desafío para la tipificación de razas (Green *et al.*, 2018).

Si bien en esta investigación no se ha abordado el estudio de PVY a nivel de raza, dada la sintomatología presente en las plantas de *Calibrachoa* evaluadas, se puede inferir que la variante PVY⁰ es la que se encontraría presente, ya que las plantas infectadas manifiestan mosaicos generales suaves a severos, rugosidad de hojas, defoliación, enanismo y reducción del crecimiento, del mismo modo que lo describen Schubert *et al.*, (2007) y Singh *et al.*, (2008).

En América del Norte, puntualmente en el Oeste de los Estados Unidos de América, se ha detectado la presencia de las variantes PVY^N, PVY^{NTN} y PVY^{N:O} (Lorenzen *et al.*, 2006). En América del Sur, específicamente en Perú, se ha reportado la variante PVY^{NTN}

en cultivares nativos de papa, donde los síntomas no manifestaron anillos necróticos en los tubérculos (Salazar *et al.*, 2000). Además, esta variante también se ha registrado en Brasil (Galvino Costa *et al.*, 2012), en México (Hernández de la Cruz *et al.*, 2007) y en Colombia (Gil *et al.*, 2011), en campos comerciales de papa, mientras que también se ha detectado en aquel país en plantas de tomate (Muñoz-Baena *et al.*, 2016).

Por su parte, en la Argentina, históricamente no se ha llevado a cabo un estudio sistemático de los aislados de PVY en papa, ni se dispuso de información completa sobre los aislamientos de PVY presentes en el país. Sin embargo, en estudios recientes (Colavita *et al.*, 2017) se han caracterizado 46 aislamientos de PVY de diferentes regiones productoras de papa de la Argentina, donde se encontró la presencia de razas de PVY recombinantes entre PVY^N y PVY^O. Por ello, se podría suponer que posiblemente la raza infectiva de las variedades de *Calibrachoa* INTA podría estar relacionada con la variante PVY^O por encontrarse presente en el país.

Otros estudios realizados han encontrado la presencia de PVY en diferentes cultivares de papa en la provincia de Jujuy (Clausen *et al.*, 2001), sin embargo, tampoco se ha efectuado una tipificación de la especie viral.

Estos hallazgos mencionados sumados a los resultados obtenidos durante esta investigación demuestran que PVY se encuentra presente en diversos cultivos y en varias regiones de la Argentina, lo que supone una adaptación del virus a los distintos ambientes y una amplia distribución a lo largo del territorio argentino.

La aparición de nuevos aislamientos puede deberse a la eliminación de plantas que muestran síntomas de infección por virus durante tareas e inspecciones a campo, por lo que las plantas remanentes posiblemente podrían contener aislamientos que no causan síntomas, lo que da lugar a una nueva recombinación viral.

Los datos sobre la estructura molecular de las razas de PVY proporcionan información sobre la evolución del virus (Schubert *et al.*, 2007). En el caso de *Calibrachoa*, se requeriría profundizar ciertos aspectos que permitan determinar la capacidad de los aislados, lo que permitiría conocer los posibles genes de resistencia de la especie y aumentar la eficiencia de los programas de mejoramiento.

- **Análisis de sensibilidad de la técnica RT-PCR**

El análisis del gel de agarosa (Figura II.7) permitió observar que tanto el *pool* de 1 hoja infectada con PVY y 4 hojas sanas (líneas 2 y 3), como el de 1 hoja infectada y 9 hojas sanas (líneas 4 y 5), el de 1 hoja infectada con PVY y 19 hojas sanas (líneas 6 y 7), y el de 1 hoja infectada con PVY y 29 hojas sanas (líneas 8 y 9) resultaron positivos a la

detección de PVY mediante RT-PCR. Los fragmentos de amplificación obtenidos tuvieron el tamaño aproximado a lo esperado (377 pb).

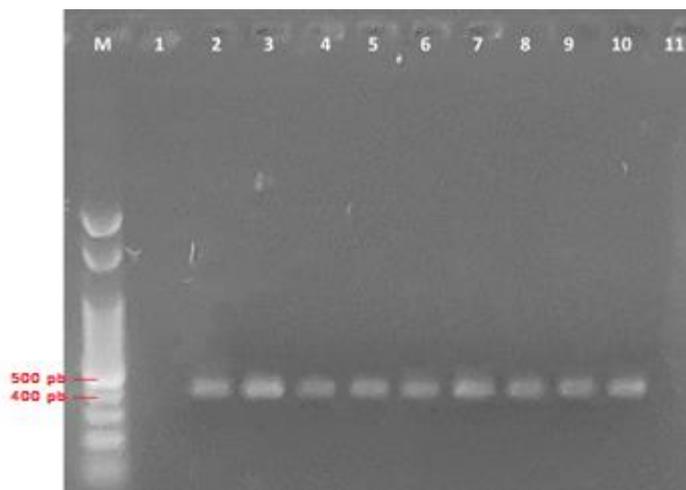


Figura II.7. Perfil de amplificación de ADNc de PVY. M: marcador de peso molecular 100 pb (Ladder PBL-Productos Bio-lógicos ®); línea 1: control negativo de la PCR (reactivos sin ADN); línea 2: *pool* de 1 hoja infectada con PVY y 4 hojas sanas; línea 3: duplicado del *pool* anterior; línea 4: *pool* de 1 hoja infectada con PVY y 9 hojas sanas; línea 5: duplicado del *pool* anterior; línea 6: *pool* de 1 hoja infectada con PVY y 19 hojas sanas; línea 7: duplicado del *pool* anterior; línea 8: *pool* de 1 hoja infectada con PVY y 29 hojas sanas; línea 9: duplicado del *pool* anterior; línea 10: control positivo (planta de *Calibrachoa* cv. Pampa salmón INTA infectada con PVY); línea 11: control negativo de la RT-PCR (reactivos sin ARN)

Los procedimientos de detección deben ser optimizados a modo de lograr precisión a partir de las medidas de sensibilidad y especificidad (Sharma *et al.*, 2009). La sensibilidad mide la proporción de positivos reales que son clasificados como tal (probabilidad de verdaderos positivos) y la especificidad mide la proporción de negativos que están correctamente identificados (probabilidad de verdaderos negativos) (Rubio *et al.*, 2020). En este trabajo se realizó un análisis de sensibilidad que permitió la posterior implementación de estos *pooles* para efectuar el diagnóstico de PVY en las plantas provenientes de los cruzamientos analizados, ya que la técnica resultó sensible frente a todas las disgregaciones evaluadas.

CONCLUSIONES

- Los resultados del presente trabajo permiten demostrar la presencia de *Potato virus Y* como patógeno de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA y *C. cv. Overá Fucsia* INTA, en la Argentina. Para programas de mejoramiento genético de la

especie sería muy importante identificar la o las variantes de PVY existentes con el fin de determinar resistencia e implementar su utilización en ellos.

- La técnica RT-PCR es altamente sensible para la detección de PVY en plantas de *Calibrachoa* a partir de la utilización de *pooles* de hojas de varias plantas, ya sea ante 1 hoja infectada con PVY y 4 hojas sanas; 1 hoja infectada con PVY y 9 hojas sanas; 1 hoja infectada con PVY y 19 hojas sanas; y 1 hoja infectada con PVY y 29 hojas sanas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alderete M, Pannunzio J, Hagiwara JC. (2012). "Presencia de diferentes virosis en plantas ornamentales nativas". *XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas*. (p.92) Potrero de Los Funes, San Luis, Argentina: El Tabaquillo.
- Arous, S.; Harmon, C.L.; Capobianco, H.M.; Polston, J.E. (2018). "Comparison of genus-specific primers in RT-PCR for the broad-spectrum detection of viruses in the genus *Potyvirus* by plant diagnostic laboratories". *Journal of Virology Methods*. 258:29-34.
- Bravo-Almonacid, F.; Rudoy, V.; Welin, B.; Segretin, M.E; Bedogni, M. C; Stolicz F.; Criscuolo, M.; Foti, M.; Gomez, M.; López, M.; Serino, G.; Cabral, S.; Dos Santos, C.; Huarte, M.; Mentaberry, A. (2011). "Field testing, gene flow assessment and pre-commercial studies on transgenic *Solanum tuberosum* spp. tuberosum (cv. Spunta) selected for PVY resistance in Argentina". *Transgenic Research*. 21, 967-982.
- Cafrune, E.; Asinari, F.; Nome, C.; Perotto, M.; Quiroga, M.; Conci, V. (2011). "Identificación y caracterización del *Dasheen mosaic virus* en cala (*Zanthedeschia aethiopica*) en Córdoba, Argentina". *Fitopatología Colombiana*. 35(1): 63-66.
- Chen, J.; Chen, J.; Adams, M.J. (2001). "A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family". *Archives of Virology*. 146:757-766.
- Clausen, A.M.; Colavita, M.; Butzonitch, I.; Carranza, A. (2005). "A potato collecting expedition in the province of Jujuy, Argentina and disease indexing of virus and fungus pathogens in andean cultivars". *Genetic Resources Crop Evolution*. 52:1099-1109
- Colavita, M.L.; Lancia, M.; Feingold, S.E. (2017). "Evidence of recombinant isolates of *Potato Virus Y* (PVY) in Argentina". *American Journal of Potato Research*. 94:275-282.
- Coutts, B.A.; Jones, R.A.C. (2015). "*Potato virus Y*: contact transmission, stability, inactivation and infection sources". *Plant Disease*. 99(3):387-393.
- Damsteegt, V.; Stone, A.; Smith, O.; McDaniel, L.; Sherman, D.; Dardick, C.; Hammond, J.; Jordan, R.; Schneider, W. (2012). "A previously undescribed potyvirus isolated and characterized from arborescent *Brugmansia*". *Archives of virology*. 158:1235-1244.
- Díaz, A.; Quiñones, M.; Arana, F.; Soto, M.; Hernández, A. (2010). "Potyvirus: Características generales, situación de su diagnóstico y determinación de su presencia en el cultivo del Pimiento, en Cuba". *Protección Vegetal*. 25(2).
- Dujovny, G.; Sasaya, T.; Koganesawa, H.; Usugi, T.; Shohara, K.; Lenardón, L. (2000). "Molecular characterization of a new potyvirus infecting sunflower". *Archives of Virology*. 145:2249-2258.
- Fuentes, S.; Roger, A.; Jones, C.; Matsuoka, H.; Ohshima, K.; Kreuze, J.; Gibbs, A. (2019). "*Potato virus Y*; the Andean connection" *Virus Evolution*. 5(2):1-15.
- Galvino-Costa, S.B.F; dos Reis, Figueira, A.; Camargo, V.; Geraldino, P. S.; Karasev, A. V. (2012). "Molecular and serological typing of *Potato virus Y* isolates from brazil reveals a diverse set of recombinant strains". *Plant Disease*. 96:1451-1458.

- Garrido, M. J. (2018). Generalidades sobre Virus de Plantas. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Instituto de Botánica Agrícola, Laboratorio de Virología Vegetal, Maracay, Venezuela.
- George, A. (2018). "Simple and efficient method for functional RNA extraction from tropical medicinal plants rich in secondary metabolites". *Tropical Plant Research*. 5(1):08-13.
- Gil, J.F.; Cotes, J.M.; Marín, M. (2011). "Incidencia de potyvirus y caracterización molecular de PVY en regiones productoras de papa (*Solanum tuberosum* L.) de Colombia". *Revista Colombiana de Biotecnología*. 13(1):85-93.
- González Arias, G.; Loreto Reyes, M. (2013). "Géneros y especies de virus presentes en plantas ornamentales y flores de corte en las provincias de La Habana y Cienfuegos". *Fitosanidad*. 17(2):103-105.
- González P. R.; Huarte, M. (2016). "Efecto del ácido salicílico en la eliminación de PLRV y PVY en plantas de papa". *Revista Latinoamericana de la Papa*. 16(1):58-67.
- Green, K.J.; Brown, C.; Stewart, M.; Karasev, A. (2017). "Phylogenetic study of recombinant strains of potato virus Y". *Virology*. 507:40-52.
- Greppi J. A.; Hagiwara J. C.; Stehmann R., (2013). "Novedades en *Calibrachoa* (*Solanaceae*) y notas taxonómicas sobre el género para la Argentina". *Darwiniana*. 1(1).
- Hernández de La Cruz, M.; Gómez-Leyva, J.F.; López, I.G.; Andrade, I. (2007). "Detección serológica y molecular del virus PVY^N y su variante PVY^{NTN} en papa (*Solanum tuberosum* L.) y hospedantes alternativos en Tapalpa, México". *Revista Mexicana de Fitosanidad*. 25(2):167-172.
- Karasev, A. y S. Gray. (2013). "Continuous and emerging challenges of *Potato virus Y* in potato". *Annual Review of Phytopathology*. 51:571-586.
- Kraus, J.; Cleveland, S.; Putnam, M. (2010). "A new *Potyvirus* sp. Infects verbena exhibiting leaf mottling symptoms". *Plant Disease*. 94(9):1132-1135.
- Lorenzen, J.; Meacham, T.; Berger, P. (2006). "Whole genome characterization of Potato virus Y isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada". *Archives of Virology*. 151:1055-1074.
- Martínez-García, B.; Llave, C.; Atencio, F.A.; Días, J.R.; López, A. (2011). "La transmisión de los potyvirus por pulgones". *Investigación Agrícola: Protección vegetal*. 16(2):150-161.
- Moreno Lozano, A. (2005). Incidencia y dispersión de virus transmitidos por pulgones en hortalizas de invierno y sus relaciones virus-vector. Tesis para optar por el título de Doctor. Universidad Politécnica de Madrid. Departamento de Biotecnología.
- Muñoz-Baena, L.; Gutiérrez, S. P.; Montoya, M. (2016). "Detección y secuenciación del genoma del *Potato virus Y* (PVY) que infecta plantas de tomate en Antioquía, Colombia". *Bioagro*. 28(2):69-68.
- Ortiz Arias, B. (2002). Identificación de tres especies de potyvirus en orquídeas nativas. Requisito parcial para obtener el título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

- Quenouille, J.; Vassilakos, N.; Moury, B. (2013). "Potato virus Y: a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity". *Molecular Plant Pathology*. 14(5):439-452.
- Perera, M.; Filippone, M.; Ramallo, J.; Cuneya, M.; Castagnaro, A. (2009). "Diversidad genética del complejo de virosis asociadas a la enfermedad del mosaico de la caña de azúcar en Tucumán, Argentina". *Revista Industrial y Agrícola*. 86(2):1-6.
- Rodríguez Pardina, P.E.; Bejerman N.; Luque, A.V.; Di Feo, L. (2012). "Complete nucleotide sequence of an Argentinean isolate of sweet potato virus G". *Virus Genes*. 45:593-595.
- Rubio L.; Galipienso, L.; Ferriol, I. (2020). "Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution". *Frontiers in Plant Science*. 11(1092):1-22.
- Salazar, L.; Bartolini, I.; Flores, V. (2000). "Evidence for the existence of PVY^{NTN} in the Andes and the hypothesis towards its origins". *Fitopatología*. 3(2):87-90-
- Schubert, J.; Fomitcheva, V.; Sztangret-Wiśniewska, J. (2007). "Differentiation of Potato virus Y strains using improved sets of diagnostic PCR-primers". *Journal of Virological Methods*. 140(1-2):66-74.
- Sharma, D.; Yadav, U.; Sharma, P. (2009). "The concept of sensitivity and specificity in relation to two types of errors and its application in medical research". *Journal of Reliability and Statistical studies*. 2:53-58.
- Singh, R.; Valkonen, J.; Gray, S.; Boonham, N.; Jones, R.; Kerlan, C.; Schubert, J. (2008). "Brief review: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato". *Archives of Virology*. 153:1-13.
- Sutula, C.L.; Guillet, J.M.; Morrissey, S.M.; Ramsdell, D.C. (1986). "Interpreting ELISA data and establishing positive-negative threshold". *Plant Disease*. 70:722-726.
- Tun Suárez, J.; Mejía, E.; Martínez, D.; García, P.; Hernández, M.S.; Alejo, J.C. (2007). "Incidencia del virus mosaico de la alfalfa en semillas y plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en Yucatán, México". *Fitosanidad*. 11(1):11-14.

Estudio de la transmisión de *Potato virus Y* por semillas de *Calibrachoa*

INTRODUCCIÓN

Alrededor de una séptima parte de los conocidos virus fitopatógenos es transmitida a través de semillas en, al menos, una de sus plantas hospedantes infectadas. Los virus suelen persistir en las semillas por largos períodos de tiempo (Hull, 2002) y, además, suelen transmitirse a las generaciones siguientes por medio de esta vía (Baldodiya *et al.*, 2020).

La transmisión de virus por semillas es un mecanismo que permite su persistencia entre temporadas de cultivos. Una tasa de transmisión de 0,001 puede iniciar una epidemia y generar graves consecuencias económicas (Simmons *et al.*, 2013). Este tipo de transmisión varía del 1 al 100 % de acuerdo con la especie viral y el hospedante (Hull, 2009), factores ambientales y fisiológicos, los cuales son aspectos clave para tener en cuenta para el análisis de las estrategias de manejo de enfermedades (Johansen *et al.*, 1994).

Los granos de polen son los gametofitos de las plantas que tienen reproducción sexual y los tubos polínicos germinan sobre los estigmas antes de la transferencia del polen a los sacos embrionarios que contienen los gametofitos femeninos (Liu *et al.*, 2013). En coincidencia con Isogai *et al.* (2020), Liu *et al.* (2013) clasifican la transmisión viral por polen en plantas infectadas de dos maneras:

- transmisión horizontal: aquella en la cual la infección de los tejidos de la planta madre ocurre durante la polinización;
- transmisión vertical: aquella en la que el virus es transmitido a las semillas por la infección de los embriones desarrollados de plantas polinizadas.

De los aproximadamente 46 virus que se transmiten por semilla, todos lo hacen en forma vertical y 18 de ellos también son transmitidos de manera horizontal (Card *et al.*, 2007).

Se ha visto que la producción y la calidad del polen son afectados a menudo por la presencia del virus (Johansen *et al.*, 1994).

Por otra parte, se ha observado que, en líneas generales, la habilidad de los virus para infectar el polen está relacionada con su capacidad para invadir las regiones meristemáticas (Hull, 2002).

En el caso de los *Potyvirus*, se ha encontrado que la transmisión por semilla puede variar entre un 1 y un 80%, de acuerdo con la especie viral que se trate (Hull, 2002).

El estudio de las interacciones planta-patógeno en lo que respecta a la transmisión de virus es de suma importancia para contribuir con la formulación de medidas preventivas contra estos patógenos (Baldodiya *et al.*, 2020). Dada esta situación y la importancia ecológica para la perpetuación y diseminación de virus que representa la transmisión por semillas, y que no existen reportes sobre este comportamiento en plantas de *Calibrachoa* infectadas con *Potato virus Y* (PVY), el presente estudio se realizó con el propósito de determinar la transmisión viral a semillas de *Calibrachoa hybrida* de acuerdo con la variación de la temperatura ambiente.

HIPÓTESIS

La especie viral *Potato virus Y* patógena de los cultivares de *Calibrachoa* INTA infecta al embrión de las semillas.

OBJETIVOS

Determinar la capacidad de transmisión por semillas de *Potato virus Y* en calibrachoa de acuerdo con la temperatura ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Durante los meses de marzo (otoño), septiembre (primavera) y diciembre (verano) de 2018 se llevaron a cabo cruzamientos entre las variedades de *Calibrachoa* INTA según se detalla en la Tabla III.1, en el Instituto de Floricultura del INTA, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina (Latitud Sur: 34,67; Longitud Oeste: 58,65).

Tabla III.1. Esquema de cruzamientos entre plantas de *Calibrachoa* INTA infectadas con *Potato virus Y* y plantas de *Calibrachoa* INTA sin infectar

Cruzamiento n°	Planta madre	Planta padre
1	Infectada con PVY	Infectada con PVY
2	Infectada con PVY	Sin PVY
3	Sin PVY	Infectada con PVY
4	Sin PVY	Sin PVY

Los cruzamientos dirigidos fueron efectuados en estado de pimpollo. La emasculación fue realizada previa polinización. Los pimpollos fueron abiertos con una pinza, extrayendo las anteras juntamente con la corola. El polen, extraído de flores en anthesis

del progenitor masculino, fue inmediatamente depositado sobre el estigma de los pimpollos. Se realizaron 5 repeticiones por cruzamiento. Las plantas polinizadas se colocaron al azar sobre las mesadas de un invernadero de polietileno sin control de temperatura (Figura III.1) y se registraron las temperaturas diarias hasta la maduración de los frutos (entre 25 y 35 días después de la polinización).



Figura III.1. Plantas de *Calibrachoa* INTA utilizadas para los cruzamientos ubicadas sobre mesadas de invernadero

Desinfección de frutos y siembra

En primer lugar, los frutos maduros fueron enjuagados con alcohol 70 % durante 10 segundos y luego fueron transferidos a una solución de hipoclorito de sodio por 10 minutos. Seguidamente, fueron enjuagados 3 veces con agua destilada estéril bajo flujo laminar.

La siembra se realizó en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) sobre placas de Petri estériles, también bajo condiciones de flujo laminar, en laboratorio (Figura III.2).



Figura III.2. Flujo laminar en laboratorio del Instituto de Floricultura INTA

Almacenamiento de placas y transferencia al invernáculo

Finalizada la siembra, las placas se colocaron a 4 °C y en oscuridad durante una semana para romper la dormición seminal. Luego, se almacenaron en una cámara de cultivo a 25 °C y 16 h de fotoperiodo hasta que las semillas germinaron y alcanzaron una altura superior a 1 cm (Figura III.3). Posteriormente, las plántulas fueron trasplantadas en bandejas de poliestireno negras que contenían sustrato desinfectado compuesto a base de turba de musgo *Sphagnum*, compost de corteza fina, perlita y cenizas (tabaco Growmix®) y se conservaron en un invernáculo de polietileno sin control de temperatura (Figura III.4).



Figura III.3. Semillas y plántulas de calibrachoa en placa de Petri con medio de cultivo MS



Figura III.4. Plántulas de *Calibrachoa hybrida* trasplantadas en bandeja de poliestireno negro

Una vez que alcanzaron tres pares de hojas verdaderas, las plantas fueron trasplantadas en macetas de 9 cm de diámetro que contenían el mismo sustrato que las bandejas de poliestireno y se conservaron en el mismo invernáculo en que se encontraban anteriormente.

Análisis serológico

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (test de ELISA indirecto)

Para evaluar la presencia de *Potyvirus* en las plantas de *Calibrachoa* se siguió la misma metodología descrita en el Capítulo II.

Análisis moleculares

Extracción de ARN

Dado que a partir de los resultados obtenidos en el análisis de sensibilidad de la RT-PCR en el capítulo II se observó que la técnica resulta sensible en todos los *pool*es evaluados, se llevaron a cabo diferentes *pool*es según la cantidad total de plantas obtenidas de los cruzamientos realizados durante el verano, el otoño y la primavera a modo de efectuar el diagnóstico molecular de PVY, utilizando dos hojas por planta individual para cada *pool*.

Para la extracción de ARN se siguió la misma metodología descrita en la sección “Análisis de sensibilidad de la RT-PCR” del Capítulo II.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

Síntesis de ADN copia (ADNc)

La concentración de ARN fue determinada con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (*NanoDrop Technologies*) a partir de la absorbancia a 260 nm, puesto que se estima que $A(260\text{nm}) = 1$ equivale a $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de ARN. La pureza e integridad del ARN total fue determinada por la relación 260/280 nm y por la relación 260/230 nm.

Para la síntesis de la cadena de ADNc se utilizó como templado 1 μg de ARN total, el oligo d(T) *primer* M4T (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC (T)₁₅-3'), que hibrida con la cola de poli A y T del del virus, y la transcriptasa reversa *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) (Promega ®), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Detección de PVY por RT-PCR

Para la detección del PVY se amplificó la región que codifica para la proteína de la cápside del genoma viral (377 kb) mediante PCR. Se utilizaron los cebadores *forward* 1: 5' ATACCCACTCAAGCCAATCG 3' y *reverse* 1: 5' ACATGTTCTTGACCCCAAGC 3'

La mezcla de reacción de la PCR se realizó según la Tabla III.2.

Tabla III.2. Mezcla de reacción de la PCR

Reactivos	Concentración final	Volumen (μl)
H ₂ O MilliQ*		19,48

Buffer 5X	1X	2,5
MgSO ₄ (25 mM)	0,5 mM	0,5
dNTPs (10 mM)	0,2 mM	0,5
Ceb. <i>Forward</i> 1	0,2 μM	0,5
Ceb. <i>Reverse</i> 1	0,2 μM	0,5
GoTaq <i>DNA Polymerase</i> (5 U. μl ⁻¹) (Promega ®)	0,04 U. μl ⁻¹	0,2
ADNc		1
Volumen final		25

*Agua libre de ARNasas

Cada muestra para analizar estuvo conformada por 24 μl de la mezcla de reacción más 1 μl del ADNc correspondiente. La reacción de PCR fue llevada a cabo con un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min seguido por 34 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 56°C y 2 minutos a 68°C con una extensión final a 68°C durante 5 minutos mediante un termociclador (*My Cycler*, Bio-Rad ®).

Visualización de los productos de amplificación

Los productos de amplificación fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio (concentración final de 0,5 μg. mL⁻¹) en *buffer* TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). La corrida electroforética se realizó a voltaje constante (60 V) durante 1:15 h y los productos de amplificación se visualizaron bajo luz UV.

El análisis de las bandas se realizó mediante el *software* Vision Works®.

Cuando se detectaron casos positivos a PVY dentro de los *pooles*, se procedió a realizar el análisis individual de cada planta a modo de optimizar la cuantificación de los resultados.

Análisis estadístico

Se realizó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 4x3. Se llevó a cabo un análisis de la varianza con un nivel de confianza del 95% y se evaluó interacción. Al observar diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó la prueba de diferencia de medias de Duncan ($p \leq 0,05$) mediante el software estadístico Infostat versión 2020 (Di Rienzo *et al.*, 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El resultado de la prueba de ELISA indicó que ninguna de las plantas provenientes de los cruzamientos realizados tanto en verano, como en otoño y primavera, se encontró infectada por el grupo *Potyvirus*, lo cual coincidió con la ausencia de la sintomatología típica de *Potyvirus* en las plantas evaluadas (moteados y manchas foliares, clorosis).

Resultados diferentes a la prueba de ELISA se obtuvieron mediante la prueba RT-PCR, donde a partir del análisis del gel de agarosa se pueden identificar bandas de amplificación de entre 400 y 430 pb, las cuales se encuentran cercanas a los 377 pb del *primer*, tanto para determinadas plantas obtenidas de los cruzamientos realizados durante el verano, como en el otoño y en la primavera. Esto indica que se encontraron plantas infectadas por PVY, como indica la reacción del control positivo. A modo de ejemplo, en la Figura III.5 se muestra el perfil de amplificación del ADNc del PVY de los *pools* de cruzamientos realizados durante el otoño. Para profundizar en mayor grado de detalle, las figuras de los gels de agarosa de los cruzamientos realizados durante el verano y la primavera se encuentran en la sección Capítulo III del Anexo.

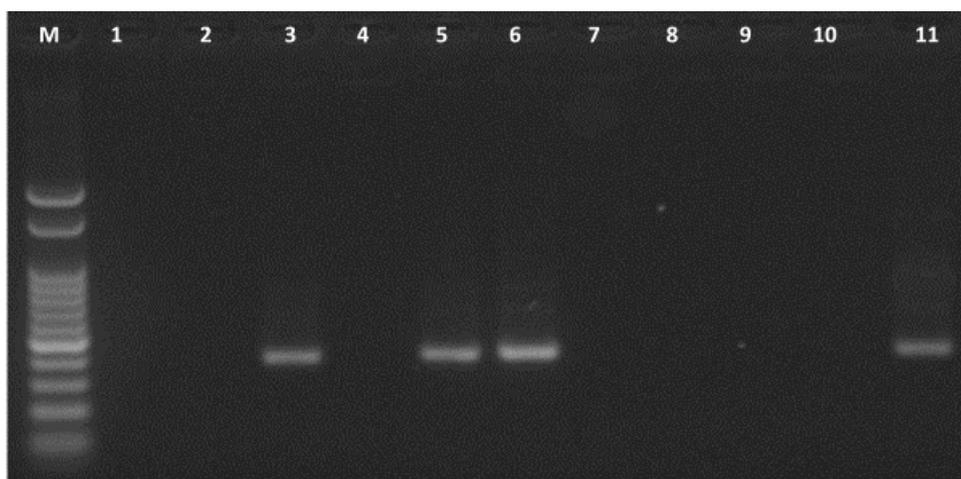


Figura III.5. Perfil de amplificación de ADNc de PVY. M: marcador de peso molecular 100 pb (Ladder PBL-Productos Bio-lógicos®); línea 1: pool de cruzamiento n°1; línea 2: pool de cruzamiento n°3; línea 3: pool de cruzamiento n°2; línea 4: pool de cruzamiento n°4; línea 5: pool de cruzamiento n°3; línea 6: pool de cruzamiento n°3; línea 7: pool de cruzamiento n°4; línea 8: pool de cruzamiento n°4; línea 9: control negativo de la RT-PCR (reactivos sin ARN); línea 10: control negativo de la PCR (reactivos sin ADN); línea 11: control positivo (*Calibrachoa* cv. Pampa salmón INTA infectada con PVY)

Un título de virus bajo puede limitar la sensibilidad y producir falsos negativos cuando la concentración está por debajo del umbral de detección de la técnica (Rubio *et al.*, 2020). Particularmente, las técnicas serológicas tienen restricciones de sensibilidad que

no permiten la detección de virus en tejidos con bajo título (Medina Cárdenas *et al.*, 2015). Un factor importante que afecta la precisión de los métodos de detección serológica es la variabilidad genética dentro de cada especie de virus y las relaciones genéticas con otras especies de virus. Dado que estos métodos se basan en la unión específica (proteína con anticuerpo) algunas variantes de virus diferentes pueden no reaccionar y dar falsos negativos (Rubio *et al.*, 2020). Por ejemplo, la detección universal de *Plum pox virus* (PPV) por ELISA con anticuerpos monoclonales falló para algunos aislados de PPV (Sheveleva *et al.*, 2018). En contraste, los métodos de detección viral basados en ácidos nucleicos como la RT-PCR son altamente sensibles y de rápida ejecución, ya que detectan porciones del genoma viral, independientemente de que se encuentren ensamblados o desnudos, situación que ocurre dado el movimiento sistémico de los virus fitopatógenos (Medina Cárdenas *et al.*, 2015).

Por tanto, se deduce que estos factores pudieron haber sido los motivos por los cuales se encontraron diferencias tan notorias entre los resultados de la detección de PVY por la técnica ELISA y por RT-PCR en esta investigación.

En el Instituto de Floricultura INTA los análisis de diagnóstico de *Potyvirus* en *Calibrachoa* y en otras especies ornamentales se realizan mediante un muestreo con pruebas de ELISA. Esto puede conducir a subestimar los niveles de incidencia viral, más aún cuando estos virus pueden inducir infecciones asintomáticas en las diferentes variedades o bajo distintas condiciones ambientales, por presentarse bajos niveles de título viral difícilmente detectados por estas pruebas con niveles medios de sensibilidad como ELISA (Medina Cárdenas *et al.*, 2015). Por ello, se recomienda que para futuros diagnósticos de PVY en las variedades de *Calibrachoa* del Instituto se utilice la metodología de RT-PCR descrita durante esta investigación.

En cuanto a la detección de *Potato virus Y* en el producto de los cruzamientos los resultados muestran que en la progenie proveniente de plantas sanas no se detecta la virosis, mientras que en la progenie de las plantas con uno o ambos padres con virosis se detecta la presencia del virus.

Si bien los porcentajes son relativamente bajos, esto podría deberse al momento en el que se realizó el análisis, donde quizá la virosis estaba en sus comienzos, y no se encontró título de virus diseminado en toda la planta (Tabla III.3). Estos resultados muestran una diferencia entre plantas sanas e infectadas en el caso de *Calibrachoa*.

Tabla III.3. Incidencia y porcentaje de detección de potato virus Y (PVY) en la progenie de los diferentes cruzamientos en *Calibrachoa* mediante la técnica RT-PCR

Cruzamiento	Plantas analizadas	Plantas infectadas con PVY	Detección PVY (%)
Madre y padre infectados con PVY	30	2	7
Madre infectada con PVY y padre sin PVY	64	9	14
Madre sin PVY y padre infectado con PVY	110	9	8
Madre y padre sin PVY	142	0	0

Los resultados obtenidos, realizado el análisis estadístico, no mostraron un efecto de interacción entre la estación del año y los cruzamientos de acuerdo con las variables estudiadas (número de semillas obtenidas y número de plantas logradas).

El número de semillas de *Calibrachoa* por planta obtenidas en este trabajo durante la primavera, el verano y el otoño no fue significativamente diferente, ya que en todos los casos se registraron valores similares (15, 14 y 17 respectivamente). Sin embargo, al analizar la cantidad de plantas logradas, se observó que durante el verano se obtuvo el mayor número de plantas, y estadísticamente diferentes a la primavera, cuando se alcanzó el menor número de plantas. Las plantas logradas durante el otoño fueron, estadísticamente, intermedias entre primavera y verano (Tabla III.4).

Este es un dato interesante, dado que el número de semillas obtenidas en todas las estaciones fue similar. Se podría suponer que, dado que *Calibrachoa* es originaria de regiones con climas templado- cálidos (Sur de Brasil hasta el Noreste de la Argentina y Uruguay) (Mäder y Freitas, 2019), y las condiciones registradas durante el verano y el otoño del experimento (temperatura mínima media: 17,2 °C; temperatura máxima media: 36,8 °C) habrían emulado las condiciones de origen, lo que probablemente posibilitó lograr una mayor cantidad de plantas.

Tabla III.4. Efecto de las estaciones del año sobre el número de semillas obtenidas y el número de plantas logradas en plantas de *Calibrachoa*

Estación del año	Nº semillas obtenidas por planta	Nº plantas logradas
Verano	14 a	7 a
Otoño	17 a	6 ab
Primavera	15 a	3 b

Los valores de las medias seguidas con la misma letra en la columna no difieren significativamente de acuerdo con la prueba de Duncan ($p < 0,05$)

El número de semillas obtenidas por planta y la cantidad de plantas logradas difirieron en forma significativa de acuerdo con el cruzamiento que dio origen a la semilla. Claramente cuando las plantas, tanto la madre como el padre, no estaban infectadas, dieron la mayor cantidad de semillas y lograron la mayor cantidad de plantas. Similarmente cuando la planta madre no estaba infectada, pero la planta de origen del polen tenía PVY, el número de semillas fue similar a la planta sana, pero la cantidad de plantas logradas tuvo un valor intermedio. Ahora bien, cuando la planta madre estaba infectada, independientemente si la planta dadora de polen estaba infectada o no, tuvo un menor número de semillas y se lograron menos plantas (Tabla III.5).

Tabla III.5. Semillas obtenidas y plantas logradas promedio en diferentes cruzamientos entre plantas padre y madre con y sin infección de PVY en *Calibrachoa*

Cruzamiento	N° semillas obtenidas promedio	N° plantas logradas promedio
Madre y padre infectados con PVY	9 a	2 a
Madre infectada con PVY y padre sin PVY	10 a	4 a
Madre sin PVY y padre infectado con PVY	21 b	6 ab
Madre y padre sin PVY	19 b	9 b

Los valores medios en la columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente de acuerdo con la prueba de Duncan ($p < 0,05$)

Es también interesante observar que tanto el número de semillas obtenidas y el número de plantas logradas estarían influidas por la infección parental. Para el caso de las plantas madre, si están infectadas, el número de semillas es menor, así como las plantas logradas, lo que muestra un fuerte efecto de la situación sanitaria en el tejido materno. No ocurre lo mismo con la provisión de polen por parte de plantas infectadas, dado que el efecto en el número de semillas no muestra efecto significativo, y en cuanto al número de plantas logradas es de un valor intermedio.

La bibliografía general para las virosis indica que, para infectar el embrión, el virus tiene que llegar a los meristemas florales o al embrión mismo (Hull, 2002). Los mecanismos por los cuales los virus producen la infección no estarían bien dilucidados. El virus se mueve a través de la testa de la semilla inmadura después de la fertilización y debe alcanzar la región micropilar de la semilla para que ocurra la infección del embrión. El micrópilo está en estrecho contacto con la base del suspensor embrionario, que funciona como un conducto para el flujo de nutrientes para apoyar el crecimiento del embrión y, además, es la ruta por la cual el virus invade al embrión. Sin embargo, no existe una

conexión simplástica entre el tejido materno y el embrionario (Hull, 2002), y aún no está claramente establecida la forma en la que el virus pasa de las células de la testa materna al suspensor embrionario.

En estudios realizados en otras especies y en otros *Potyvirus*, diversos autores han llegado a diferentes conclusiones. Simmons *et al.* (2013) indicaron que la infección de *Zucchini yellow mosaic virus (Potyvirus)* en plantas de *Cucurbita pepo* ssp. Texana afecta la tasa de germinación de las semillas, pero que la población viral puede verse limitada por el hospedante, ya que los mecanismos de defensa de las semillas podrían impedir la transmisión de los virus a los persistentes órganos de las plántulas. Otras investigaciones han demostrado que a partir de cruzamientos realizados entre plantas de *Arabidopsis* sanas y plantas de *Arabidopsis* infectadas con *Turnip yellow mosaic virus*, el virus puede invadir la semilla desde el tejido materno o el tejido paterno, pero esta invasión desde el tejido materno fue la única ruta de infección para el caso de *Tobacco mosaic virus* (de Assis and Sherwood, 2000).

La proporción de las semillas infectadas provenientes de plantas virósicas varía ampliamente con las diferentes especies virales y con los distintos hospedantes. Por ejemplo, *Alfalfa mosaic virus* se transmite en un 10 % por semillas de *Melilotus indica*, un 2 % en *Stachys arvensis* y un 0,1 % en *Ornithopus compressus* (Hull, 2002). Por su parte, Otulak *et al.* (2017) encontraron partículas de *Potato virus Y^{NTN}* (PVY^{NTN}) dentro de granos de polen y en los tubos polínicos de *Capsicum annuum*, por lo que concluyeron que el gametofito masculino podría ser una fuente de infección por PVY.

La habilidad de los virus para infectar el polen también está relacionada con la capacidad de invadir las regiones meristemáticas que poseen (Hull, 2002). La penetración de los tubos polínicos de los granos de polen con altos títulos de virus simula la infección por virus del estigma, lo que plantea la posibilidad de que se aumente la liberación de los virus de los granos de polen en germinación y facilite el establecimiento de focos de infección en el estigma, lo que lleva a una infección sistémica, tal como se analizó para *Raspberry bushy dwarf virus* en plantas de *Nicotiana benthamiana* (Isogai *et al.*, 2020). A su vez, Otulak *et al.* (2017) demostraron que PVY^{NTN} se podría detectar dentro de las semillas de *Capsicum annuum* en las superficies de los embriones y en los tejidos ováricos, por lo cual concluyeron que este virus se transmite a través de semillas. Por el contrario, y a diferencia de lo que sucedió durante esta investigación, Coutts y Jones (2015) vieron que la transmisión de PVY⁰ por semillas no era posible en plantas de *Solanum nigrum*.

Los resultados obtenidos en este estudio indicarían que, para el caso de *Calibrachoa* y bajo las condiciones en que se desarrolló, habría una incidencia importante del tejido

materno en la transmisión del virus. Si bien en otros trabajos se señala que los meristemas no estarían afectados por el virus, en otro capítulo de esta tesis, se encontró que cuando se cultivan los meristemas para reproducción de la especie no se logró la eliminación total del virus, situación que también podría estar ocurriendo en los meristemas florales. Por otro lado, no hay información en esta especie sobre la infección de los granos de polen y su viabilidad, que podría ser uno de los factores que incidirían para que, en el caso de la progenie derivada de padres infectados, la cantidad de plantas logradas infectadas sea menor.

Estos aspectos generan interrogantes que sería importante dilucidar, tales como determinar la capacidad del virus para infectar los meristemas florales, y los granos de polen. Y a su vez la viabilidad tanto de los embriones como de las semillas infectadas por el virus.

CONCLUSIONES

- El *Potato virus Y* se transmite por semillas en plantas de *Calibrachoa* tanto en el caso de uno como de ambos padres infectados, independientemente de las condiciones de temperatura ambiente y época del año.
- Existe una incidencia importante del tejido materno sobre la cantidad de semillas producidas y la cantidad de plantas logradas.
- La época del año parece tener un efecto en la germinación y producción de plantas.
- La RT-PCR es sensiblemente superior a la técnica ELISA en la detección de *Potato virus Y* en plantas de *Calibrachoa*, ya que los bajos niveles de títulos virales no logran ser detectados mediante la técnica ELISA, a diferencia de la RT-PCR que logra la detección del virus aún en concentraciones virales diluidas, por lo que se recomienda la implementación de la RT-PCR para el diagnóstico de PVY en todos los programas de mejoramiento de *Calibrachoa* a modo de no subestimar los niveles de incidencia viral mediante la prueba de ELISA.

BIBLIOGRAFÍA

- Baldodiya, G.M.; Baruah, G.; Sen, P.; Nath, P.D.; Borah, B.K. (2020). Host-Parasite Interaction During Development of Major Seed-Transmitted Viral Diseases. En: Kumar R., Gupta A. (eds) *Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management*. Editorial: Springer. Singapore.
- Coutts, B.A.; Jones, R.A.C. (2015). "Potato virus Y: contact transmission, stability, inactivation and infection sources". *Plant Disease*. 99(3):387-393.
- De Assis, F.M.; Sherwood, J.L. (2000). Evaluation of Seed Transmission of *Turnip yellow mosaic virus* and *Tobacco mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology*. 90(11):1233-1238.
- Di Rienzo, J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, y M. Tablada. (2020). Grupo Infostat. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Hull, R. (2002). *Matthews' Plant Virology*. Editorial: Academic Press. Norwich, Reino Unido. 4^{ta} edición.
- Hull, R. (2009). *Comparative plant virology*. Editorial: Academic Press. Norwich, Reino Unido. 2^{da} edición.
- Isogai, M.; Matsudaira, T.; Miyoshi, K.; Shimura, T.; Torii, S.; Yoshikawa, N. (2020). "The raspberry bushy dwarf virus 1b gene enables pollen grains to function efficiently in horizontal pollen transmission". *Virology*. 542:28-33.
- Liu, H.W.; Luo, L.X.; Li, J.Q.; Liu, P.F.; Chen, X.Y.; Hao, J.J. (2013). "Pollen and seed transmission of *Cucumber green mottle mosaic virus* in cucumber". *Plant Pathology*. 63(1):72-77.
- Johansen, E.; Edwards, M.; Hampton, R. (1994). "Seed transmission of viruses: current perspectives". *Annual Review of Phytopathology*. 32:363-383.
- Mäder, G.; Freitas, L.B. (2019). "Biogeographical, ecological and phylogenetic analyses clarifying the evolutionary history of *Calibrachoa* in South American grasslands". *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 141:1-10.
- Medina Cárdenas, H.C.; Gutiérrez, S.P.A.; Marín, M.M. (2015). "Detección del *Potato virus Y* (PVY) en tubérculos de papa mediante TAS-ELISA y qRT-PCR en Antioquía (Colombia)". *Bioagro*. 27(2):83-92.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.
- Otulak, K.; Koziel, K.; Lockhart, B.E.L.; Garbaczewska, G. (2017). "Ultrastructural effects of PVY^{NTN} infection of *Capsicum annuum* L. cv. Yolo Wonder generative organs; a first step in describing seed transmission". *Phytopathologia Mediterranea*. 56(3):379-391.
- Rubio L.; Galipienso, L.; Ferriol, I. (2020). "Detection of plant viruses and disease management: relevance of genetic diversity and evolution". *Frontiers in Plant Science*. 11(1092):1-22.
- Sheveleva, A.; Ivanov, P.; Gasanova, T.; Osipov, G.; Chirkov, S. (2018). "Sequence analysis of Plum pox virus strain C isolates from Russia revealed prevalence of the D96E mutation in the universal epitope and interstrain recombination events". *Viruses*. 10(9):450.

- Simmons, H.E.; Dunham J.P.; Zinn, K.E.; Munkvol, G.P.; Holmes, E.C.; Stephenson, A. G. (2013). "Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, Potyvirus): vertical transmisión, seed infection and cryptic infections. *Virus Research*. 176(1-2):259-264.
- Sutula, C.L.; Guillet, J.M.; Morrissey, S.M.; Ramsdell, D.C. (1986). "Interpreting ELISA data and establishing positive-negative threshold". *Plant Disease*. 70:722-726.
- Tun Suárez, J.; Mejía, E.; Martínez, D.; García, P.; Hernández, M.S.; Alejo, J.C. (2007). "Incidencia del virus mosaico de la alfalfa en semillas y plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en Yucatán, México". *Fitosanidad*. 11(1):11-14.

Búsqueda de fuentes de resistencia a *Potato virus Y* en plantas silvestres de *Calibrachoa* de la Argentina

INTRODUCCIÓN

Los virus vegetales son considerados una amenaza para la agricultura mundial, ya que alteran el estado fisiológico y la calidad de las plantas (Khan *et al.*, 2018) de modo tal que se ubican en segundo lugar luego de los hongos como agentes causales de enfermedades y, por consiguiente, de pérdidas de rendimiento de los cultivos (Kumar *et al.*, 2017). Por ejemplo, las pérdidas de rendimiento estimadas debido a *Potato virus Y* (PVY) oscilan entre el 40 y el 60 % en el cultivo de papa (Hameed *et al.*, 2019).

En la actualidad, no existen fitosanitarios que permitan la protección de las plantas de las enfermedades virales. Por ello, los agricultores realizan prácticas de manejo integrado tales como el uso de plantas trampa, la eliminación de plantas infectadas y la rotación de cultivos, las cuales no garantizan que las plantas no se infecten en el campo (Kumar *et al.*, 2017). Hasta el momento, el desarrollo de cultivares resistentes es la opción más económica, segura y efectiva para contrarrestar las infecciones virales (Hameed *et al.*, 2019). Además, impiden su diseminación hacia otros cultivos de la zona que también puedan ser sus hospedantes (Oliveira *et al.*, 2017).

En 1956, Flor desarrolló la denominada “hipótesis de interacción gen por gen”, la cual propone que para cada gen del hospedero que confiere resistencia hay un gen correspondiente que confiere patogenicidad en el patógeno. A los genes de resistencia se los denomina R y a sus contrapartes en el patógeno, genes de avirulencia (Avr). Los genes R y los genes Avr interactúan uno a uno. Cuando un gen R identifica un gen Avr en el patógeno, activa un proceso de muerte celular en la célula infectada, llamado respuesta hipersensible. La muerte de la célula infectada por el patógeno detiene por completo el proceso de infección y colonización, y otorga así resistencia a la planta (Burbano-Figueroa, 2020).

Las plantas responden a un patógeno intruso por sus defensas constitutivas o por inducción de resistencia del huésped. El primer tipo de defensas incluye la cutícula o superficies cerosas, paredes celulares, compuestos antimicrobianos e inhibidores enzimáticos que bloquean la entrada de los patógenos. El segundo tipo es la capacidad de las células vegetales para activar y aumentar su nivel de resistencia a la infección después de haber sido estimuladas por el agente patógeno (Galvez *et al.*, 2014). Sin

embargo, la disponibilidad de variedades y cultivares resistentes es el mayor desafío que tienen los cultivos (Kumar *et al.*, 2017).

Un cultivar deseable se caracteriza por tener resistencia contra 2 o más tipos de especies patógenas o contra la mayoría de las razas del mismo patógeno, lo cual se denomina resistencia de amplio espectro. A su vez, la resistencia debe ser efectiva durante toda la etapa productiva del cultivo en un entorno donde la enfermedad también esté presente, lo que se conoce como resistencia duradera (Galvez *et al.*, 2014).

La reproducción convencional se ha utilizado ampliamente para desarrollar resistencia viral en cultivos mediante la introducción de genes R de especies silvestres emparentadas (Hameed *et al.*, 2019). La familia Solanaceae ha sido uno de los ejes de investigación de mayor importancia para el control de enfermedades mediante mapas genéticos de resistencia. Específicamente, los estudios se han focalizado en los géneros que abordan la mayor cantidad de especies, tales como *Solanum*, *Lycopersicon* y *Capsicum* (Celebi-Toprak *et al.*, 2002). Particularmente, el mecanismo de resistencia a PVY ha sido objeto de evaluación a nivel mundial. Los genes R que controlan el PVY han sido identificados en especies silvestres de papa y han sido utilizados para los cruzamientos genéticos durante varios años. Se ha visto que aquellas plantas de papa portadoras de genes de resistencia desarrollaron una respuesta necrótica luego de la inoculación, que puede extenderse al resto de la planta y, en casos avanzados, resultar en la muerte. Una respuesta necrótica limitada puede conducir a una resistencia al virus, mientras que una respuesta sistémica llevaría a la pérdida total del cultivo (Celebi-Toprak *et al.*, 2008).

Si bien existen avances importantes en el hallazgo de fuentes de resistencia a PVY, tales como en el caso de especies silvestres de tomate *Solanum habrochaites* (Ruffel *et al.*, 2005), *S. pimpinellifolium* (Nogai, 1993) y *S. peruvianum* (Palazzo *et al.*, 2008) o a PVY y a *Pepper yellow mosaic virus*, como encontraron en *S. habrochaites* (Oliveira *et al.*, 2017), hasta el momento no se han encontrado reportes de fuentes de resistencia a PVY en especies silvestres de *Calibrachoa* y de *Petunia* en la Argentina, las cuales se encuentran actualmente en trabajos de domesticación y de mejoramiento comercial en el Instituto de Floricultura del INTA. Por ello, en este apartado se trató de realizar la búsqueda de fuentes de resistencia a PVY en germoplasma de *Calibrachoa* y de *Petunia* nativo, proveniente de recolecciones de material de distintas temporadas y de diferentes sitios geográficos de este país, con la finalidad de que sirvan como aporte fundamental para las futuras etapas del proceso de mejoramiento genético del Instituto de Floricultura.

HIPÓTESIS

Existen fuentes de resistencia a *Potato virus Y* en especies silvestres de *Calibrachoa* y *Petunia* nativas de la Argentina.

OBJETIVO

Determinar la resistencia a *Potato virus Y* en la colección de especies silvestres de *Calibrachoa* y de *Petunia* del banco de germoplasma del Instituto de Floricultura del INTA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron 44 semillas de *Calibrachoa caesia*, 20 de *C. thymifolia*, 17 de *C. linoides*, 15 de *Petunia inflata* y 23 de *P. integrifolia* provenientes del banco de germoplasma del Instituto de Floricultura ubicado en el INTA Hurlingham, Buenos Aires, Argentina (Latitud Sur: 34,67; Longitud Oeste: 58,65), siendo el total del material disponible. Para romper la dormición, las semillas fueron mantenidas a 4 °C durante una semana. Luego, fueron sembradas en bandejas de germinación de 128 celdas que contenían sustrato compuesto a base de turba de musgo *Sphagnum*, compost de corteza fina, perlita y cenizas (Tabaco Growmix Terrafertil®), y dos semanas después fueron transferidas a macetas individuales de 9 cm de diámetro y colocadas en jaulas metálicas (0,90 x 1,40 m) cubiertas con malla anti-áfidos, en un invernáculo de polietileno sin control de temperatura.

Aislamiento viral

Diez hojas de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA que resultaron positivas mediante la técnica ELISA para *Potyvirus* fueron molidas con un mortero mantenido en frío más buffer fosfato (1.47 mM KH_2PO_4 , 8.1 mM Na_2HPO_4 -anhidro en 1 L de H_2O , pH 7.4) (Figura IV.1) según la metodología realizada por Dujovny *et al.* (1998). El extracto resultante fue filtrado con una gasa estéril y utilizado para inocular plantas de la especie indicadora *Quenopodium quinoa* (quínoa), las cuales fueron mantenidas en jaulas metálicas (0,90 x 1,40 m) cubiertas con malla anti-áfidos en invernadero de polietileno bajo iluminación natural a 22 °C (Figura IV.2). Posteriormente, se inocularon plantas sanas de las variedades de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA y *C.* cv. Overá Fucsia INTA con el extracto proveniente de la molienda de las hojas de las plantas indicadoras, a modo de iniciar y mantener a estas plantas de *Calibrachoa* como fuentes de inóculo de PVY.



Figura IV.1. Extracto proveniente de la molienda de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA infectada con PVY, mantenido en frío



Figura IV.2. Plantas de *Quenopodium quinoa* mantenidas en jaula metálica de 0,90 x 1,40 m cubierta con malla anti-áfidos

Inoculación mecánica

Tres hojas de plantas jóvenes (aquellas conformadas por 4 a 6 hojas verdaderas) de *C. caesia*, *C. thymifolia*, *C. linoides*, *P. inflata* y *P. integrifolia* fueron inoculadas con el extracto proveniente de la molienda de las hojas de las variedades de *Calibrachoa* INTA utilizadas como fuente de inóculo, de acuerdo con la metodología propuesta por Dujovny *et al.* (1998) descrita en la sección “aislamiento viral” (Figura IV.3). Dos plantas de cada genotipo y dos plantas de *Nicotiana tabacum* fueron inoculadas con buffer fosfato como

controles negativos; dos plantas de *N. tabacum* y dos plantas de *Calibrachoa* cv. Overá Fucsia INTA fueron utilizadas como controles positivos para la inoculación. Finalizada la inoculación, las plantas fueron mantenidas en observación dentro de las jaulas metálicas mencionadas ubicadas en invernadero de polietileno.



Figura IV.3. Planta de *C. thymifolia* inoculada mediante un hisopo con el extracto proveniente de la molienda de *Calibrachoa* INTA infectada con PVY

Análisis serológico

En primer lugar, las plantas fueron evaluadas visualmente a modo de observar síntomas característicos y luego de 4 semanas fueron evaluadas mediante la prueba de ELISA de tipo indirecto, de acuerdo con la metodología explicada por Clark y Adams (1977). Se recolectaron entre 3 y 5 hojas por genotipo y se utilizaron antiseros comerciales para el grupo *Potyvirus* (BIOREBA ®). El anticuerpo fue conjugado con la enzima fosfatasa alcalina y la lectura de absorbancia fue realizada mediante un lector ELISA multiskan Bio-Rad ® a 405 nm. La reacción fue considerada positiva cuando la lectura fue mayor al valor promedio de los controles negativos más dos veces la desviación estándar (Sutula *et al.*, 1986; Tun Suárez *et al.*, 2007).

Análisis moleculares

Extracción de ARN

En primer lugar, vale aclarar que para la detección de PVY por RT-PCR, se realizaron agrupaciones de plantas (*pools*) según lo indicado en el Capítulo II de esta investigación. Por tanto, sabiendo que la detección de PVY es confiable teniendo 1 hoja

infectada en 19 hojas sanas, para el presente capítulo se han realizado *pooles* de 20 hojas por tubo de extracción de ARN.

Para la extracción de ARN se siguió la misma metodología descrita en la sección “Análisis de sensibilidad de la técnica RT-PCR” del Capítulo II.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

Síntesis de ADN copia (ADNc)

La concentración de ARN fue determinada con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (*NanoDrop Technologies*) a partir de la absorbancia a 260 nm, puesto que se estima que $A(260\text{nm}) = 1$ equivale a $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de ARN. La pureza e integridad del ARN total fue determinada por la relación 260/280 nm y por la relación 260/230 nm.

Para la síntesis de la cadena de ADNc se utilizó como templado $1 \mu\text{g}$ de ARN total, el oligo d(T) *primer* M4T (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC (T)₁₅-3'), que hibrida con la cola de poli A y T del del virus, y la transcriptasa reversa *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) (Promega ®), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Detección de PVY por RT-PCR

Para la detección del PVY se amplificó la región que codifica para la proteína de la cápside del genoma viral (377 kb) mediante PCR. Se utilizaron los cebadores *forward* 1: 5' ATACCCACTCAAGCCAATCG 3' y *reverse* 1: 5' ACATGTTCTTGACCCCAAGC 3'

La mezcla de reacción de la PCR se realizó según la Tabla IV.1.

Tabla IV.1. Mezcla de reacción de la PCR

Reactivos	Concentración final	Volumen (μl)
H ₂ O MilliQ*		19,48
Buffer 5X	1X	2,5
MgSO ₄ (25 mM)	0,5 mM	0,5
dNTPs (10 mM)	0,2 mM	0,5
Ceb. <i>Forward</i> 1	0,2 μM	0,5
Ceb. <i>Reverse</i> 1	0,2 μM	0,5
GoTaq DNA Polymerase (5 U. μl^{-1}) (Promega ®)	0,04 U. μl^{-1}	0,2
ADNc		1

Volumen final		25
---------------	--	----

*Agua libre de ARNasas

Cada muestra para analizar estuvo conformada por 24 μl de la mezcla de reacción más 1 μl del ADNc correspondiente. La reacción de PCR fue llevada a cabo con un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min seguido por 34 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 56 °C y 2 minutos a 68 °C con una extensión final a 68 °C durante 5 minutos mediante un termociclador (*My Cycler*, Bio-Rad ®).

Visualización de los productos de amplificación

Los productos de amplificación fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio (concentración final de 0,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) en *buffer* TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). La corrida electroforética se realizó a voltaje constante (60 V) durante 1:15 h y los productos de amplificación se visualizaron bajo luz UV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A los 15 días de la inoculación mecánica, las plantas de quínoa comenzaron a manifestar los primeros síntomas de la enfermedad: pequeñas manchas cloróticas circulares en las hojas cercanas a la inoculación (Figuras IV.4 y IV.5).



Figura IV.4. Primeros síntomas de PVY en plantas de quínoa a los 15 días de la inoculación



Figura IV.5. Manchas cloróticas en hoja de quínoa a los 15 días de la inoculación

A los 25 días luego de la inoculación, las 25 plantas demostraron síntomas más pronunciados que se extendieron a la totalidad de las hojas (Figura IV.6).



Figura IV.6. Planta de quínoa con síntomas de PVY altamente pronunciados, a los 25 días de la inoculación

Estos efectos coincidieron con los resultados obtenidos a partir del análisis serológico por ELISA, donde todas las plantas arrojaron valores de absorbancia superiores al valor de corte 0,0186 (Tabla IV.2), lo cual indicó que se encontraban infectadas por *Potyvirus*.

Tabla IV.2. Concentración relativa de *Potyvirus* en hojas de *Quenopodium quinoa* y *Calibrachoa* INTA (densidad óptica 405 nm)

Especie/variedad	Densidad óptica (405 nm)	Detección
<i>Quenopodium quinoa</i>	1,604 ⁽¹⁾	Positiva ⁽²⁾
<i>Calibrachoa</i> "Pampa Salmón INTA"	1,433 ⁽¹⁾	Positiva ⁽²⁾
<i>Calibrachoa</i> "Overá Fucsia INTA"	1,220 ⁽¹⁾	Positiva ⁽²⁾

(1) Absorbancia promedio (405 nm) de las muestras infectadas

(2) Muestra positiva basada en la media de los valores de las lecturas de las muestras negativas (densidad óptica 0,013) más dos veces la desviación estándar (0,0028) = 0,0186

Las plantas de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA y *C. cv. Overá Fucsia* INTA inoculadas con el extracto proveniente de las quínoas infectadas por PVY demostraron los primeros síntomas de moteados y enrulados foliares a los 20 días desde la inoculación, los cuales se extendieron a la totalidad de la planta posteriormente (Figuras IV.7 y IV.8). Esta sintomatología concordó con los resultados alcanzados por la prueba de ELISA (Tabla IV.2), que indicaron valores positivos para la infección por *Potyvirus* al ser las concentraciones relativas de *Q. quinoa* (1,604), de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA (1,433) y de *C. cv. Overá Fucsia* INTA (1,220) superiores al límite de detección (0,0186).



Figura IV.7. Hoja de *Calibrachoa* cv. Overá Fucsia INTA con moteados



Figura IV.8. Planta de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA con moteados foliares

Tanto en *C. caesia* como en *C. thymifolia* y *C. linoides* los primeros síntomas de la enfermedad comenzaron a verse a los 14 días de la inoculación mecánica. A los 20 días las plantas mostraron entre un 40 y un 60 % del follaje con síntomas característicos de la infección por PVY, tales como mosaicos y enrulamiento de hojas. A los 30 días la sintomatología se dio en la totalidad del follaje (Figuras IV.9, IV.10 y IV.11), lo cual indicó una infección total de las plantas. Estas observaciones fueron similares a las de Selvarajan y Balasubramanian (2014), quienes comentaron que la aparición de síntomas de *Bunchy top virus* en banana aparecieron a los 25 días después de la

inoculación. Resultados un tanto diferentes fueron obtenidos por Spoustová *et al.*, (2015), quienes vieron que los primeros síntomas de la infección por la variante PVY^{NTN}, tales como clorosis en nervaduras, se dieron a los seis días luego de la inoculación de hojas jóvenes de *Nicotiana tabacum* (tabaco). Sin embargo, la mayor proporción de síntomas (clorosis, distorsión de hojas, inhibición del crecimiento y aceleración de la senescencia) fueron observados después de las dos semanas desde la inoculación. Este resultado difiere un tanto del obtenido en la presente investigación, ya que los síntomas predominantes (mosaicos) en el control de tabaco utilizado se dieron luego de los 20 días (Figura IV.12), y los síntomas severos presentados en las especies nativas analizadas se dieron a los 30 días desde la inoculación.

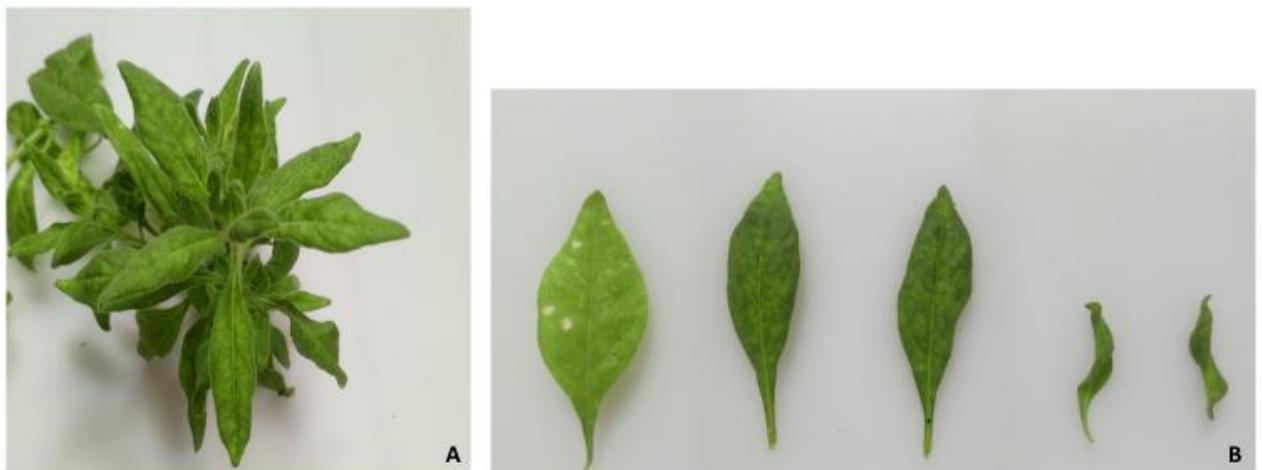


Figura IV.9. Planta de *C. caesia* con moteados y enrulamientos foliares (A); hojas de *C. caesia* con moteados y enrulamientos (B)



Figura IV.10. Hojas de *C. thymifolia* con moteados cloróticos



Figura IV.11. Hojas de *C. linooides* con moteados cloróticos



Figura IV.12. Planta de *N. tabacum* con mosaicos foliares

De manera similar a *Calibrachoa*, en el caso de *Petunia*, la sintomatología comenzó a notarse a los 20 días luego de la inoculación, momento en el que aparecieron moteados foliares y enrulamiento de hojas (Figura IV.13). A los 30 días también se pudieron observar cambios en la coloración y manchas en las flores (Figura IV.14).



Figura IV.13. Hojas de *P. integrifolia* con moteados (A); planta de *P. integrifolia* con moteados y enrulamientos foliares



Figura IV.14. Flor de *P. integrifolia* con manchas y moteado

La variación de los síntomas a lo largo del tiempo pudo deberse a que la cantidad relativa del virus en las plantas infectadas aumenta con el paso de los días debido a la replicación viral, y alcanza su máximo luego de los 15 días desde de la inoculación (Spoustová *et al.*, 2015).

Por un lado, otros autores han encontrado que la expresión de la sintomatología se encuentra cercanamente relacionada con un desbalance de hormonas (ácido giberélico, isopentiladenina y ácido abscísico) en plantas infectadas y con el movimiento del patógeno dentro de la planta. A su vez, sostienen que los síntomas de mosaicos podrían ser indicadores de la pérdida de pequeñas cantidades de clorofila (Selvarajan y

Balasubramanian, 2014). Por otra parte, se ha visto que las citoquininas, además de participar en la promoción de la división celular, se encuentran involucradas en la interacción entre los virus y las plantas, en la sintomatología y en el desarrollo de la enfermedad, ya que la infección resulta en el declive de las formas activas de estas hormonas y aumenta las formas fisiológicamente inactivas (Spoustová *et al.*, 2015), lo cual pudo haber sido una de las posibles causas de la manifestación de los síntomas en el presente estudio.

Las plantas de *Calibrachoa* y de *Petunia* nativas de la Argentina estudiadas en esta investigación fueron positivas para la infección por el grupo *Potyvirus*, según lo confirmaron los resultados del análisis serológico por ELISA (Tabla IV.3), por haber presentado valores de absorbancia superiores al límite de detección (0,077). Estos valores fueron 3,487; 3,201; 2,445; 1,678 y 1,876 para *C. caesia*, *C. thymifolia*, *C. linoides*, *P. inflata* y *P. integrifolia*, respectivamente.

Tabla IV.3. Concentración relativa de *Potyvirus* en hojas de *Calibrachoa* y *Petunia* nativas de la Argentina (densidad óptica 405 nm)

Especie	Densidad óptica (405 nm)	Detección
<i>C. caesia</i>	3,487 ⁽¹⁾	Positiva ⁽²⁾
<i>C. thymifolia</i>	3,201 ⁽¹⁾	Positiva ⁽²⁾
<i>C. linoides</i>	2,445 ⁽¹⁾	Positiva ⁽²⁾
<i>P. inflata</i>	1,678 ⁽¹⁾	Positiva ⁽²⁾
<i>P. integrifolia</i>	1,876 ⁽¹⁾	Positiva ⁽²⁾

1) Absorbancia promedio (405 nm) de las muestras infectadas

(2) Muestra positiva basada en la media de los valores de las lecturas de las muestras negativas (densidad óptica 0,069) más dos veces la desviación estándar (0,004) = 0,077

Resultados complementarios se obtuvieron mediante la prueba RT-PCR, donde a partir del análisis del gel de agarosa se pueden identificar bandas de amplificación de entre 400 y 430 pb, lo cual se encuentra cercano a los 377 pb del *primer* (Figura IV.15) tanto para *C. caesia* (líneas 1 a 5), como para *C. thymifolia* (líneas 6 y 7), *C. linoides* (líneas 8 y 9), *P. inflata* (líneas 10 y 11) y *P. integrifolia* (líneas 12 a 14). Esto indica que las muestras de las especies evaluadas se encontraron infectadas por potato virus Y, tal como lo señala el control positivo de la reacción (línea 17), lo cual corrobora los resultados de la prueba de ELISA.

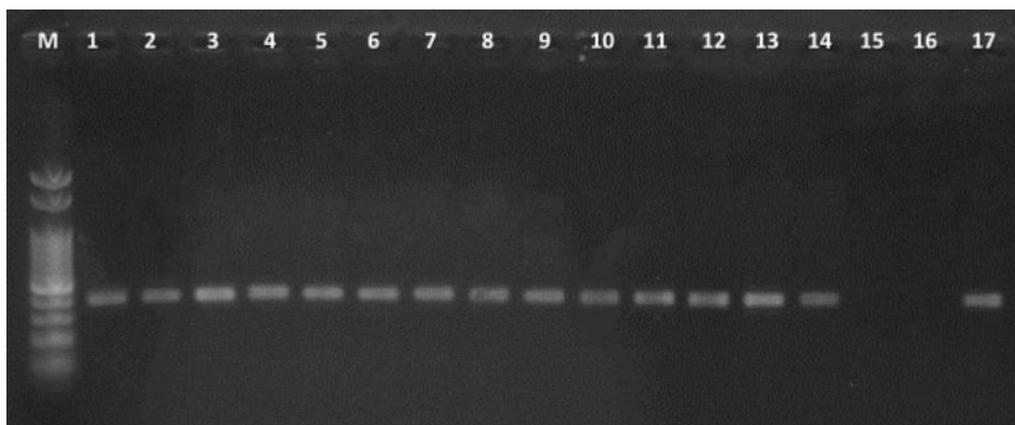


Figura IV.15. Perfil de amplificación de ADNc de PVY proveniente de las plantas de *Calibrachoa* y *Petunia* nativas inoculadas. M: marcador de peso molecular 100 pb (Ladder PBL-Productos Bio-lógicos®); líneas 1 a 5: *C. caesia*; líneas 6 y 7: *C. thymifolia*; líneas 8 y 9: *C. linoides*; líneas 10 y 11: *P. inflata*; líneas 12 a 14: *P. integrifolia*; línea 15: control negativo de la RT-PCR; línea 16: control negativo de la PCR; línea 17: control positivo de PVY (*Calibrachoa* cv. Pampa salmón INTA infectada)

En la Tabla IV.4 se detalla el número de plantas de *C. caesia*, *C. thymifolia*, *C. linoides*, *P. inflata* y *P. integrifolia* infectadas y resistentes a la infección por PVY, según la accesión de la cual provenían. De acuerdo con los valores observados, de los 44 genotipos de *C. caesia* analizados, ninguno de ellos presentó algún tipo de tolerancia o de resistencia a la enfermedad por PVY. Lo mismo sucedió en el caso de *C. thymifolia* y *C. linoides*, donde ninguno de los 20 y 17 ejemplares estudiados, respectivamente, logró demostrar resistencia a PVY por haberse infectado en su totalidad. Por su parte, las 15 accesiones de *P. inflata* y las 23 de *P. integrifolia* se consideraron como susceptibles a la enfermedad viral, ya que todas resultaron infectadas, por lo que se descarta, entonces, la posible resistencia.

Tabla IV.4. Accesiones de especies nativas de *Calibrachoa* y *Petunia* testeadas contra PVY y sus respuestas de susceptibilidad y resistencia

Especie	Identificación de la accesión	Número total de plantas inoculadas	Número de plantas susceptibles	Número de plantas tolerantes	Número de plantas resistentes
<i>C. caesia</i>	20181024 A1 ⁽¹⁾	20	20	0	0
	20181024 B1 ⁽¹⁾	24	24	0	0
<i>C. thymifolia</i>	20191121E1 ⁽²⁾	8	8	0	0
	20191121D1#1 ⁽³⁾	6	6	0	0
	20191121D1#4 ⁽⁴⁾	6	6	0	0

<i>C. linoides</i>	19_338#1 ⁽⁵⁾	17	17	0	0
<i>P. inflata</i>	20181026 A4 ⁽⁶⁾	7	7	0	0
	20191119 F6 ⁽⁶⁾	8	8	0	0
<i>P. integrifolia</i>	20191118 A1 ⁽⁷⁾	10	10	0	0
	20191119 C3 ⁽⁸⁾	5	5	0	0
	20191122 B2 ⁽³⁾	8	8	0	0

(1) San Ignacio, Misiones, Argentina (27° 15' 32"; 55° 32' 21")

(2) Chavarría, Corrientes, Argentina (28° 35' 58"; 58° 0,8 '56")

(3) Concordia, Entre Ríos, Argentina (31° 24' 0,9"; 58° 0,6' 4,6")

(4) La Concepción, Corrientes, Argentina (28° 35' 31"; 58° 0,8' 37")

(5) San Pedro, Misiones, Argentina (26° 37' 18"; 54° 6' 35")

(6) Reserva Natural Urutaú, Misiones, Argentina

(7) Concordia, Entre Ríos, Argentina (31° 21' 33,9"; 58° 4' 4,79")

(8) San Martín, Corrientes, Argentina (29° 6' 57"; 56° 54' 33")

Estudios efectuados en otras especies mostraron efectos similares, como sucedió en el caso de Oliveira *et al.*, (2017), que encontraron accesiones de *Solanum peruvianum* susceptibles a *Pepper yellow mosaic virus* (*Potyvirus*). Por su lado, Filho *et al.* (2010) tampoco encontraron resistencia al *Potyvirus Zucchini yellow mosaic virus* en ninguno de los 38 genotipos de *Citrullus lanatus* (sandía) estudiados en Brasil. Por su parte, Spoustová *et al.*, (2015) hallaron cultivares de tabaco altamente susceptibles a la variante NTN de PVY. Resultados semejantes obtuvieron Rodríguez *et al.*, (2015) quienes ante la búsqueda de resistencia a los potyvirus *Sugarcane mosaic virus* y *Maize dwarf mosaic virus* encontraron híbridos nacionales de *Zea mays* susceptibles, en Venezuela.

Varios estudios han indicado la presencia de proteínas virales específicas cuya función supresora permite superar la maquinaria del silenciamiento génico post transcripcional que poseen las plantas como defensa frente a la infección viral y como reguladora de la expresión normal de sus genes (Voinnet *et al.*, 2003). La proteína HC-Pro de los *Potyvirus* ha sido identificada como supresora que interviene en la regulación del silenciamiento génico, específicamente en la producción de micro ARN (Kasschau *et al.*, 2003). Por lo tanto, se sostiene que la ausencia de resistencia encontrada durante esta investigación pudo haber sido producto de estos mecanismos de supresión del

sistema de defensa de las plantas, lo cual originó que todos los ejemplares evaluados fueran susceptibles a la enfermedad estudiada.

Por otro lado, se ha visto que la existencia de genes de resistencia Ry_{sto} y Ry_{adg} en especies silvestres de *Solanum*, tales como *S. stoloniferum* y *S. tuberosum* ssp. andigena, respectivamente, lograron evitar la acumulación de PVY en los órganos de las plantas portadoras de estos genes. Lo mismo sucedió en plantas de *Capsicum* sp. portadoras del gen *Pvr4* (Lalic *et al.*, 2010). Tanto los genes *Ry* como el gen *Pvr4* han mostrado un largo espectro de acción: los genes *Ry* son eficientes contra todos los aislamientos de PVY, mientras que el *Pvr4* lo es contra todos los aislamientos de PVY más cinco especies adicionales de potyvirus (Quenouille *et al.*, 2013).

Por otra parte, también se ha visto que varios factores de la planta han sido asociados a la replicación del virus a través de su interacción con las proteínas virales, por tanto, además de ser necesaria la presencia del ARN viral y de sus proteínas, para que ocurra la infección por *Potyvirus* es necesaria la existencia de ciertos genes en las plantas, tales como el factor de iniciación de la traducción eIF4E, que interacciona con la proteína VPg del virus; el factor el factor de traducción de unión a poli-A 2 (PABP2), la proteína de choque térmico 70 (Hsc/HSP70-3) y el factor de elongación de traducción eEF1A, los cuales interaccionan con la ARN polimerasa viral N1b (Gallo Gallardo, 2017).

Dado que no existen estudios sobre el mapa genético de las plantas de *Calibrachoa* y *Petunia* estudiadas, se puede inferir que la susceptibilidad de estas especies a PVY pudo haber sido consecuencia de la presencia de estos genes susceptibles o bien pudo haber sido producto de la ausencia de los genes de resistencia mencionados anteriormente.

Estudios recientes han logrado demostrar que la resistencia genética a patógenos utilizada está mayormente basada en una resistencia dominante de genes simple, que mediante el reconocimiento de invasores es a menudo quebrada rápidamente. La perturbación de los genes de susceptibilidad (S) ofrece una alternativa a la provisión de plantas con resistencia recesiva que se propone como de mayor durabilidad. Los genes S permiten el establecimiento de la enfermedad y su inactivación ofrece oportunidades de resistencia en los cruzamientos. Por lo tanto, su perturbación mediante ingeniería genética podría tornar a estas plantas resistentes a los patógenos involucrados (García-Ruiz *et al.*, 2021), por lo que los hallazgos alcanzados en el presente estudio podrían ser la puerta de entrada de futuras investigaciones en el Instituto de Floricultura.

CONCLUSIONES

- La detección de la infección en 44 genotipos de *C. caesia*, en 20 de *C. thymifolia*, 17 de *C. linoides*, 15 de *P. inflata* y 23 de *P. integrifolia* muestra la susceptibilidad y la consecuente ausencia de resistencia en estas plantas a *Potato virus Y*.
- La inoculación mecánica es una forma efectiva para la búsqueda de resistencia y susceptibilidad a *Potato virus Y* en germoplasma de *Calibrachoa* y *Petunia* nativo de la Argentina.
- El Instituto de Floricultura del INTA actualmente no posee materiales de *Calibrachoa* y de *Petunia* resistentes a *Potato virus Y*, los cuales pueden actuar como reservorios de inóculo y fuentes de infección para otros genotipos susceptibles cuando se encuentren plantados en el campo, por lo que no podrían ser incluidos en los programas de mejoramiento genético del instituto hasta que se encuentre alguna fuente de resistencia efectiva o bien hasta que se traten de inactivar los genes de susceptibilidad que intervienen en el desarrollo de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Burbano-Figueroa, O. (2020). "Resistencia de plantas a patógenos: una revisión sobre los conceptos de resistencia vertical y horizontal". *Revista Argentina de Microbiología*. 52(3):245-255.
- Celebi Toprak, F.; Slack, F.; Jahn, M. (2002). "A new gene, *Nybr*, for hypersensitivity to potato virus Y from *Solanum tuberosum* maps to chromosome IV". *Theoretical and Applied Genetics*. 104:669-674.
- Celebi Toprak, F.; Barutcu, E.; Frary, A.; Doganlar, S. (2009). "Identification of potato Y potyvirus (PVY°) resistance in wild and cultivated tomatoes". *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 33:11-17.
- Filho, C.R.; Carvalho, K.; Lima, J.; Queiroz, M.; Paiva, W.; Nascimento, A.K. (2010). "Fontes de resistência em melancia e meloeiro a vírus do gênero Potyvirus". *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. 5(2):187-191.
- Gallo Gallardo, A. (2017). "Conexiones entre la replicación del RNA, su empaquetamiento y la proteína HC en la infección de un potyvirus". Trabajo final para optar por el título de Doctor. Departamento de Biología molecular. Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Galvez, L.; Banerjee, J.; Pinar, H.; Mitra, A. (2014). "Engineered plant virus resistance". *Plant Science*. 228:11-25.
- García-Ruiz, H.; Szurek, B.; Van den Ackerveken, G. (2021). "Stop helping pathogens: engineering plant susceptibility genes for durable resistance". *Current Opinion in Biotechnology*. 70:187-195.
- Hameed, A.; Zaidi, S.S.A.; Sattar, M.; Muhammad, Z.; Tahir, N. (2019). "CRISPR technology to combat plant RNA viruses: a theoretical model for potato virus Y (PVY) resistance". *Microbial Pathogenesis*. 133:1-10.
- Kasschau, K.D.; Xie, Z.X.; Allen, E.; Llave, C.; Chapman, E.J.; Krizan, K.A.; Carrington, J.C. "P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function". *Developmental Cell*. 4(2):205-217.
- Khan, Z.; Amin, I.; Hameed, A.; Mansoor, S. (2018). "CRISPR-Cas13a: prospects for plant virus resistance". *Cell*. 36(12):1207-1210.
- Kumar, J.; Singh, S.; Kianian, S.F. (2017). Capítulo 4: Engineering resistance to plant viruses: present status and prospects". En: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Editores: Dubey, S. K.; Pandey, A.; Sangwan R. Editorial: Elsevier. Estados Unidos de América. Pp 75-100.
- Lalic, J.; Agudelo-Romero, P.; Carrasco, P.; Elena, S. (2010) Adaptation of tobacco etch potyvirus to a susceptible ecotype of *Arabidopsis thaliana* capacitates it for systemic infection of resistant ecotypes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 365(1548):1997-2008.
- Nagai, H. (1993). "Pimentão, pimenta-doce e pimentas". *Furlani, MMC & Végas, GP O melhoramento de plantas no Instituto Agrônômico*, 1:276-294.

- Oliveira, M.; Dianese, E.; Lima, F.; Resende, R.; Boiteux, L. (2017). "Sources of resistance to *Potato virus Y* and *Pepper yellow mosaic virus* in *Solanum* (section *Lycopersicon*) germoplasm. *European Journal Plant Pathology*. 150:691-699.
- Palazzo, S. R. L.; Colariccio, A.; Melo, A. M. T. (2008). "Reação de acessos de *Lycopersicon* spp. a um isolado de *Potato Virus Y* (PVY^o) de tomateiro". *Bragantia*. 67:391-399.
- Quenouille, J.; Vassilakos, N.; Moury, B. (2013). "*Potato virus Y*: a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity". *Molecular Plant Pathology*. 14(5):439-452.
- Rodríguez, O. R.; Garrido, M.J.; Figueroa, R.; Borges, O.; Brito, M. (2015). "Reacción de cultivares comerciales de maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación mecánica con tres potyvirus". *Bioagro*. 27(2):65-74.
- Ruffel, S.; Gallois, J. L. ; Lesage, M. L. ; Caranta, C. (2005). "The potyvirus recessive resistance gene pot-1 is the tomato orthologue of the pepper pvr2-eIF4E gene". *Molecular Genetics and Genomics*. 274:346-353.
- Selvarajan, R.; Balasubramanian, V. (2014). Capítulo 3-Host-virus interactions in banana-infecting viruses. En: *Plant virus-host interaction. Molecular approaches and viral evolution*. Editores: R.K. Gaur, T. Hohn, P. Sharma. Editorial: Academic Press, Reino Unido. Pp 57-78.
- Spoustová, P.; H'ysková, V.; Müllera, K.; Schnablová, R.; Ce Rovská, N.; Malbecka, J.; Cvijrová, M.; Synková, H. (2015). "Tobacco susceptibility to potato virus Y NTN infection is affected by grafting and endogenous cytokinin content". *Plant Science*. 235:25-36.
- Sutula, C.L.; Guillet, J.M.; Morrissey, S.M.; Ramsdell, D.C. (1986). "Interpreting ELISA data and establishing positive-negative threshold". *Plant Disease*. 70:722-726.
- Tun Suárez, J.; Mejía, E.; Martínez, D.; García, P.; Hernández, M.S.; Alejo, J.C. (2007). "Incidencia del virus mosaico de la alfalfa en semillas y plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en Yucatán, México". *Fitosanidad*. 11(1):11-14.
- Voinnet, O.; Rivas, S.; Mestre, P.; Baulcombe, D.C. (2003). "An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus". *Plant Journal*. 33:949-956.

Puesta a punto del cultivo de meristemas de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA y su posterior implementación para el saneamiento de *Potato virus Y*

INTRODUCCIÓN

La principal fuente de abastecimiento de *Calibrachoa* al mercado es la propagación agámica (Liu *et al.*, 2008). Este método puede contribuir con la transmisión de enfermedades sistémicas, tales como los virus, que afectan la calidad y el rendimiento del cultivo (Whitfield *et al.*, 2015), además de transmitirse a las siguientes generaciones de plantas. A su vez, la naturaleza perenne de *Calibrachoa* podría agravar la situación ya que, al permanecer los inóculos del virus por mayor tiempo en el cultivo, la plantación tiene mayor vulnerabilidad a la propagación de esta enfermedad mediante la acción de insectos vectores (Retheesh y Bhat, 2010).

Morel y Martin (1952) informaron por primera vez la aplicación exitosa de la técnica de cultivo de meristemas para producir plantas de dalia libres de virus a partir de un stock vegetal infectado. Esta metodología consiste en aislar el domo meristemático junto con 1 o 2 primordios foliares y sembrarlos en un medio de cultivo adecuado que posibilite el desarrollo de una planta completa (Conci, 2004). A su vez, sostiene la idea de que en las infecciones virales la cantidad del virus dentro de la planta es variable y la mayoría de estos patógenos no alcanzan a afectar el tejido meristemático (Retheesh y Bhat, 2010) (Figura V.1). Las razones para que ello ocurra no están completamente esclarecidas, pero se mencionan como posibles las siguientes:

- sistema vascular poco diferenciado: los meristemas no tienen tejido vascular formado, por lo tanto, se dificulta el avance de los virus ya que estos se movilizan por xilema y floema;
- elevada actividad metabólica: en la región meristemática se encuentra una activa división celular que le dificulta a los virus invadir las células;
- elevadas concentraciones de auxinas: las altas concentraciones endógenas de auxinas presentes en los ápices meristemáticos pueden inhibir la multiplicación de los virus en su interior (Conci, 2004).

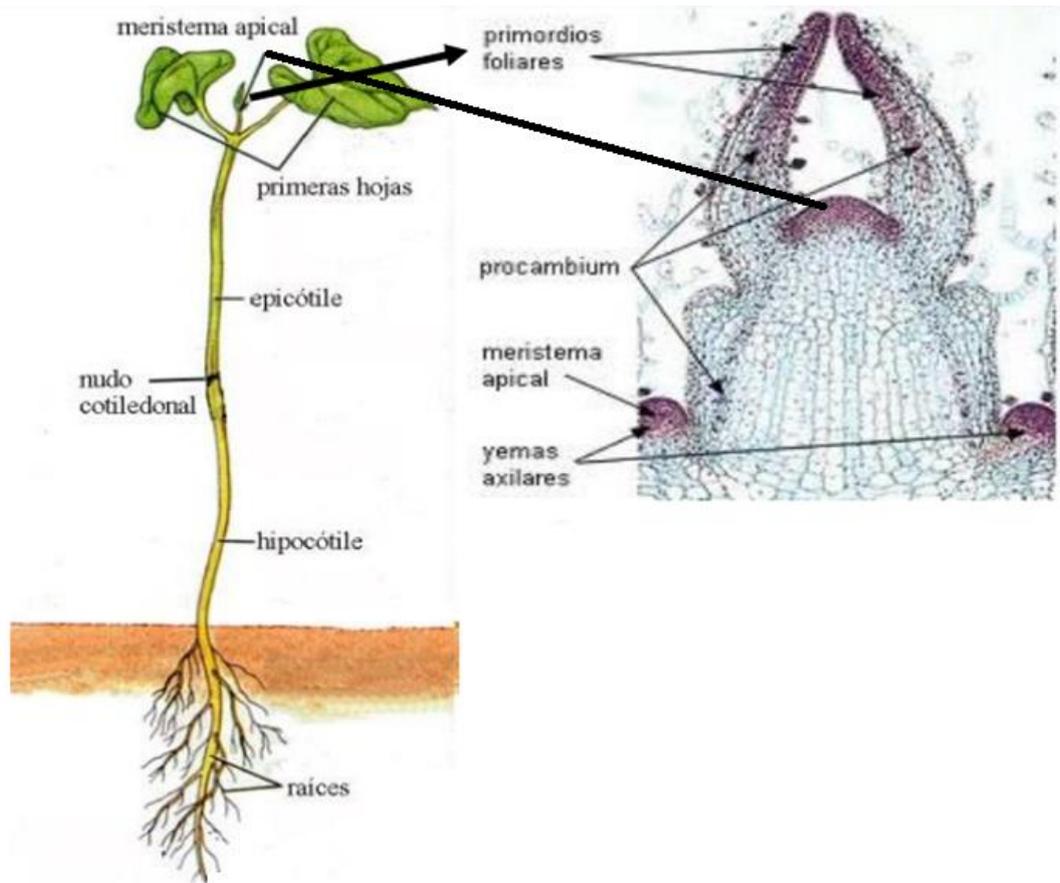


Figura V.1. Esquema de planta y de la disposición del meristema apical junto con los primordios foliares y las yemas axilares

(https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/63946/mod_resource/content/1/MITOSIS%2CMERISTEMAS%2C%20EPIDERMIS.pdf)

Durante las últimas décadas, las técnicas de cultivo in vitro abrieron paso en diferentes aspectos a los estudios de plantas y demostraron su eficacia para la multiplicación rápida y a gran escala de especies vegetales (Sahraroo *et al.*, 2019) y la conservación de germoplasma (Conci, 2004). Puntualmente, el cultivo de meristemas se ha utilizado con éxito para la producción de plantas libres de virus a partir de plantas infectadas, en una amplia diversidad de cultivos (Sasi y Bath, 2018). Sin embargo, las características del medio de cultivo son determinantes para obtener una micropropagación exitosa (Aros *et al.*, 2017). Un medio adecuado para el crecimiento de los meristemas debe estar compuesto, básicamente, por agua, agar, nutrientes minerales, vitaminas, sacarosa y reguladores de crecimiento bajo un determinado pH (Pierik, 1989). En particular, el agregado de auxinas y citoquininas posibilita el rápido desarrollo de las plantas in vitro (Aros *et al.*, 2017).

Las auxinas intervienen en la elongación celular y la expansión de los tejidos, la división celular, la formación de raíces y la inhibición de vástagos axilares. Ácido indolacético

(AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) son ejemplos de auxinas comúnmente utilizadas para el cultivo in vitro de explantos vegetales (Jordán y Casaretto, 2006). Por su parte, las citoquininas promueven la formación de vástagos axilares, disminuyen la dominancia apical, retardan el envejecimiento y estimulan la división celular. Entre ellas, se destacan la kinetina (KIN), la 6-bencilaminopurina (BAP) y la zeatina (Cervantes Flores, 2014).

En investigaciones anteriores, Kato *et al.* (2005) lograron regenerar plantas de *Calibrachoa calycina*, *C. linearis* y *C. pigmaea* a partir de la adición de KIN a un medio base. Por su parte, Dill (2004) obtuvo la mayor regeneración de plantas de *C. sellowiana* mediante el agregado de ANA y BAP al medio base. Por otro lado, Sasi y Bhat (2018) pudieron desarrollar un método eficiente de cultivo de tejidos y la consecuente eliminación del *Piper yellow mottle virus* en plantas de pimienta (Solanaceae), mientras que Aguirre y Martínez López (2001) lograron obtener plantas de papa (Solanaceae) libres de *Potato virus Y*, *Potato virus X* y *Potato leaf roll virus* a partir del cultivo in vitro. Sin embargo, hasta el momento no hay reportes sobre la regeneración de plantas de *Calibrachoa* a partir de meristemas ni de la eliminación de *Potato virus Y* (PVY) mediante esta técnica, en este cultivo.

HIPÓTESIS

La especie de *Potyvirus Potato virus Y* no infecta el domo meristemático ni los dos primordios foliares adyacentes de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA, por lo que el virus se puede eliminar mediante el cultivo de meristemas.

OBJETIVOS

- Optimizar un protocolo de cultivo in vitro para la regeneración de plántulas de *C. Cv. Pampa Salmón INTA* a partir de meristemas.
- Determinar que se elimina el *Potato virus Y* de las plantas de *C. cv. Pampa Salmón INTA* infectadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Objetivo: optimización del protocolo de cultivo de meristemas

Material vegetal

Se utilizaron plantas de entre 8 y 13 cm de altura de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA conservadas en condiciones in vitro en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) a 25 °C de temperatura y bajo un fotoperíodo de 16 horas diarias.

Preparación de explantes

Meristemas apicales de 0,2-0,5 mm de longitud fueron extraídos mediante bisturíes y agujas de disección estériles con la ayuda de una lupa binocular (Nikon ® modelo SMZ-10, Tokio, Japón) en una cámara de flujo laminar (Figura V.2). Se emplearon tubos de ensayo de 24,0 x 115 mm que fueron completados con 10 mL de medio de cultivo y se introdujo un meristema por cada tubo.



Figura V.2. Extracción de meristemas bajo flujo laminar

Tratamientos analizados

Los meristemas fueron introducidos en diferentes medios de cultivo, tomando como base el trabajo de Kato *et al.* (2005), los cuales estuvieron conformados por un medio base más un regulador de crecimiento, de la siguiente manera: MS con el 50% de la concentración de los macroelementos (MS $\frac{1}{2}$)-testigo-; MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ kinetina (KIN); MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ ácido naftalenacético (ANA); MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ 6-bencilaminopurina (BAP); MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ ácido indolbutírico (IBA); MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ ANA + 0,20 mg L⁻¹ BAP. Cada uno de los medios de cultivo fue ajustado a pH 5,6 y pasado por autoclave a 121 °C durante 17 minutos.

Establecimiento de explantes

Los tubos de ensayo que contenían los meristemas se llevaron a una cámara de cultivo durante 40 días bajo un fotoperiodo de 16 h a una intensidad de 1000 lux y una temperatura constante de 25 °C para promover la diferenciación de tejidos (Figura V.3).



Figura V.3. Cámara de cultivo del Instituto de Floricultura INTA

Variables analizadas

Finalizado el período de crecimiento en la cámara de cultivo se registraron las siguientes variables:

- Regeneración de planta completa (%): N° de explantes que lograron dar origen a una planta con más de una hoja verdadera, raíces y ausencia de callo/total de explantes.
- N° hojas/explante: cantidad de hojas obtenidas por cada explante.
- Longitud aérea: largo de la porción aérea del explanto, medido en cm.
- Longitud radical: largo de la mayor raíz del explanto, medido en cm.
- Formación de callo (%): N° de callos (masa de células no diferenciadas) producidos/total de explantes.
- Hiperhidricidad (%): N° de explantes con aspecto vítreo o acuoso/total de explantes.
- Mortandad (%): N° de explantes muertos (de aspecto necrótico) /total de explantes.

Aclimatación ex vitro

A los 40 días de la introducción de los meristemas, los explantes que regeneraron planta completa fueron trasplantados a macetas de 9 cm de diámetro que contenían sustrato estéril compuesto a base de turba de musgo *Sphagnum*, compost de corteza fina, perlita y cenizas (tabaco Growmix ®), y cubiertos con bolsas de polietileno transparentes para afrontar el período de adaptación en un invernáculo de aclimatación. Transcurridos 10 días se retiraron gradualmente las bolsas y las plantas fueron llevadas al invernadero de producción. A partir de ello se calculó la siguiente variable:

- sobrevivencia *ex vitro* (%): N° de plantas que sobrevivieron luego de la aclimatación/total de plantas.

Análisis estadístico

El experimento se realizó mediante un diseño completamente aleatorizado. Se emplearon 16 explantos por tratamiento y el experimento se realizó por triplicado. Por no cumplirse los supuestos de normalidad, las variables regeneración de planta completa, formación de callo, hiperhidricidad y mortandad fueron analizadas mediante la prueba de contraste de varianzas chi-cuadrado a partir del software estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2009). Se corroboró la normalidad de los datos para las variables producción aérea y radical, por lo que se llevó a cabo un análisis de varianza con un nivel de confianza del 95 % mediante el mismo software. Al observar diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó la prueba de diferencia de medias de Di Rienzo, Guzman y Casanoves -DGC- ($p \leq 0,05$) (Di Rienzo *et al.*, 2009).

- Objetivo: liberación de PVY mediante cultivo de meristemas

Material vegetal

Se utilizaron plantas de C. Cv. Pampa Salmón INTA infectadas con PVY de entre 8 y 13 cm de altura conservadas en condiciones *in vitro* en medio de cultivo MS a 25 °C y 16 horas de fotoperíodo. Noventa meristemas apicales de 0,2-0,5 mm fueron extraídos mediante instrumental de disección con la ayuda de una lupa binocular Nikon ® modelo SMZ-10, en una cámara de flujo laminar. Se emplearon tubos de ensayo de 24,0 x 115 mm que fueron completados con 10 mL de medio de cultivo conformado por MS ½ + 0,01 mg. L⁻¹ BAP, el cual fue determinado como el más adecuado de acuerdo con los resultados del objetivo anterior, y se introdujo un meristema por cada tubo.

Establecimiento de explantes

Los tubos de ensayo que contenían los meristemas se llevaron a una cámara de cultivo durante 40 días bajo un fotoperiodo de 16 h a una intensidad de 1000 lux y una temperatura constante de 25 °C para promover la diferenciación de tejidos.

Diagnóstico de PVY mediante análisis molecular

Extracción de ARN

En primer lugar, vale aclarar que para la detección de PVY por RT-PCR, se realizaron agrupaciones de plantas (*pool*es) según lo indicado en el Capítulo II de esta investigación. Por tanto, sabiendo que la detección de PVY es confiable teniendo 1 hoja infectada en 9 hojas sanas, para el presente capítulo se han realizado *pool*es de 10 hojas por tubo de extracción de ARN en el caso de las plantas que no manifestaron sintomatología típica de PVY luego de su regeneración a partir de meristemas. Por su parte, aquellas plantas que presentaron síntomas típicos de PVY fueron analizadas individualmente.

Para la extracción de ARN se siguió la misma metodología descrita en la sección “Análisis de sensibilidad de la técnica RT-PCR” del Capítulo II.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

Síntesis de ADN copia (ADNc)

La concentración de ARN fue determinada con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (*NanoDrop Technologies*) a partir de la absorbancia a 260 nm, puesto que se estima que $A(260\text{nm}) = 1$ equivale a $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de ARN. La pureza e integridad del ARN total fue determinada por la relación 260/280 nm y por la relación 260/230 nm.

Para la síntesis de la cadena de ADNc se utilizó como templado $1 \mu\text{g}$ de ARN total, el oligo d(T) *primer* M4T (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC (T)₁₅-3'), que hibrida con la cola de poli A y T del del virus, y la transcriptasa reversa *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) (Promega ®), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Detección de PVY por RT-PCR

Para la detección del PVY se amplificó la región que codifica para la proteína de la cápside del genoma viral (377 kb) mediante PCR. Se utilizaron los cebadores *forward* 1: 5' ATACCCACTCAAGCCAATCG 3' y *reverse* 1: 5' ACATGTTCTTGACCCCAAGC 3'

La mezcla de reacción de la PCR se realizó según la Tabla V.1.

Tabla V.1. Mezcla de reacción de la PCR

Reactivos	Concentración final	Volumen (µl)
H ₂ O MilliQ*		19,48
Buffer 5X	1X	2,5
MgSO ₄ (25 mM)	0,5 mM	0,5
dNTPs (10 mM)	0,2 mM	0,5
Ceb. <i>Forward</i> 1	0,2 µM	0,5
Ceb. <i>Reverse</i> 1	0,2 µM	0,5
GoTaq DNA <i>Polymerase</i> (5 U. µl ⁻¹) (Promega ®)	0,04 U. µl ⁻¹	0,2
ADNc		1
Volumen final		25

*Agua libre de ARNasas

Cada muestra para analizar estuvo conformada por 24 µl de la mezcla de reacción más 1 µl del ADNc correspondiente. La reacción de PCR fue llevada a cabo con un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min seguido por 34 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 56 °C y 2 minutos a 68 °C con una extensión final a 68 °C durante 5 minutos mediante un termociclador (*My Cycler*, Bio-Rad ®).

Visualización de los productos de amplificación

Los productos de amplificación fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio (concentración final de 0,5 µg. mL⁻¹) en *buffer* TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). La corrida electroforética se realizó a voltaje constante (60 V) durante 1:15 h y los productos de amplificación se visualizaron bajo luz UV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Objetivo: optimización del protocolo de cultivo de meristemas

Efecto de los tratamientos sobre la producción de plántulas completas, la formación de callo, la hiperhidricidad y la mortandad de los explantes

De acuerdo con el análisis estadístico de contraste de medias presentado en la Tabla V.2, se pudo observar que la respuesta de los explantes de *Calibrachoa* Cv. Pampa

Salmón INTA a los diferentes tratamientos dependió del tipo de regulador de crecimiento presente en el medio de cultivo base.

En cuanto a la regeneración de plantas completas a partir de meristemas apicales, los tratamientos testigo, MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ KIN; MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ ANA; MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ IBA; y MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ ANA + 0,20 mg L⁻¹ BAP, fueron estadísticamente similares entre sí, ya que obtuvieron los menores valores para este parámetro (0, 0, 13, 13 y 0%, respectivamente), pero fueron significativamente diferentes al tratamiento conformado por MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ BAP que pudo regenerar un 63% de plantas de *Calibrachoa* var. Pampa Salmón INTA. Estos valores no coinciden con los obtenidos por Kato *et al.* (2005), quienes lograron la mayor producción de plantas de *Calibrachoa pigmaea*, *C. calycina* y *C. linearis* a partir de la adición de KIN al medio MS. Tampoco coinciden con los resultados por Dill (2014), quien encontró en *Calibrachoa sellowiana* los mayores valores para este parámetro mediante la combinación de 0,01 mg L⁻¹ ANA + 0,20 mg L⁻¹ BAP. La citoquinina BAP cumple un rol fundamental en la división celular y en la diferenciación de los explantes, así como también participa en la activación del transporte de nutrientes (Figuroa, 2015), lo que podría explicar el mayor crecimiento de los explantes y el alto número de plantas completas obtenidas por el tratamiento conformado por MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ BAP. Por su parte, los tratamientos conformados por auxinas no lograron alcanzar altos valores de regeneración de plantas completas ya que, posiblemente, la presencia de este regulador de crecimiento ejerció cierta inhibición en los niveles de citoquinina endógena de cada explante por medio de los mecanismos de biosíntesis (Cervantes Flores, 2014), lo cual pudo haber dificultado los procesos de diferenciación celular y la actividad metabólica en los que intervienen las citoquininas para favorecer el crecimiento de los explantes (Figuroa, 2015).

Por otro lado, los tratamientos testigo, MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ BAP; y MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ IBA no mostraron diferencias significativas entre sí en cuanto a la formación de callo (19%, 25% y 0%, respectivamente), pero sí con respecto a los tratamientos MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ KIN; MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ ANA; y MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ ANA + 0,20 mg L⁻¹ BAP que fueron ampliamente superiores por haber formado callo en el 69, 38 y 100% de los explantes (Figura V.4). Tanto las auxinas como las citoquininas son capaces de inducir la producción de tejidos no organizados (Jordán y Casaretto, 2006), por lo cual se pudo ver que la mayor producción de callo se dio en estos últimos tratamientos. Estos resultados se relacionan con los obtenidos por Kato *et al.* (2005), quienes observaron esta continua y activa división celular desorganizada en meristemas de *C. parviflora* cultivados en un medio compuesto por 0,05 mg L⁻¹ KIN y 0,01 mg L⁻¹ ANA.

En cuanto a la hiperhidricidad, los tratamientos testigo y MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ BAP no presentaron aspecto vítreo en ninguno de los casos (0%), lo cual fue estadísticamente

similar a los tratamientos MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ IBA y MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ ANA + 0,20 mg L⁻¹ BAP, que presentaron vitrificación en un 25%. Estos valores fueron significativamente diferentes a los alcanzados por MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ KIN; y MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ ANA, donde la hiperhidricidad se manifestó en un 69 y 88%, respectivamente. Asimismo, la mayor cantidad de explantes necrosados se dio en los tratamientos MS $\frac{1}{2}$ + 0,010 mg L⁻¹ KIN y MS $\frac{1}{2}$ + 0,010 mg L⁻¹ ANA por encontrarse en un 44 y un 31% de los casos, respectivamente. El exceso de agua en el apoplasto de los explantes quizá pudo haber dificultado el intercambio gaseoso de las células, lo cual podría haber desencadenado su muerte (Hongyang *et al.*, 2017), ya que los mayores valores de hiperhidricidad coincidieron con los más altos de mortandad. Por su parte, los medios testigo; MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ BAP; y MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ IBA lograron los menores valores de mortandad (25, 6 y 0%, respectivamente) y tuvieron diferencias estadísticas significativas a los alcanzados por los tratamientos MS $\frac{1}{2}$ + 0,010 mg L⁻¹ KIN; y MS $\frac{1}{2}$ + 0,010 mg L⁻¹ ANA.

Tabla V.2. Efecto de los tratamientos sobre la producción de plántulas completas, la formación de callo, la hiperhidricidad y la mortandad de explantes de *Calibrachoa* Cv. Pampa Salmón INTA a los 40 días del cultivo in vitro de meristemas apicales

Tratamiento	Regeneración planta completa (%)	Formación de callo (%)	Hiperhidricidad (%)	Mortandad (%)
MS $\frac{1}{2}$	0 (0/16) a	19 (3/16) a	0 (0/16) a	25 (4/16) a
MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L ⁻¹ KIN	0 (0/16) a	69 (11/16) b	69 (11/16) b	44 (7/16) b
MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L ⁻¹ ANA	13 (2/16) a	38 (6/16) ab	88 (14/16) b	31 (5/16) b
MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L ⁻¹ BAP	63 (10/16) b	25 (4/16) a	0 (0/16) a	6 (1/16) a
MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L ⁻¹ IBA	13 (2/16) a	0 (0/16) a	25 (4/16) a	0 (0/16) a
MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L ⁻¹ ANA + 0,20 mg L ⁻¹ BAP	0 (0/16) a	100 (16/16) b	25 (4/16) a	0 (0/16) a

Letras distintas en columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

MS: Murashige y Skoog; KIN: kinetina; ANA: ácido naftalenacético; BAP: bencilaminopurina; IBA: ácido indolbutírico

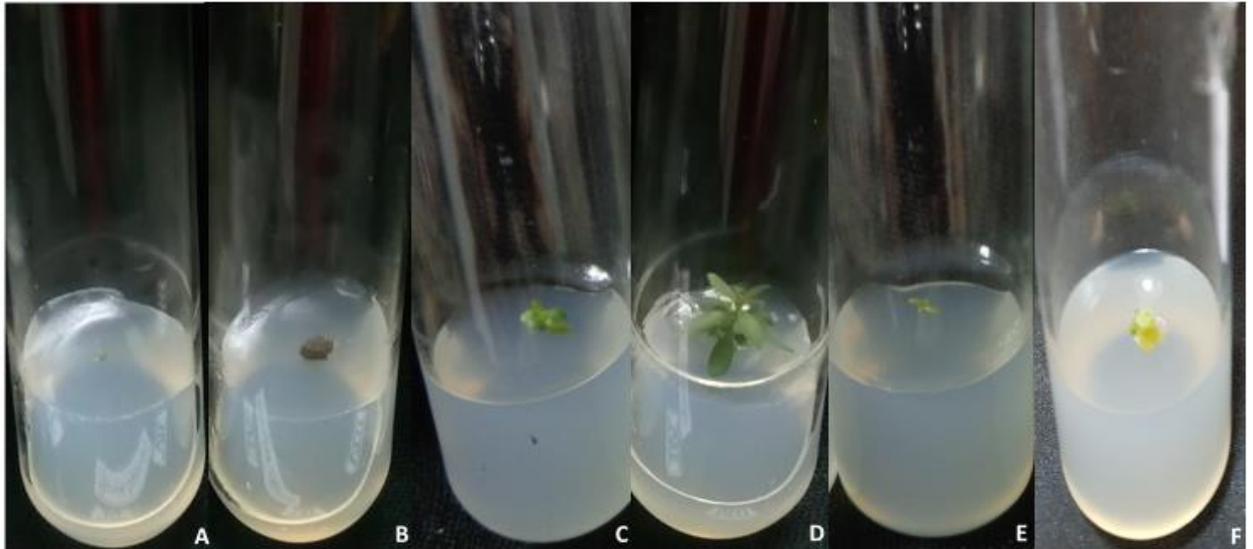


Figura V.4. Efecto de los tratamientos sobre la producción de plantas completas, la formación de callo, la hiperhidricidad y la mortandad de explantes de *Calibrachoa* Cv. Pampa Salmón INTA a los 40 días del cultivo in vitro de meristemas apicales. A: MS $\frac{1}{2}$. B: MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ KIN. C: MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ ANA. D: MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ BAP. E: MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ IBA. F: MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ ANA + 0,20 mg L⁻¹ BAP

Efecto de los tratamientos sobre la producción aérea y radical de los explantos

El análisis estadístico mostró que el tratamiento BAP resultó sensiblemente superior en los principales parámetros evaluados que son fundamentales para lograr la propagación de plantas de calidad. Otro tratamiento que resulta interesante, pero que estadísticamente no mostró significancia en algunos parámetros es el conformado por IBA, por tanto, se decidió continuar el análisis con los tratamientos MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ BAP y MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ IBA en comparación con el tratamiento testigo.

De acuerdo con el análisis de la varianza, la producción de hojas/explante del tratamiento MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ BAP fue significativamente superior (9,38) a la producción de los tratamientos testigo (1,63) y MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ IBA (1,88), cuyos valores fueron estadísticamente similares entre sí (Figura V.5). Esta respuesta puede explicarse ya que las citoquininas intervienen en la organogénesis vegetal, por lo tanto, inducen la formación de hojas y brotes (Figuroa, 2015), tal como sucedió en el tratamiento conformado por MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ BAP que obtuvo el mayor número de hojas/explante. Estos resultados no concuerdan con los observados por Dill (2014), quien encontró que la mayor producción de brotes de *C. sellowiana* se dio en un medio de cultivo MS suplementado con 0,01 mg L⁻¹ ANA + 0,20 mg L⁻¹ BAP.

En cuanto a la altura de los explantes se observó la misma tendencia que para la variable N° de hojas/explante, donde se vio que el tratamiento MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ BAP obtuvo la mayor longitud aérea (0,71), significativamente diferente al tratamiento testigo

(0,11) y al tratamiento MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L $^{-1}$ IBA (0,19) (Figura V.6). Tal como ya se mencionó, las citoquininas juegan un rol importante en varias fases del desarrollo de las plantas. Ello involucra la desinhibición y diferenciación de yemas, el alargamiento celular y el flujo de asimilados y nutrientes, por lo que producen mayor cantidad de ramificaciones y mayor longitud aérea de las plantas (Lagoutte *et al.*, 2009). Por ello, se asume que el tratamiento compuesto por MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L $^{-1}$ BAP pudo diferenciarse de los tratamientos restantes. Estos valores tampoco coinciden con los reportados por Dill (2014), que observó la mayor altura de explantes de *C. sellowiana* en un tratamiento conformado por MS + 0,01 mg L $^{-1}$ ANA y otro compuesto por MS sin la adición de reguladores de crecimiento.

En el análisis de la longitud radical se vio que no hubo diferencias estadísticas significativas entre ninguno de los tratamientos observados (0 en el tratamiento testigo; 0,38 en MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L $^{-1}$ BAP y 0,59 en MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L $^{-1}$ IBA). Se sabe que tanto las auxinas como las citoquininas intervienen en la formación de raíces (Bustamante *et al.*, 2012). Sin embargo, la baja producción radical de los tratamientos conformados por MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L $^{-1}$ IBA y MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L $^{-1}$ BAP pudo deberse a que el tiempo que el explante estuvo en contacto con el medio de cultivo no fue el adecuado para lograr un alto desarrollo de raíces. Por su parte, Kato *et al.* (2005) encontraron que los mayores valores de crecimiento de raíces de *C. parviflora* se dieron en un medio compuesto por MS + 0,01 mg L $^{-1}$ KIN, lo cual difiere notablemente de los resultados alcanzados durante este experimento. Tal como se vio, tanto para la producción aérea como para la radical, el tratamiento testigo (MS $\frac{1}{2}$) no logró alcanzar valores significativamente superiores, ya que la ausencia de reguladores de crecimiento en su composición no permitió que los meristemas pudieran lograr su correcta diferenciación.

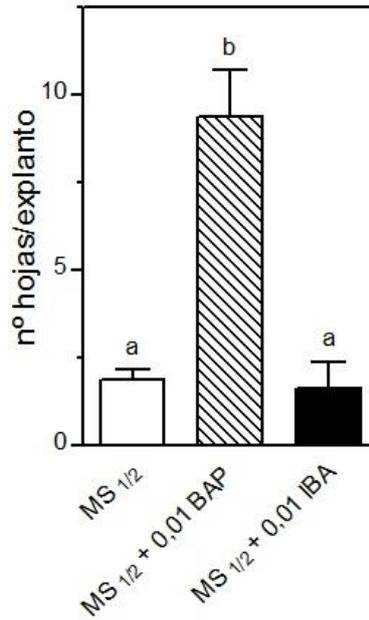


Figura V.5. Efecto de los tratamientos sobre el número de hojas/explante
 MS: Murashige y Skoog; BAP: bencilaminopurina; IBA: ácido indolbutírico

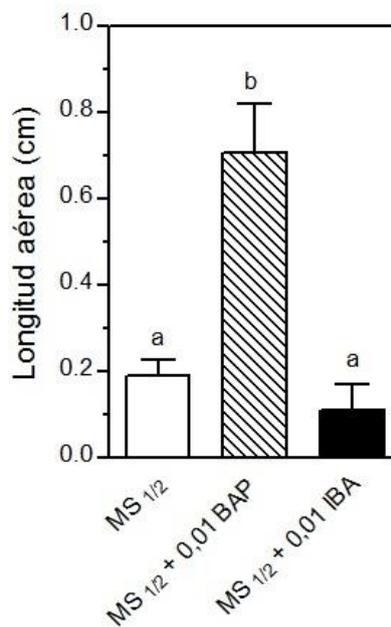


Figura V.6. Efecto de los tratamientos sobre la longitud aérea de los explantes

Sobrevivencia ex vitro de las plántulas

Finalizado el período de adaptación se vio que el 100% de las plantas transferidas al invernáculo (aquellas provenientes del tratamiento compuesto por MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹

BAP) sobrevivieron al trasplante (Figura V.7), valor óptimo para la producción de plantas a partir de meristemas.

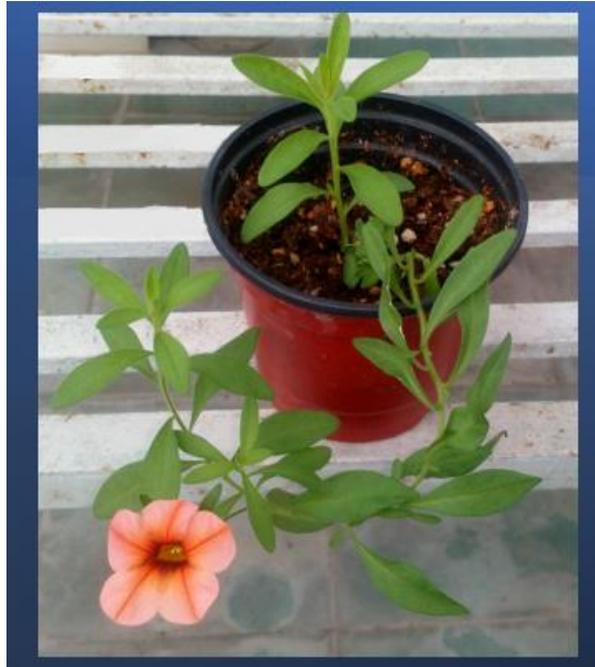


Figura V.7. *Calibrachoa* var. Pampa Salmón INTA regenerada a partir de meristemas apicales mediante MS $\frac{1}{2}$ + 0,01 mg L⁻¹ BAP
MS: Murashige y Skoog; BAP: bencilaminopurina

- Objetivo: liberación de PVY mediante cultivo de meristemas

Los meristemas de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA fueron capaces de regenerar plantas en un 39 %. Se encontraron 26 plantas regeneradas libres de PVY, mientras que 9 plantas individuales se detectaron infectadas por PVY luego de su análisis molecular por RT-PCR (Figura V.8).

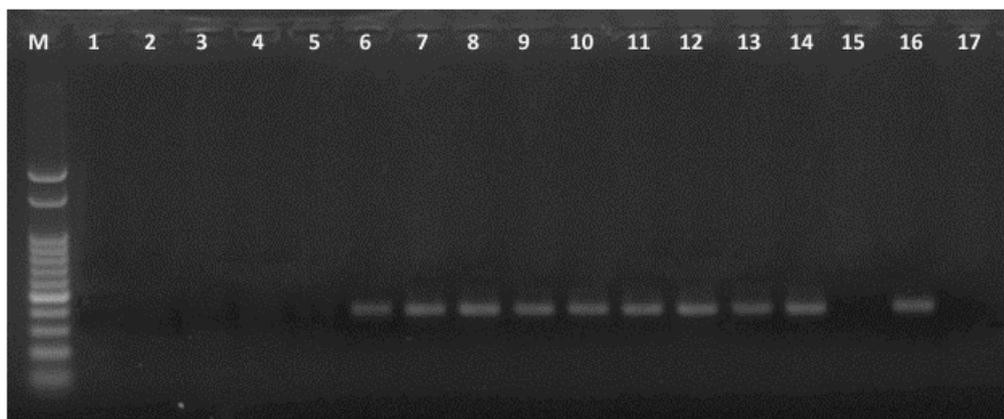


Figura V.8. Perfil de amplificación de ADNc de PVY. M: marcador de peso molecular 100 pb (Ladder PBL-Productos Bio-lógicos ®); líneas 1 a 4: *pooles* de 5 plantas de *C. cv. Pampa Salmón INTA* sin sintomatología típica de PVY; línea 5: *pool* de 6 plantas de *C. cv. Pampa Salmón INTA* sin sintomatología típica de PVY; líneas 6 a 14: plantas individuales de *C. cv. Pampa Salmón INTA* con sintomatología típica de PVY; línea 15: control negativo de la RT-PCR; línea 16: control positivo de PVY (*C. cv. Pampa salmón INTA* infectada); línea 17: control negativo de la PCR (reactivos sin ADN)

Análisis histológicos realizados en las secciones longitudinales de los brotes apicales de *Solanum tuberosum* han demostrado que las plantas infectadas por PVY^{NTN} contienen meristemas más pequeños debido a un menor número de células en las diferentes zonas del meristema, por lo que la zona periférica en la que se inducen los meristemas se encontraba mayormente afectada por el virus (Dolenc *et al.*, 2000). En este trabajo, posiblemente los meristemas de menor tamaño producidos por la infección de PVY no lograron regenerar plantas completas de *C. cv. Pampa Salmón INTA* luego de su introducción en el medio de cultivo probado con éxito anteriormente, por lo que el valor de regeneración de plantas descendió a 39 %.

La tasa general de eliminación de PVY en *C. cv. Pampa Salmón INTA* a partir del cultivo de meristemas fue del 74% (Tabla V.3).

Tabla V.3. Detección de *Potato virus Y* (PVY) y tasa de eliminación del virus a partir de la técnica del cultivo de meristemas de *C. cv. Pampa Salmón INTA*

Plantas de <i>C. cv. Pampa Salmón INTA</i>			
Analizadas	PVY (+) ^a	PVY (-) ^b	Tasa de eliminación de PVY (%) ^c
35	9	26	74

a: plantas detectadas positivas a PVY según RT-PCR

b: plantas detectadas negativas a PVY según RT-PCR

c: número de plantas negativas a PVY/total de plantas analizadas

Resultados similares fueron hallados por Zhang *et al.* (2019), quienes lograron la eliminación de PVY en plantas de papa en un 82,8% a partir del cultivo de meristemas. Del mismo modo, Prammanee *et al.* (2011) lograron obtener plantas de *Passiflora* libres de otro potyvirus (*Passion fruit woodiness virus*) mediante esta técnica, mientras que Sasi y Bath (2018) alcanzaron una tasa de eliminación de virus del 84 %, pero con respecto al *Piper yellow mottle virus* en plantas de pimienta. En contraposición, Wang y

Valkonen (2008) encontraron que la técnica del cultivo de meristemas falló en un 93% para la eliminación de otro potyvirus (*Sweet potato feathery mottle virus*) en batata.

Por su lado, Aguirre y Martínez (2001) encontraron mayor éxito en la combinación del cultivo de meristemas con termoterapia para lograr la eliminación total de PVY de plantas de *Solanum tuberosum* var. Salentina y de otros virus fitopatógenos de este cultivo, tales como *Potato virus X*, *Potato leaf roll virus* y *Potato virus S*.

Fernández Cuba (2015) logró la eliminación de PVY en un 100 % de las plantas de *Solanum tuberosum* var. Leona y en otra variedad de *S. tuberosum* luego de combinar las técnicas de termoterapia con electroterapia, mientras que Delgado *et al.* (2010) lograron eliminar el *Potato virus X* en un 95% de las plantas de *Solanum andigena* var. Tushpa luego de someterlas a un proceso de termoterapia anterior al cultivo de meristemas.

Dadas estos experimentos y según Park *et al.*, (2021), la erradicación de los virus se puede lograr tanto por cultivo de meristemas como por termoterapia. Sin embargo, el éxito de estas metodologías dependerá de la especie y variedad vegetal de la que se trate y de la especie viral presente, ya que la distribución del virus en los tejidos de los primordios foliares también influirá directamente en el saneamiento de las plantas (Wang y Valkonen, 2008).

A su vez, Verma *et al.*, (2004) observaron que el tamaño del meristema también influirá en la eficiencia de la eliminación: aquellos meristemas de mayor tamaño disminuirán las probabilidades de obtener plantas libres de virus, a diferencia de los de menor tamaño que resultarán más exitosos por tener mayores probabilidades de encontrarse sin la presencia de estos patógenos. Es posible que la tasa de eliminación de PVY obtenida en este trabajo, que no alcanzó un 100 % de efectividad, haya sido producto de que no se seleccionaron meristemas por tamaño durante el experimento, por lo que sería de importancia investigar el uso de diferentes tamaños de meristemas y su combinación con técnicas de termoterapia y electroterapia, a modo de aumentar el porcentaje de saneamiento final.

CONCLUSIONES

- La combinación del medio de cultivo base MS $\frac{1}{2}$ con 0,01 mg L⁻¹ BAP resulta en un método eficiente para la propagación de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA a partir de meristemas apicales, ya que su empleo posibilita la obtención de un mayor número de plantas completas regeneradas y, además, de una mayor producción aérea y radical que, en consecuencia, permiten una alta tasa de sobrevivencia de plantas luego de su transferencia al invernáculo.
- La técnica del cultivo de meristemas no mostró el 100 % de efectividad para erradicar el PVY, lo que sí se logró en el 74 % de las veces. Se considera que se debería abordar el estudio de la propagación meristemática de acuerdo con el tamaño de los meristemas, y combinar este tratamiento con termoterapia o electroterapia para intentar conseguir una técnica capaz de lograr la total eliminación del virus en la propagación.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, M.A.; Martínez López, G. (2001). "Obtención de plantas sanas de papa, *Solanum tuberosum* L., variedad Salentina a través de las técnicas de termoterapia y cultivo de meristemas". *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 54(1-2):1351-1366.
- Aros, D.; Vásquez, M.; Rivas, C.; Loreto, M. (2017). An efficient method for *in vitro* propagation of *Alstroemeria pallida* Graham rhizomes. *Chilean Journal Agricultural & Animal Sciences*. 77(1):95-99.
- Bustamante, G.; Imata, J.; Linares, L.; Mostajo, D.; Pacheco, R.; Vilca, A. (2012). Efectos de las fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas) en el crecimiento de hipocotilos de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze 'Tara'. Curso de Fisiología Vegetal. Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú.
- Cervantes Flores, F. (2014). Evaluación de efectos de resistencia-susceptibilidad a plagas y enfermedades, productividad y calidad frente a la aplicación de citoquininas y auxinas en plantas de rosa (*Rosa* sp.). Trabajo de graduación para acceder al título de Ingeniero en Agroempresa. Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.
- Conci, V. 2004. *Obtención de plantas libres de virus. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Capítulo 5. Editorial: Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Delgado, C.; Monteros, C.; Benítez, J. (2010). "Evaluación de tres sistemas de termoterapia y cultivo de meristemas en cuatro variedades promosorias de papas nativas (*Solanum* spp.) para la erradicación de virus". Disponible en: <http://cipotato.org/wp-content/uploads/Papanat%202010/MEMORIAS%20EVENTO%20ver%20Marzo%209.pdf#page=30>. Fecha de último acceso: 27 de septiembre de 2020.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M. (2009). Grupo Infostat. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dill, L. (2014). Estrategias de micropropagación de *Calibrachoa sellowiana* (SENDTN.) Wijsman y *Rosmarinus officinalis* L. Trabajo de graduación en Agronomía para acceder al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil.
- Dolenc, J.; Vilhar, B.; Dermastia, M. (2000). "Systemic infection with *Potato virus Y^{NTN}* alters the structure and activity of the shoot apical meristem in a susceptible potato cultivar". *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 56(1):33-38.
- Fernández Cuba, U. (2015). Evaluación de los métodos electroterapia y termoterapia para la liberación de virus PVX y PVY en tres variedades nativas de papa (*Solanum* spp.) – Ayacucho. Tesis de grado para optar por el título de Ingeniero agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga, Perú.
- Figueroa, R.F. (2015). Efectos de diferentes dosis de citoquinina en interacción con un compuesto orgánico en la germinación *in vitro* de semilla de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) Trabajo de graduación en Agronomía para acceder al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Machala, Unidad Académica de Ciencias Agrarias, Ecuador.

- Hongyang, G.; Xiuying, X.; Lijian, A.; Xin, X.; Yuan, L. (2017). "Reversion of hyperhydricity in pink (*Dianthus chinensis* L.) plantlets by AgNO₃ and its associated mechanism during in vitro culture". *Plant Science*. 254:1-11.
- Jordán, M.; J. Casaretto. (2006). *Fisiología vegetal*. Capítulo XV. Hormonas y reguladores de crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
- Kato, A.E.; Hagiwara, J.C.; Mori, M.N.; Soto, M.S. (2005). Meristem culture for the conservation and propagation in four *Calibrachoa* species native to Argentina. *XV Congreso Brasileiro de Floricultura y Plantas Ornamentales y II Congreso Brasileiro de cultivo de tejidos de plantas*. 7-12 de agosto. Asociación Brasileira de Horticultura. Fortaleza, Brasil. Libro de resúmenes p. 644.
- Lagoutte, S.M.; Divo, M.; Vilella, F. (2009). "Efecto del tamaño de celdas y citoquininas en el crecimiento de plantas de petunia". *Revista Internacional de Botánica Experimental*. 78:31-36.
- Liu, H.; Sears, J.; Morrison, R. (2008). "Isolation and characterization of a Carmo-like virus from *Calibrachoa* plants". *Plant Disease*. 87(2):167-171.
- Morel, G.; Martin, G. (1952). "Guérison de dahlias atteintes d'une maladie a virus" *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 235:1324-1325.
- Murashige, T.; F. Skoog. (1962). "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures". *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.
- Park, S. (2021). *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. Editorial: Academic Press, Reino Unido. 4^{ta} Edición.
- Pierik, R.L.M (1989). Cultivo in vitro de las plantas superiores. Editorial: Mundi Prensa. Madrid, España. Edición española.
- Prammanee, S.; Thumjamras, S.; Chiemsombat, P.; Pipattanawong, N. (2011). "Efficient shoot regeneration from direct apical meristem tissue to produce virus-free purple passion fruit plants". *Crop Protection*. 30(11):1425-1429.
- Retheesh, S.T.; Bhat, A.I. (2010). "Simultaneous elimination of *Cucumber mosaic virus* and *Cymbidium mosaic virus* infecting *Vanilla planifolia* through meristem culture". *Crop Protection*. 29(10):1214-1217.
- Sahraro, A.; Zarei, A.; Babalar, M. (2019). "In vitro regeneration of the isolated shoot apical meristem of two commercial fig cultivars 'Sabz' and 'Jaami-e-Kan'". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 17:743:749.
- Sasi, S.; Bhat, A.I. (2018). "In vitro elimination of piper yellow mottle virus from infected black pepper through somatic embryogenesis and meristem-tip culture". *Crop Protection*. 103:39-95.
- Verma, N.; Ram, R.; Hallan, V.; Kumar, K.; Zaidi, A.A. (2004). "Production of *Cucumber mosaic virus*-free chrysanthemum by meristem tip culture". *Crop Protection*. 23(5):469-473.

- Wang, Q.C.; Valkonen J.P.T. (2008). "Elimination of two viruses which interact synergistically from sweet potato by shoot tip culture and cryotherapy". *Journal of Virological Methods*. 154(1–2):135-145.
- Whitfield, A.; Falk, B.; Rotenberg, D. (2015). "Insect vector-mediated transmission of plant viruses". *Virology*. 479-480:278-289.
- Zhang, Z.; Wang, Q.; Spetz, C.; Blystad, D. (2019). "In vitro therapies for virus elimination of potato-valuable germplasm in Norway". *Scientia Horticulturae*. 249:7-14.

Estudio de la influencia de *Potato virus Y* sobre la sintomatología de *Nigrospora oryzae* en calibrachoa cv. Pampa Salmón INTA y evaluación del comportamiento de *Calibrachoa thymifolia* y de *Petunia integrifolia* frente a infecciones por *N. oryzae*

INTRODUCCIÓN

Los hongos fitopatógenos son considerados uno de los mayores problemas de las plantas, a las cuales provocan modificaciones del crecimiento, del desarrollo y de la producción (Abass y Mohammed, 2014).

En cuanto a las enfermedades causadas por hongos y organismos afines sobre *Calibrachoa hybrida*, a nivel mundial se ha informado la presencia de los oomycetes *Phytophthora nicotianae* (Lin *et al.*, 2018), *P. infestans* (Becktell *et al.*, 2006), *P. capsici* y *P. tropicalis* (Enzenbacher *et al.*, 2015) y de hongos como *Thielaviopsis basicola* (Daughtrey, 2009; Becker, 2017), mientras que en la producción nacional las variedades de *Calibrachoa* también se han mostrado susceptibles a infecciones por *Fusarium* sp. (Rivera *et al.*, 2015), *Alternaria tenuissima* (Borrelli *et al.*, 2021) y *Nigrospora oryzae* (Borrelli *et al.*, 2020).

Nigrospora oryzae (Berk. & Broome) Petch (Filo Ascomycota, Subdivisión Pezizomycotina, Clase Sordariomycetes) (Petch, 1924; Index Fungorum, 2021) es un hongo patógeno que afecta cultivos tales como arroz, maíz, algodón, aloe vera, mostaza, poa (Xiu *et al.*, 2018) e higo (Zhai *et al.*, 2013). Suele afectar plantas debilitadas por causas nutricionales y climáticas o por enfermedades o insectos (Sempere y Santamarina, 2008). Produce áreas circulares cloróticas en las hojas que se expanden y oscurecen con el avance del tiempo (Zhang *et al.*, 2012). A su vez, puede causar lesiones en las puntas de las hojas que, en infecciones graves, se unen con las manchas circulares y, consecuentemente, provocan la muerte foliar (Zhai *et al.*, 2013). Sus estructuras de reproducción asexual -conidios- son negros, esféricos y unicelulares, y pueden visualizarse como signo de las lesiones de la superficie abaxial de las hojas (Zhang *et al.*, 2012). Este hongo patógeno puede sobrevivir en las zonas infectadas de la planta, que son la fuente de inóculo para una próxima infección. Además, puede propagarse rápidamente por la dispersión de sus conidios mediante la acción del viento, de la lluvia, de los insectos y de las herramientas de trabajo (Kee *et al.*, 2019). En la Argentina se lo ha encontrado como fitopatógeno de arándano (Munitz *et al.*, 2013),

Pinus taeda (Venedikian y Godeas, 1996), soja, tabaco, grama bahiana, *Brassocattleya hybrida*, sorgo, arroz y calibrachoa (Nome Huespe *et al.*, 2021).

Existen diferentes factores que predisponen a las plantas a una enfermedad. Ciertos patógenos atacan solamente plantas debilitadas, lo cual puede deberse a una pérdida de vigor por déficit nutricional o bien por el ataque anterior de otro patógeno como sucede, por ejemplo, en papa, cuando la presencia de *Phytophthora infestans* favorece la colonización de *Fusarium coeruleum* (Jauch, 1985). En plantas de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA producidas en el Instituto de Floricultura e infectadas con *Potato virus Y* (PVY), se ha observado el desarrollo de manchas foliares ocasionadas por *N. oryzae* (Borrelli, comunicación personal). Esto hace necesario analizar el patosistema de una forma integrada a partir del estudio de la interacción entre ambos patógenos (previamente citados sobre calibrachoa) y este hospedante.

HIPÓTESIS

- Las plantas de calibrachoa cv. Pampa Salmón INTA infectadas por *Potato virus Y* tienen mayor susceptibilidad a *Nigrospora oryzae* que las plantas no infectadas.
- Genotipos nativos de *Calibrachoa thymifolia* y *Petunia integrifolia* son resistentes a la infección por *Nigrospora oryzae*.

OBJETIVOS

- Evaluar la influencia de *Potato virus Y* sobre la sintomatología de *N. oryzae* en *C. cv. Pampa Salmón INTA*.
- Evaluar el comportamiento de las especies nativas *Calibrachoa thymifolia* y *Petunia integrifolia* frente a infecciones por *N. oryzae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Objetivo: evaluación de la influencia de *Potato virus Y* sobre la sintomatología de *N. oryzae* en *C. cv. Pampa Salmón INTA*

Material vegetal

Se utilizaron 30 plantas de calibrachoa cv. Pampa Salmón INTA infectadas con PVY y 30 plantas de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA sin PVY, de las cuales, en cada caso, 15 fueron tomadas como plantas testigo. Se utilizaron plantas naturalmente infectadas que fueron testeadas para confirmar la presencia de *Potyvirus* mediante la

técnica ELISA detallada en el Capítulo II del presente trabajo. Todas las plantas fueron cultivadas en sustrato tinalizado Z-Growmix® compuesto por compost, turba de musgo *Sphagnum*, fertilizantes y humectantes, en macetas de 9 cm de diámetro, las cuales fueron colocadas sobre mesadas de un invernadero de polietileno ubicado en el INTA Hurlingham, Buenos Aires, Argentina (Latitud Sur: 34,67; Longitud Oeste: 58,65) durante el mes de septiembre de 2021. Se registraron las temperaturas máximas y mínimas diarias.

Preparación del inóculo fúngico

Se trabajó con la cepa *N. oryzae* INTA-IF 540 patógena de calibrchoa (Borrelli *et al.*, 2018) que fue cultivada en placas de Petri con agar papa glucosa a 24 ± 2 °C durante tres semanas. Se obtuvo una suspensión de conidios en agua destilada estéril y para calcular su concentración se utilizó una cámara de Neubauer (Figura VI.1) y un microscopio Olympus® (Figura VI.2).

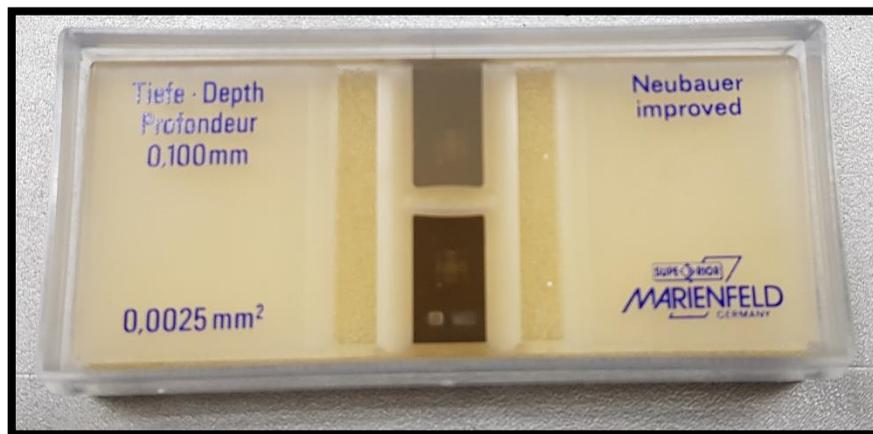


Figura VI.1. Cámara de Neubauer



Figura VI.2. Microscopio utilizado para realizar el conteo de las esporas de *N. oryzae*

Prueba de patogenicidad

El follaje de las plantas fue inoculado con la suspensión preparada, a razón de 4 mL por planta, con un pulverizador manual (Borrelli *et al.*, 2020). Los testigos fueron pulverizados con agua destilada estéril. Finalizada la inoculación, todas las plantas fueron envueltas en bolsas de polietileno transparente a modo de generar un microclima favorable para el desarrollo y establecimiento del patógeno, las cuales fueron retiradas tres días después (Figura VI.3). Las temperaturas registradas oscilaron entre 15 y 25 °C. Transcurridos 4 días desde la inoculación se procedió a observar diariamente las plantas con la finalidad de detectar la aparición de síntomas. El ensayo se repitió con idéntica metodología con la utilización de 8 mL de inóculo por planta.



Figura VI.3. Plantas de *C. cv. Pampa Salmón* INTA envueltas con bolsas de polietileno transparente luego de la inoculación

- Objetivo: evaluación del comportamiento de las especies nativas *Calibrachoa thymifolia* y *Petunia integrifolia* frente a infecciones por *N. oryzae*.

Material vegetal

Se utilizaron 30 plantas de *Calibrachoa thymifolia* 201911E21E1, 30 plantas de *C. thymifolia* 20191121D1#1, 30 plantas de *C. thymifolia* 20191118D3 y 30 plantas de *Petunia integrifolia*, provenientes del banco de germoplasma del Instituto de Floricultura INTA. De cada material, 15 plantas fueron tomadas como testigo. Todas fueron cultivadas sobre sustrato Z-Growmix® desinfectado por tindalización en macetas de 9 cm de diámetro, las cuales fueron colocadas sobre mesadas del invernadero descrito para el objetivo anterior, durante el mes de septiembre de 2021.

Preparación del inóculo fúngico

Se trabajó con la cepa INTA-IF 540 de comprobada patogenicidad sobre calibrachoa (Borrelli *et al.*, 2018). El patógeno fue cultivado en placas de Petri con agar papa glucosa e incubado a 24 ± 2 °C durante tres semanas. La obtención del inóculo y el cálculo de su concentración se realizaron con el mismo procedimiento descrito para el objetivo

que comprende la evaluación de la influencia de *Potato virus Y* sobre la sintomatología de *N. oryzae* en *C. cv. Pampa Salmón* INTA del presente capítulo.

Prueba de patogenicidad

Las plantas fueron pulverizadas con 8 mL de inóculo (Figura VI.4) y envueltas con bolsas de polietileno transparente, permaneciendo así durante tres días. Los testigos fueron tratados con agua destilada estéril. Las temperaturas registradas en el invernáculo oscilaron entre 15 y 25 °C.



Figura VI.4. Planta de *C. thymifolia* 20191118D3 pulverizada con la suspensión de *N. oryzae*

Las plantas permanecieron en observación para la cuantificación de síntomas. A modo de comprobar que las hojas sintomáticas se encontraban efectivamente infectadas por *N. oryzae*, se cortaron hojas con síntomas característicos y bajo flujo laminar fueron desinfectadas superficialmente por inmersión durante 1 minuto en alcohol 70 %, luego durante 1 minuto en lavandina diluida (20 g Cl/L) y seguidamente fueron lavadas con agua destilada estéril. A continuación, fueron introducidas mediante una pinza esterilizada en placas de Petri con agar papa glucosa, e incubadas a 28 °C durante tres semanas (Whang *et al.*, 2017).

Transcurridos 4 días desde la inoculación, se procedió a observar diariamente las plantas y a cuantificar los síntomas durante 10 días consecutivos. Se observó el

momento de aparición de los síntomas y se registró el desarrollo de las lesiones foliares en número y tamaño, según la escala proporcionada por Williams (1977):

- 0: sin síntomas
- 1: 1 mancha por hoja, en menos del 50 % de las hojas
- 2: 1 mancha por hoja, en más del 50 % de las hojas
- 3: 2 a 3 manchas por hoja, en menos del 25 % de las hojas
- 4: 2 a 3 manchas por hoja en más del 50 % de las hojas
- 5: más de 4 manchas por hoja, en menos del 50 % de las hojas
- 6: más de 4 manchas por hoja, en más del 50 % de las hojas
- 7: marchitez o abscisión, menos del 50 % de las hojas
- 8: marchitez o abscisión, más del 50 % de las hojas

Estos valores en la escala permiten categorizar a las plantas en resistentes (grado 0), tolerantes (grados 1 a 3) y susceptibles (grados 4 a 8).

En forma complementaria, se registraron las dimensiones de las manchas foliares características de *N. oryzae* mediante el uso de regla milimetrada. Una vez obtenidos los datos, se calculó el área de cada mancha foliar y se registró el porcentaje de hojas manchadas por planta. Se llevó a cabo un análisis de la varianza con un nivel de confianza del 95 % y, al observar diferencias significativas, se realizó la prueba de diferencia de medias de Duncan ($p \leq 0,05$) con el software estadístico Infostat versión 2020 (Di Rienzo *et al.*, 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Objetivo: evaluación de la influencia de *Potato virus Y* sobre la sintomatología de *N. oryzae* en *C. cv. Pampa Salmón INTA*

La suspensión de conidios aplicada en la prueba de patogenicidad de *N. oryzae* presentó una concentración de $3,6 \times 10^5$ conidios mL⁻¹. Como resultado de las observaciones, no se detectaron síntomas en ninguna de las plantas inoculadas, tanto en las infectadas con PVY (Figura VI.5 A) como en las testigo (Figura VI.5 B). En esta experimentación, no se logró infección por *N. oryzae* con 4 ni con 8 mL de suspensión de conidios por planta. Con una concentración de inóculo del orden de 10^5 conidios mL⁻¹, Borrelli *et al.* (2020) reprodujeron la sintomatología de la enfermedad en el cultivar INTA 06575, en pruebas de patogenicidad a 24 °C. En contraposición, este estudio se realizó bajo una temperatura promedio de 20 °C. Ello podría explicar la ausencia de

síntomas, por tratarse de temperaturas menos conductivas para la enfermedad. En efecto, Borrelli *et al.* (2021) observaron, también a 24 °C, que Pampa Salmón INTA inoculada con *N. oryzae* desarrolló manchas foliares. Esto puede haber ocurrido en el material infectado con PVY donde originalmente se observaron síntomas de *N. oryzae*.

Al comparar las diferencias de respuesta entre los cultivares, Borrelli *et al.* (2021) observaron que Pampa Salmón INTA se mostró como un genotipo de óptimo comportamiento frente a inoculaciones con *N. oryzae*. El presente ensayo se llevó a cabo con anterioridad a conocer estos resultados. En futuros experimentos, se podrían incluir otros cultivares además de las diferentes temperaturas planteadas en el párrafo anterior. Si bien hasta el momento no se puede aceptar la hipótesis planteada, nuevos estudios deberán efectuarse para seguir estudiando la asociación *Potato virus Y-Nigrospora oryzae* en calibrachoa.



Figura VI.5. Plantas de *C. cv.* Pampa Salmón INTA 10 días después de la inoculación con *N. oryzae*. A: infectada con PVY; B: sin infectar con PVY

- Objetivo: evaluación del comportamiento de las especies nativas de *Calibrachoa thymifolia* y de *Petunia integrifolia* frente a infecciones por *N. oryzae*

A los 5 días de la inoculación, el 100 % de las plantas de *Petunia integrifolia* comenzaron a manifestar síntomas típicos de la enfermedad producida por *N. oryzae*: pequeñas manchas circulares de color marrón oscuro-rojizo en las láminas foliares (Figura VI.6). Esto coincide con lo indicado por Zhang *et al.* (2012), donde los síntomas de este patógeno aparecieron luego de 5 días de la inoculación en plantas de *Gossypium hirsutum* (algodón). También Borrelli *et. al.* (2020) observaron un comienzo de desarrollo de sintomatología en calibrachos inoculadas con *N. oryzae* a los 5 días.



Figura VI.6. Hojas de *P. integrifolia* con síntomas típicos de *N. oryzae*: manchas foliares de color marrón-rojizo en las láminas

De acuerdo con la escala de Williams (1977), las plantas de *P. integrifolia* fueron clasificadas como susceptibles a *N. oryzae* por haber presentado una categoría media de 4, la cual representa entre 2 a 3 manchas foliares por hoja en más del 50 % de las hojas (Tabla VI.1).

Tabla VI.1. Respuesta de *P. integrifolia*, *C. thymifolia* 201911E21E1, *C. thymifolia* 20191121D1#1 y *C. thymifolia* 20191118D3 a la inoculación con *N. oryzae*

Tratamiento	Categoría (Williams, 1977)	Área de mancha foliar (cm ²)	Hojas manchadas (%)
<i>P. integrifolia</i> testigo	0 A	0 A	0 A
<i>P. integrifolia</i> inoculada	4 B	0,7 B	28 B
<i>C. thymifolia</i> 201911E21E1 testigo	0 A	0 A	0 A

<i>C. thymifolia</i> 201911E21E1 inoculada	0 A	0 A	0 A
<i>C. thymifolia</i> 20191121D1#1 testigo	0 A	0 A	0 A
<i>C. thymifolia</i> 20191121D1#1 inoculada	0 A	0 A	0 A
<i>C. thymifolia</i> 20191118D3 testigo	0 A	0 A	0 A
<i>C. thymifolia</i> 20191118D3 inoculada	0 A	0 A	0 A

Medias con una letra en común entre columnas no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según test de Duncan

A su vez, en la Tabla VI.1 se puede observar la superficie que ocupan las manchas foliares provocadas por *N. oryzae* en las plantas de *P. integrifolia*, las cuales mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los testigos ($p < 0,05$), así como también se puede visualizar el porcentaje de hojas manchadas. En la Figura VI.7 se pueden apreciar con detalle las características de las manchas.



Figura VI.7. Hojas de *P. integrifolia* con manchas provocadas por *N. oryzae*

El aislamiento de colonias típicas de *N. oryzae* a partir de las hojas de *P. integrifolia* inoculadas que presentaron manchas permitió confirmar la patogenicidad de este aislado en este hospedante (Figura VI.8). Por otro lado, tal como se observa en la Tabla VI.1, las plantas de *Calibrachoa thymifolia* 201911E21E1, *C. thymifolia* 20191121D1#1 y *C. thymifolia* 20191118D3 inoculadas con *N. oryzae* no desarrollaron síntomas en ningún momento, por lo que se las clasificó como resistentes a la enfermedad (grado 0) (Figura VI.9).

La utilización de una escala resulta provechosa y permite categorizar la respuesta de los materiales genéticos en resistentes, tolerantes y susceptibles, además de eficientizar las mediciones, ya que la medida de las manchas foliares provocadas por el patógeno insume mayor tiempo.

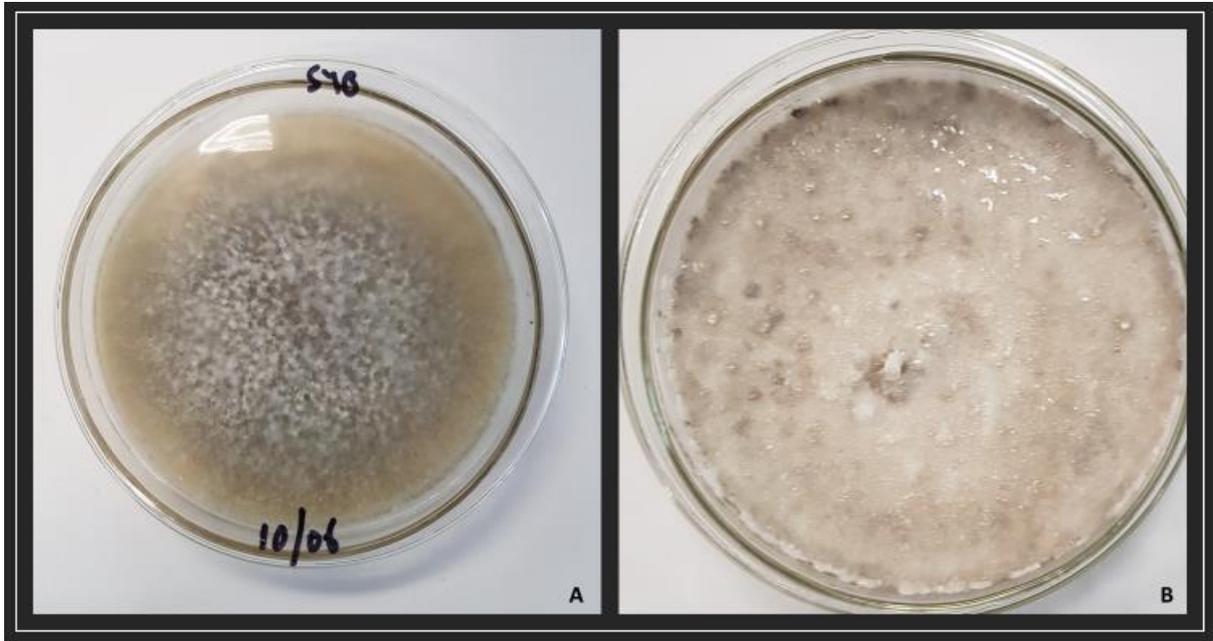


Figura VI.8. *N. oryzae* cultivado en agar papa glucosa. A: cepa inoculada INTA-IF 540; B: cultivo a partir de hoja de *P. integrifolia* infectada



Figura VI.9. Plantas asintomáticas de *Calibrachoa thymifolia* inoculadas con *N. oryzae*. A: 20191121D1#1; B: 201911E21E1; C: 20191118D3

Los resultados obtenidos en esta investigación evidencian que *N. oryzae* no presentó capacidad para infectar a todas las especies inoculadas, ya que no desarrollaron síntomas los tres genotipos de *Calibrachoa thymifolia* estudiados, mientras que en *Petunia integrifolia* ocasionó las manchas foliares características. Esto permite aceptar parcialmente la hipótesis planteada.

La diversidad en los resultados puede deberse, por un lado, a que este estudio se realizó bajo una temperatura promedio de 20 °C, la cual es menos conductiva para la enfermedad y, por tanto, podría ser una de las causas que expliquen la ausencia de síntomas en *C. thymifolia*.

Por otro lado, podría deberse a que *P. integrifolia* no presenta determinantes de resistencia contra la enfermedad, lo que estableció la infección de todas las plantas. Por lo contrario, *C. thymifolia* posee tallos y hojas glanduloso-pubescentes (Greppi y Stehmann, 2013), lo cual puede haber constituido un primer obstáculo contra la penetración del patógeno.

Si bien las plantas no tienen un sistema inmunológico desarrollado como el de los animales superiores, sus mecanismos de defensa son complejos y dinámicos. Por ello, utilizan diversas estrategias contra los fitopatógenos. Por un lado, poseen herramientas constitutivas que incluyen barreras físicas, procesos de lignificación, suberización y formación de calosa (Montes-Belmont, 2009). Por otro lado, poseen receptores de reconocimiento que perciben los patrones moleculares de los patógenos (PAMP) liberados por los hongos. Este reconocimiento conduce a la activación de los mecanismos de defensa que involucran el fortalecimiento de la pared celular y la producción de compuestos de defensa antifúngicos. A su vez, los complejos inmunes que contienen proteínas de resistencia (proteínas R) permiten que las plantas resistentes reconozcan específicamente los efectores de virulencia del patógeno en el apoplasto o en el interior de la célula y, entonces, refuercen la señalización de defensa (Saur y Hüchelhoven, 2021).

Sería deseable realizar la repetición de este experimento con la posterior observación de las hojas de *C. thymifolia* inoculadas con la finalidad determinar si los conidios son capaces de germinar allí.

Al parecer, los datos obtenidos durante esta investigación constituyen los primeros registros sobre el comportamiento fitosanitario de *C. thymifolia* y *P. integrifolia* en este país y a nivel global con excepción de una cita sobre *Ascochyta daturae* sobre *P. integrifolia* en Bulgaria (Vanev *et al.*, 1997). La investigación aporta información que puede ser útil en la búsqueda de resistencia a *N. oryzae* y sirve de base para abordar estudios sobre la naturaleza morfológica o bioquímica de este comportamiento.

CONCLUSIONES

- *Calibrachoa thymifolia* presenta comportamiento resistente frente a *N. oryzae*.
- *Petunia integrifolia* no muestra resistencia a *N. oryzae*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abass, M.H.; Mohammed, N.H. (2014). "Morphological, molecular and pathological study on *Nigrospora oryzae* and *Nigrospora sphaerica*, the leaf spot fungi of date palm. *Basrah Journal for Date Palm Research*. 13(1-2):26-38.
- Becker, L. (2017). "Increased flower production and plant weight of *Calibrachoa x hybrida* by the soil fungus *Mortierella elongata*". Disponible en: <https://repository.lib.ncsu.edu/bitstream/handle/1840.20/34774/etd.pdf?sequence=1>. Fecha de último acceso: 23/07/2021.
- Beckett, M.C.; Smart, C.D.; Haney, C.H.; Fry, W.E. (2006). "Host-pathogen interactions between *Phytophthora infestans* and the solanaceous hosts *Calibrachoa x hybridus*, *Petunia x hybrida*, and *Nicotiana benthamiana*". *Plant Disease*. 90(1):24-32.
- Borrelli, N.P.; Stancanelli, S.; Hagiwara, J.C.; Rivera, M.C. (2018). "Enfermedades foliares en *Calibrachoa hybrida*". *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*. 38(1):61.
- Borrelli, B.; Stancanelli, S.; Papone, M.; Moreno, M.V.; Stenglein, S.; Wright, E.R.; Hagiwara, J.C.; Rivera, M.C. (2020). "Leaf spots of calibrachoa caused by *Nigrospora oryzae*". *Ornamental Horticulture*. 26(4):591-597.
- Borrelli, N. P.; Cureses, D.; Calicanton, S. A.; Stancanelli, S.; Hagiwara, J. C.; Wright, E. R.; Rivera, M. C. (2021). Respuesta de cultivares de calibrachoa a *Alternaria tenuissima* y *Nigrospora oryzae*. V Congreso Argentino de Fitopatología. Resúmenes. <https://congreso.caf2021.com.ar/nota/bsq?ID=402||RESPUESTA-DE-CULTIVARES-DE-CALIBRACHOA-A-Alternaria-tenuissima-Y-Nigrospora-oryzae>.
- Daughtrey, M. (2009). "Pest management. wrestling with a rapacious root rotter". *Growertalks Magazine*. Disponible en: <https://www.bioworksinc.com/industry-news/grower-talks-11-09.pdf>. Fecha de último acceso: 23/07/2021.
- Di Rienzo, J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, y M. Tablada. (2020). Grupo Infostat. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Enzenbacher, T.B.; Naegele, R.P.; Hausbeck, M.K. (2015). "Susceptibility of greenhouse ornamentals to *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis*". *Plant Disease*. 99(12):1808-1815.
- Greppi, J. A.; Stehmann, J. R. (2013). "Calibrachoa". A. M. Anton & F. O. Zuloaga (eds.), *Flora Vascular de la República Argentina*. 13: 94-104. Buenos Aires: Estudio Sigma S.R.L.
- Hull, R. (2009). *Comparative plant virology*. Editorial: Academic Press. Norwich, Reino Unido. 2^{da} edición.

- Index Fungorum. (2021). *Nigrospora oryzae*. Royal Botanic Gardens Kew, Landcare Research-NZ, Institute of Microbiology. Disponible en: <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>. Fecha de último acceso: 18/11/2021.
- Jauch, C. (1985). *Patología vegetal*. Buenos Aires, Argentina: Editorial El Ateneo. 3^{era} edición.
- Kee, Y.J.; Hafifi, A.B.; Huda-Shakirah, A.R.; Wong, K.L.; Jin, X.L.; Nordahliawate, M.S.; Zakaria, L.; Moh, M.H. (2019). "First report of reddish brown sport disease of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) caused by *Nigrospora lacticola* and *Nigrospora sphaerica* in Malaysia". *Crop Protection*. 122:165-170.
- Lin, S.A.; Martin, D.E.; Taylor, N.J.; Gabriel, C.K.; Ganeshan, V.D.; Hand, F.P. (2018). "First report of phytophthora aerial blight caused by *Phytophthora nicotianae* on vinca, lobelia, and calibrachoa in Ohio". *Plant disease*. 102(2):456.
- Montes-Belmont, R. (2009). "Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos". *Revista Mexicana de Micología*. 29:73-82.
- Munitz, M.S.; Garrido, C.E.; Gonzalez, H.H.L.; Resnik, S.L.; Salas, P.M.; Montti, M.I.T. (2013). "Mycoflora and potential mycotoxin production of freshly harvested blueberry in Concordia, Entre Ríos Province, Argentina". - *International journal of fruit science*.13(3):312-325.
- Nome Huespe, S.F.; Docampo, D.M.; Conci, L.R. (2021). Atlas Fitopatológico Argentino. 4(1). Disponible en: <http://rian.inta.gov.ar/atlas/#/ConsultaGeneral?Por=NombrePatogeno&NombrePatogeno=nigrospora%20oryzae>. Fecha de último acceso: 23/11/2021.
- Petch (1924). "*Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch". *Journal of the Indian Botanical Society*. 4:24.
- Saur, I.M.L.; Hückelhoven, R. (2021). "Recognition and defence of plant-infecting fungal pathogens". *Journal of Plant Physiology*. 256:1-14.
- Sempere, F.; Santamarina, M.P. (2008). "Suppression of *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch by an aggressive mycoparasite and competitor, *Penicillium oxalicum* Currie & Thom". *International Journal of Food Microbiology*. 122(1-2):35-43.
- Vanev, S.G.; Sameva, E.F.; Bakalova, G.G. (1997). "Order Sphaeropsidales". *Fungi Bulgaricae*. 3(1):335.
- Velasco, V.V.A. (1999). "Papel de la nutrición mineral en la tolerancia a las enfermedades de las plantas". *Terra Latinoamericana*. 17(3):193-200.
- Venedikian, N.; Godeas, A. M.; (1996). "Estudio de la filosfera de *Pinus taeda* (Pinaceae). I. Poblaciones fúngicas". *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. ISBN/ISSN: 373-580X.
- Wang, M.; Liu, F.; Crous, P.W.; Cai, L. (2017). "Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: ubiquitous endophytes, plant and human pathogens. *Persoonia*. 39:118-142.
- Williams, R. J. (1977). "Identification of multiple disease resistance in cowpea". *Tropical Agriculture (Trinidad)*. 54(1): 53–59.

- Xiu, J.; Zhu, Y.; Chao, W.; Zhang, J.; Hong, Z.; Zhu, J. (2018). "Caracterización molecular de un supuesto gammapartitivirus en el hongo fitopatógeno *Nigrospora oryzae*". *Archives of Virology*. 163(4):1091-1095.
- Zhai, L.F.; Liu, J.; Zhang, M.X.; Hong, N.; Wang, G.P.; Wang, L.P. (2013). "The first report of leaf spots in *Aloe vera* caused by *Nigrospora oryzae* in China". *Plant Disease*. 97(9):1256.
- Zhang, L.X.; Li, S.S.; Tan, G.J.; Shen, J.T.; He, T. (2012). "First report of *Nigrospora oryzae* causing leaf spot of cotton in China". *Plant Disease*. 96(9):1379-1379.

PUBLICACIONES REALIZADAS

Durante el transcurso de la Tesis Doctoral se realizaron las siguientes publicaciones en revistas con referato:

- **First report of *Potato Virus Y* in ornamental *Calibrachoa* in Argentina.**
Tombion L, Alderete M, Perez de La Torre M, Agrofoglio YC, Delfosse VC, Distefano AJ, Soto MS. (2019). *Plant Disease*. 103(7):1799.
[//doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1673-PDN](https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1673-PDN).
- **Protocolo de regeneración de *Calibrachoa* var. Pampa Salmón INTA a partir de meristemas apicales.**
Tombion L, Kato A, Soto, MS. *Chilean journal of agricultural and animal science*. 36(2):121-128.
<https://www.scielo.cl/pdf/chjaasc/v36n2/0719-3890-chjaasc-chjaas36-10el30010.pdf>

ANEXO

CAPÍTULO II

- **Resultado test de ELISA de tipo indirecto para el diagnóstico de *Potyvirus* en *Calibrachoa* INTA:**

	1	2	3	4	5	6
A	0.02	0.025	2.38	2.59	2.98	2,64
B	2,43	2,2	2,15	2,23	2,62	2,9
C	1.98	2.19	1.08	1.27	2.67	2.67
D	1,91	1,98	2,1	2,33	2,11	2,5
E	2,46	2,3	0,68	1,25	1,47	1,98
F	1.99	1.93	1,87	1,88	1,92	1,18
G	1,56	1,37	2.32	2.55	1.95	1.84

Los números en azul indican el valor del blanco de reactivos, en negro el promedio de los controles negativos y en verde los controles positivos. Los datos en color lila indican los valores de absorbancia a 405 nm de las 10 muestras de *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA analizadas por duplicado, mientras que los de color rojo indican los valores de absorbancia a 405 nm de las 9 muestras de *Calibrachoa* cv. Overá Fucsia INTA analizadas por duplicado.

Desvío estándar (SD)= 0,00707107.

- **Secuencia de bases obtenida del extremo 3' de PVY:**

PVY clon 10 T7

```
CAGATTGATATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGA
GGCAGTGC GGAATGCATACGACATTGGGGAGACAGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTT
GGTGCATAGAAAATGGAACCTCGCCAAATATCAACGGAGTATGGGTAATGATGGATGGACAAGATCA
GGTTGAATACCCACTCAAGCCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCCTTAGGCAAATCATGGCACATTT
CTCAGATGTCGCAGAAGCGTATATTGAAATGCGCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGGTATGGTT
TAATTAGAAAATTTACGTGATATAAGTTTGGCTCGCTATGCCTTCGACTTCTATGAGGTACATCACGTAC
ACCGACTAGGGCCAGAGAAGCGCACATTCAAATGAAAGCAGCGGCCCTTAAGTCAGCCCAATCGCGCC
TTTTCGGATTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAAAACACAGAGAGACACACCACCGAGGATGTT
TCCCCGAATATGCATACTCTGCTTGGGGTCAAGAACATGTGATTGTAGTGTCTTCCGGACGATATATA
AATATTTATGTATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATGGCGACTAGTAATCGGTTTTA
ATTTCTACACTTAGTAGGGGTGATGTGGCGATTCCGTCGTCATAGTGACCTTACTAGCTGTAAGTGCATT
ACTTAGTTTTATATAAAAGTGCCCGTTGTTGTCGTTGTGGCTAATGTATCGATTGGGTGATGTTGCGAT
TCCGTCGTAGCAGTACTATGTCTGCATTTAGTTACTTGGGTGGTGCATGATTTTCGTCATGGCAGTGA
CCGTAGATTTCAATCAGGAGACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

PVY cl 10 Sp6

GNNSGQPSTVVDNSLMVVLAMHYALIKENVDFDAIESVCKFFVNGDILLIAINPEKEHILDNMAHHFSDLG
 LNYDFSSRTRNKEELWFMSHRGLLIDGLYIPKLEQERIVSILQWDRADLPEHRLEAICAAMIESWGYTELTHQ
 IRKFYSWLLEQQPFATLAQEGKAPYIANMALRRLYTNRMVDEEELEAFIKMMVALDDDIECDSCVHHQAN
 DTIDAGESGKKDEKPAQGIVXPNSNKSCKDKDVNAGTSGTHTVPRIKAITSKMRMPKSKGAAVLNLDHLLYET
 PQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVRNAYDIGETEMPTVMNGLMVVCIENGTSPNINGVWVMMMDGQDQ
 VEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDISLARYAFDFYEVTSRTPTRAR
 EAHIQMKAALKSAQSRLFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPNMHTLLGVKNM*

Diseño de cebadores (*primers*)

Par de *primers*

Left primer (*forward 1*):

Secuencia: ATACCCACTCAAGCCAATCG

Start: 426 Length: 20 bp Tm: 60.0 °C GC: 50.0 % ANY: 2.0 SELF: 2.0

Right primer (*reverse 1*):

Secuencia: ACATGTTCTTGACCCCAAGC

Start: 802 Length: 20 bp Tm: 60.0 °C GC: 50.0 % ANY: 6.0 SELF: 2.0

Ta: 55 C

Tamaño producto: 377 pb

CAPÍTULO III

- Resultados test de ELISA de tipo indirecto para los cruzamientos realizados durante el verano:

0	0,024	0,021	-0,016	-0,015	-0,016	-0,018	-0,018	-0,018	-0,016
-0,017	-0,015	-0,011	-0,016	-0,012	-0,017	-0,016	-0,012	-0,012	-0,015
-0,02	-0,015	-0,013	-0,013	-0,011	-0,009	-0,013	-0,021	-0,011	-0,012
-0,02	-0,014	-0,011	-0,011	-0,012	-0,009	-0,014	-0,011	-0,01	-0,015
-0,012	-0,007	-0,004	-0,001	0,007	-0,008	-0,003	-0,007	-0,008	-0,012
-0,009	-0,01	-0,005	0,004	-0,008	-0,007	-0,003	-0,006	1,302	1,358

Los números en rojo indican el valor del blanco de reactivos, en azul los controles negativos y en verde los controles positivos.

Desvío estándar (SD)= 0,00212132

Promedio controles negativos= 0,045

Valor de corte= 0,045 + 2 x 0,0021= **0,049**

- Resultados test de ELISA de tipo indirecto para los cruzamientos realizados durante el otoño:

0,106	0,001	0,012	0,002	0,003	0,004	0,003	0,002	0,001	0,002
0,001	0,004	0,003	0,006	0,003	0,004	0,014	0,019	0,002	0,001
0,004	0,003	0,004	0,002	0	0,002	0,001	0,003	0,001	0,004
0,001	0	0,001	0,002	0,003	0,001	0,004	0,002	0,003	0,002
0,012	0,007	0,004	0,004	0,007	0,002	0,003	0,001	0,002	0,002
0,003	0,002	0,003	0,001	0,003	0,004	0,003	0,001	1,324	0,69

Los números en rojo indican el valor del blanco de reactivos, en azul los controles negativos y en verde los controles positivos.

Desvío estándar (SD)= 0,00777817

Promedio controles negativos= 0,0065

Valor de corte= 0,0065 + 2 x 0,0078 = **0,022**

- **Resultados test de ELISA de tipo indirecto para los cruzamientos realizados durante la primavera:**

0,096	0,006	0,008	0,005	0,002	0,004	0,005	0,005	-0,002	-0,016
-0,002	-0,001	-0,001	-0,005	-0,004	-0,001	0,001	-0,004	-0,008	-0,001
-0,005	0,004	-0,001	-0,005	-0,003	-0,003	-0,002	-0,003	0,002	-0,004
0,002	0	0,003	0,009	0,003	0,001	-0,008	-0,006	0,002	0,001
0,007	-0,01	0	-0,01	0,002	-0,002	-0,003	-0,004	-0,005	-0,003
0,003	0,001	0	-0,001	0,004	0,001	-0,003	-0,002	1,377	1,209

Los números en rojo indican el valor del blanco de reactivos, en azul los controles negativos y en verde los controles positivos.

Desvío estándar (SD)= 0,00141421

Promedio controles negativos= 0,007

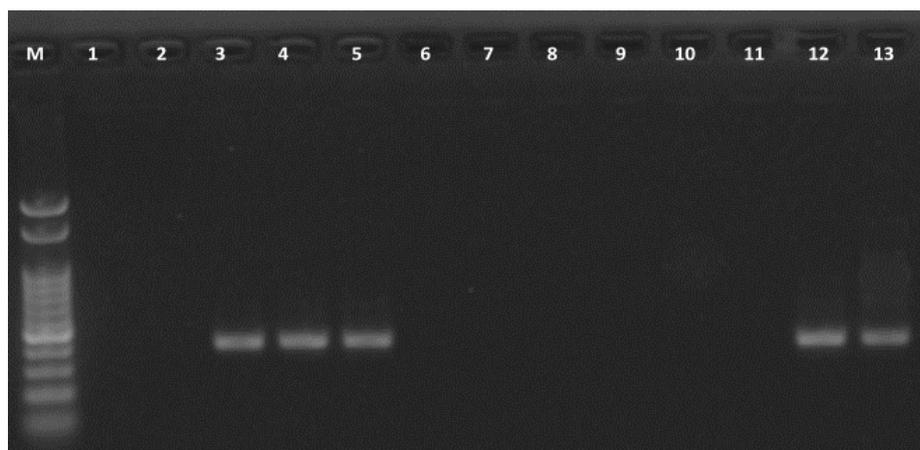
Valor de corte= 0,007 + 2 x 0,0014= **0,0098**

- **Datos para el análisis estadístico:**

Estación del año	Cruzamiento	Nº semillas	Nº plantas	Detección de PVY
Verano	MadreV x PadreV	11	7	0
Verano	MadreV x PadreV	12	8	0
Verano	MadreV x PadreV	14	9	2
Verano	MadreV x PadreV	0	0	0
Verano	MadreV x PadreV	0	0	0
Verano	MadreV x PadreSV	0	0	0
Verano	MadreV x PadreSV	18	9	1
Verano	MadreV x PadreSV	11	8	2
Verano	MadreV x PadreSV	9	7	0
Verano	MadreV x PadreSV	22	18	0
Verano	MadreSV x PadreV	30	6	1
Verano	MadreSV x PadreV	0	0	0
Verano	MadreSV x PadreV	20	10	0
Verano	MadreSV x PadreV	19	13	0
Verano	MadreSV x PadreV	26	11	0
Verano	MadreSV x PadreSV	43	34	0
Verano	MadreSV x PadreSV	35	6	0
Verano	MadreSV x PadreSV	0	0	0
Verano	MadreSV x PadreSV	0	0	0
Verano	MadreSV x PadreSV	0	0	0
Otoño	MadreV x PadreV	5	0	0
Otoño	MadreV x PadreV	12	1	0
Otoño	MadreV x PadreV	10	0	0
Otoño	MadreV x PadreV	5	0	0
Otoño	MadreV x PadreV	0	0	0
Otoño	MadreV x PadreSV	10	5	1
Otoño	MadreV x PadreSV	10	5	0
Otoño	MadreV x PadreSV	7	0	0
Otoño	MadreV x PadreSV	0	0	0
Otoño	MadreV x PadreSV	8	0	0
Otoño	MadreSV x PadreV	32	9	2
Otoño	MadreSV x PadreV	43	15	3
Otoño	MadreSV x PadreV	25	5	0
Otoño	MadreSV x PadreV	25	5	0
Otoño	MadreSV x PadreV	0	0	0
Otoño	MadreSV x PadreSV	28	16	0
Otoño	MadreSV x PadreSV	27	32	0
Otoño	MadreSV x PadreSV	30	11	0
Otoño	MadreSV x PadreSV	28	10	0
Otoño	MadreSV x PadreSV	30	9	0
Primavera	MadreV x PadreV	2	2	0
Primavera	MadreV x PadreV	15	1	0
Primavera	MadreV x PadreV	22	1	0
Primavera	MadreV x PadreV	10	0	0
Primavera	MadreV x PadreV	15	1	0
Primavera	MadreV x PadreSV	18	9	3
Primavera	MadreV x PadreSV	6	2	2
Primavera	MadreV x PadreSV	7	0	0
Primavera	MadreV x PadreSV	10	1	0
Primavera	MadreV x PadreSV	15	0	0
Primavera	MadreSV x PadreV	30	7	2
Primavera	MadreSV x PadreV	38	6	1
Primavera	MadreSV x PadreV	20	2	0
Primavera	MadreSV x PadreV	0	0	0
Primavera	MadreSV x PadreV	14	0	0
Primavera	MadreSV x PadreSV	10	5	0
Primavera	MadreSV x PadreSV	21	9	0
Primavera	MadreSV x PadreSV	19	5	0
Primavera	MadreSV x PadreSV	11	5	0
Primavera	MadreSV x PadreSV	9	0	0

- **Análisis de geles de agarosa de los cruzamientos realizados**

- Análisis de *pooles* de plantas (**verano**):

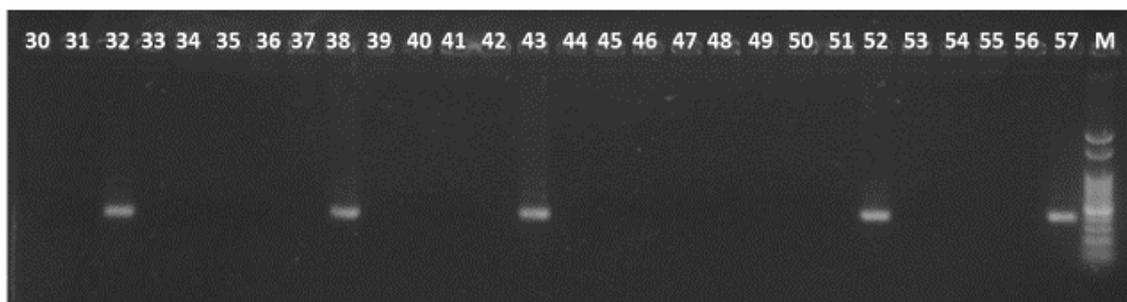


Perfil de amplificación de ADNc de PVY. M: marcador de peso molecular 100 pb (Ladder PBL-Productos Bio-lógicos ®); línea 1: control negativo de la PCR (reactivos sin ADN); línea 2: control negativo de la RT-PCR (reactivos sin ARN); línea 3: *pool* cruzamiento nº1; línea 4: *pool* cruzamiento nº2; línea 5: *pool* cruzamiento nº2; línea 6: *pool* cruzamiento nº2; línea 7: *pool* cruzamiento nº3; línea 8: *pool* cruzamiento nº3; línea 9: *pool* cruzamiento nº4; línea 10: *pool* cruzamiento nº4; línea 11: *pool* cruzamiento nº4; línea 12: *pool* cruzamiento nº3; línea 13: control positivo (*Calibrachoa* cv. Pampa salmón INTA infectada con PVY)

- Análisis individual de plantas:

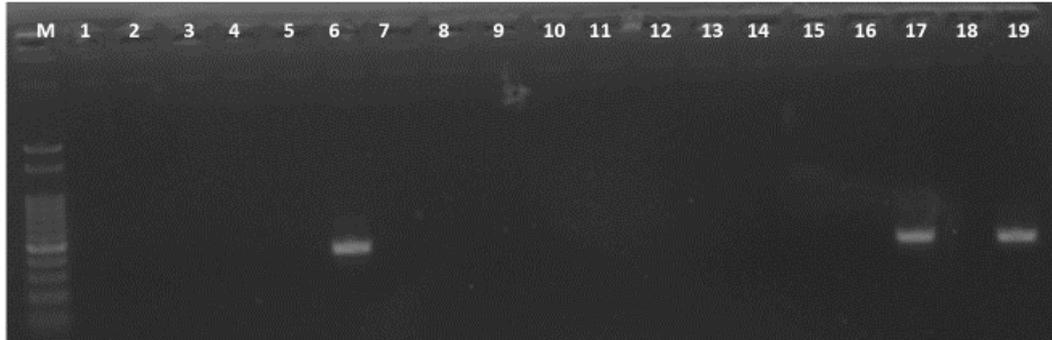


Perfil de amplificación de ADNc de PVY. M: marcador de peso molecular 100 pb (Ladder PBL-Productos Bio-lógicos ®); línea 1 a 25: plantas individuales del cruzamiento nº1; líneas 26 a 29: plantas individuales del cruzamiento nº2

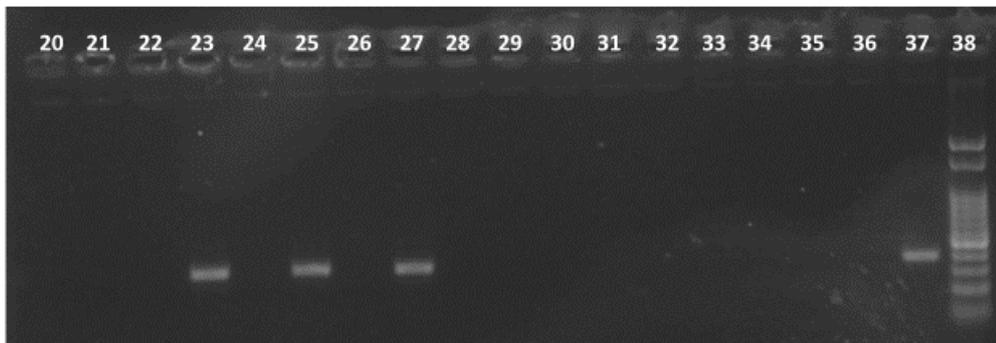


Perfil de amplificación de ADNc de PVY. Línea 30 a 49: plantas individuales del cruzamiento 2; línea 50 a 55: plantas individuales del cruzamiento n°3; línea 56: control negativo (reactivos de la PCR sin ADN); línea 57: control positivo (*Calibrachoa* cv. Pampa salmón INTA infectada con PVY); M: marcador de peso molecular 100 pb (Ladder PBL-Productos Bio-lógicos ®)

- Análisis individual de plantas (**otoño**):

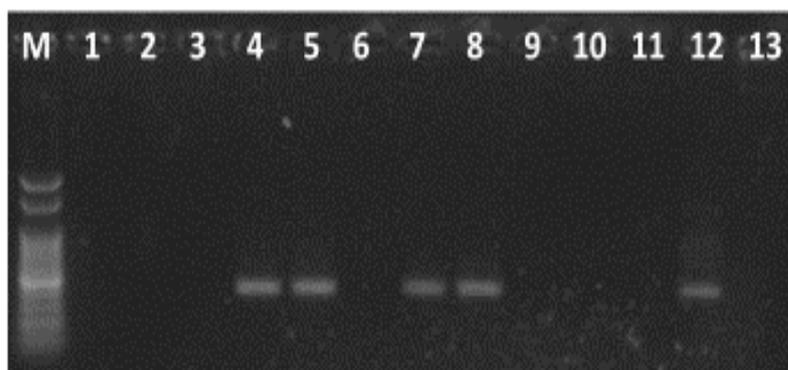


Perfil de amplificación de ADNc de PVY. M: marcador de peso molecular 100 pb (Ladder PBL-Productos Bio-lógicos ®); línea 1 a 10: plantas individuales del cruzamiento n°2; línea 11 a 19: plantas individuales del cruzamiento n°3



Perfil de amplificación de ADNc de PVY. Línea 20 a 34: plantas individuales del cruzamiento n°3; línea 35: control negativo de la RT-PCR (reactivos sin ARN); línea 36: control negativo de la PCR (reactivos sin ADN); línea 37: control positivo (*Calibrachoa* cv. Pampa salmón INTA infectada con PVY); línea 38: marcador de peso molecular 100 pb (Ladder PBL-Productos Bio-lógicos ®)

- Análisis de pools de plantas (**primavera**):



Perfil de amplificación de ADNc de PVY. M: marcador de peso molecular 100 pb (Ladder PBL-Productos Bio-lógicos ®); línea 1 y 2: pool de cruzamiento n°1; línea 3: pool de cruzamiento n°3; línea 4 y 5: pool de cruzamiento n° 2; línea 6: pool de cruzamiento n°3; línea 7 y 8: pool de cruzamiento n°3; línea 9 y 10: pool de cruzamiento n°4; línea 11: control negativo de la RT-PCR (reactivos sin ARN); línea 12: control positivo (*Calibrachoa* cv. Pampa salmón INTA infectada con PVY); línea 13: control negativo de la PCR (reactivos sin ADN)

- Análisis individual de plantas:



Perfil de amplificación de ADNc de PVY. M: marcador de peso molecular 100 pb (Ladder PBL-Productos Bio-lógicos ®); línea 1 a 9: plantas individuales del cruzamiento n°2; línea 10 a16: plantas individuales del cruzamiento n°3; línea 17: planta individual cruzamiento n°2; línea 18 a 23: plantas individuales cruzamiento n°3; línea 24: planta individual cruzamiento n°2; línea 25: control negativo de la RT-PCR (reactivos sin ARN); línea 26: control negativo de la PCR (reactivos sin ADN); línea 27: control positivo (*Calibrachoa* cv. Pampa salmón INTA infectada con PVY)

CAPÍTULO IV

- **Resultado prueba de ELISA de tipo indirecto para el diagnóstico de *Potyvirus* en plantas de *Quenopodium quinoa*, *Calibrachoa* cv. Pampa Salmón INTA y *C. cv. Overá Fucsia* INTA:**

	1	2	3	4	5	6
A	0.000	0.013	1,706	1,646	1,556	1,508
B	1,323	1,542	1,150	1,290	0,991	0,945

Los números en azul indican el valor del blanco de reactivos, en negro el promedio de los controles negativos y en verde los controles positivos. Los datos en color lila indican los valores de absorbancia a 405 nm de las muestras de hojas de *pooles* de plantas *Q. quinoa*, por duplicado. Los datos en color anaranjado indican los valores de absorbancia de *C. cv Pampa Salmón INTA*, mientras que los de color rosado los de *C. cv. Overá Fucsia INTA*.

Desvío estándar (SD)= 0,0028.

- **Resultado prueba de ELISA de tipo indirecto para el diagnóstico de *Potyvirus* en plantas de *C. caesia*, *C. thymifolia*, *C. linoides*, *P. inflata* y *P. integrifolia*:**

	1	2	3	4	5	6
A	0.050	0.069	3,513	3,416	3,342	3,518
B	3,514	3,513	3,539	3,538	3,097	3,161
C	3,036	3,212	3,245	3,245	3,380	3,230
D	2,457	2,384	2,786	2,238	2,489	2,728
E	2,241	2,235	2,995	2,965	0,740	0,773
F	1,900	1,780	1,123	1,150	2,015	2,130
G	1,726	1,770	1,800	1,815	3,546	3,556

Los números en azul indican el valor del blanco de reactivos, en negro el promedio de los controles negativos y en verde los controles positivos. Los datos en color lila indican los valores de absorbancia a 405 nm de las muestras de hojas de *pooles* de plantas de *Calibrachoa caesia*, por duplicado. Los datos de color rojo indican los valores de absorbancia de *C. thymifolia*, los de color marrón indican los valores de *C. linoides*, los de color celeste los de *Petunia inflata* y los de color rosado los de *P. integrifolia*.

Desvío estándar (SD)= 0,004.

CAPÍTULO V

ANÁLISIS DE NORMALIDAD. PRUEBA DE SHAPIRO-WILKS

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (una cola)
RDUO_Planta completa	208	0,00	0,02	0,71	<0,0001
RDUO_Callo	208	0,00	0,02	0,91	<0,0001
RDUO_Hiperhidricidad	208	0,00	0,02	0,73	<0,0001
RDUO_Mortandad	208	0,00	0,02	0,76	<0,0001

→ Como $p < 0.05$ (0.0001) se rechaza la H_0 de normalidad de varianzas y se afirma con 95 % de confianza que existen diferencias entre las varianzas de los grupos.

ANÁLISIS DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS. PRUEBA DE LEVENE

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Planta completa	208	0,65	0,63	109,95

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,02	12	2,0E-03	30,15	<0,0001
Tratamiento	0,02	12	2,0E-03	30,15	<0,0001
Error	0,01	195	6,6E-05		
Total	0,04	207			

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Callo	208	0,56	0,53	65,39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,03	12	2,3E-03	20,63	<0,0001
Tratamiento	0,03	12	2,3E-03	20,63	<0,0001
Error	0,02	195	1,1E-04		
Total	0,05	207			

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Hiperhidricidad	208	0,64	0,62	108,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,02	12	2,0E-03	28,86	<0,0001
Tratamiento	0,02	12	2,0E-03	28,86	<0,0001
Error	0,01	195	7,0E-05		
Total	0,04	207			

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Mortandad	208	0,51	0,48	90,13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,02	12	2,1E-03	16,90	<0,0001
Tratamiento	0,02	12	2,1E-03	16,90	<0,0001
Error	0,02	195	1,2E-04		
Total	0,05	207			

- Como $p < 0.05$ (0.0001) se rechaza la H_0 de igualdad de varianzas y se afirma con 95 % de confianza que existen diferencias entre las varianzas de los grupos para todas las variables de análisis (callo, planta completa, hiperhidricidad y mortandad).

Al no cumplirse la normalidad ni la homogeneidad de varianzas se debe realizar la prueba de distribución Chi cuadrado:

1. Cálculo del estadístico H (valor que es aproximadamente el valor de F)

$$H = SC \text{ Variable} / CM \text{ Total}$$

CM Total = SC Total / gl Total

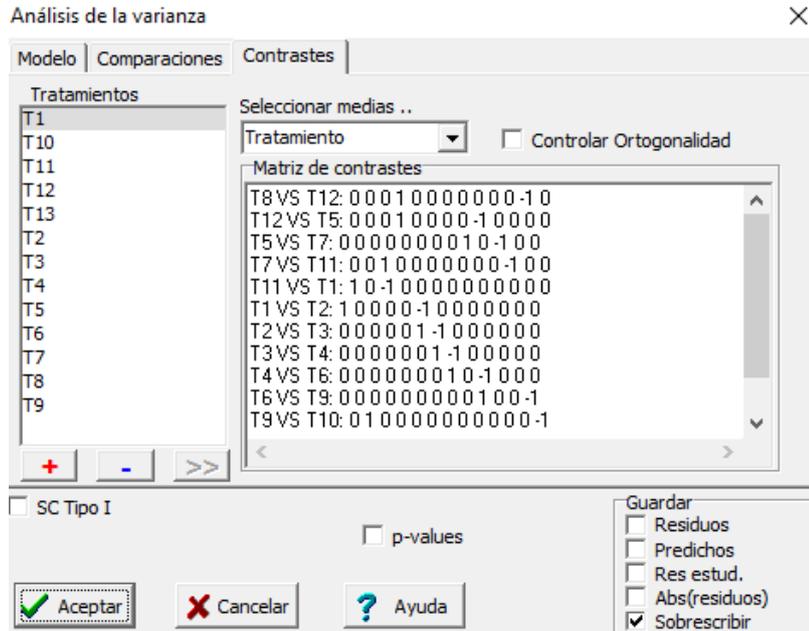
- Planta completa
CM total = $0.04/207 = 1.93 \times 10^{-4}$
 $H = 0.02/1.93 \times 10^{-4} = \underline{103.5}$
- Callo
CM total = $0.05/207 = 2.42 \times 10^{-4}$
 $H = 0.03/2.42 \times 10^{-4} = \underline{124.2}$
- Hiperhidricidad
CM total = $0.04/207 = 1.93 \times 10^{-4}$
 $H = 0.02/1.93 \times 10^{-4} = \underline{103.5}$
- Mortandad
CM total = $0.05/207 = 2.42 \times 10^{-4}$
 $H = 0.02/2.42 \times 10^{-4} = \underline{82.3}$

2. Cálculo de probabilidades "Chi²"

- Planta completa
 $X > x = 0$
- Callo
 $X > x = 0$
- Hiperhidricidad
 $X > x = 0$
- Mortandad
 $X > x = 0$

Como en todos los casos el valor de la probabilidad $X > x$ fue de 0, se puede decir que existen diferencias significativas entre los tratamientos, ya que 0 es $< 0,005$. Por lo tanto, estas diferencias entre las medias se deben realizar mediante el uso de contrastes.

3. Cálculo de contrastes



Luego se analizan los resultados arrojados por el programa:

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Regeneración	13	1,00	sd	0,00

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,6E-03	12	1,3E-04	sd	sd
Tratamiento	1,6E-03	12	1,3E-04	sd	sd
Error	0,00	0	0,00		
Total	1,6E-03	12			

Tratamiento	SC	gl	CM	F	p-valor
T8 VS T12	1,8E-04	1	1,8E-04	sd	sd
T12 VS T5	3,2E-05	1	3,2E-05	sd	sd
T5 VS T7	8,0E-06	1	8,0E-06	sd	sd
T7 VS T11	8,0E-06	1	8,0E-06	sd	sd
T11 VS T1	8,0E-06	1	8,0E-06	sd	sd
T1 VS T2	0,00	1	0,00	sd	sd
T2 VS T3	0,00	1	0,00	sd	sd
T3 VS T4	0,00	1	0,00	sd	sd
T4 VS T6	0,00	1	0,00	sd	sd
T6 VS T9	0,00	1	0,00	sd	sd
T9 VS T10	0,00	1	0,00	sd	sd
T10 VS T13	0,00	1	0,00	sd	sd
T13 VS T8	7,6E-04	1	7,6E-04	sd	sd
Total	1,6E-03	12	1,3E-04	sd	sd

T8 vs T11	6,1E-04	1	6,1E-04	sd	sd
T8 Vs T 12	1,8E-04	1	1,8E-04	sd	sd
T8 vs T1	7,6E-04	1	7,6E-04	sd	sd
Total	1,6E-03	12	1,3E-04	sd	sd

Seguidamente se debe realizar un cálculo a partir de estos datos para poner a prueba la hipótesis de comparación de medias:

$$\text{Valor } x = \text{CM contraste} / \text{CMT}$$

$$\text{CM Total} = \text{SC Total} / \text{gl Total}$$

$$\text{CM TOTAL} = 1.6 \text{ E-3} / 12 = \underline{1.33 \text{ E-4}}$$

- T8 versus T12:

$$X = 1.8e4 / 1.33e-4 = \mathbf{1.35}$$

- T12 versus T5:

$$X = 3.2e-5 / 1.33e-4 = \mathbf{0.24}$$

-t5 vs t7: 0.06

- T11 versus T1:

$$X = 8e-6 / 1.33e-4 = \mathbf{0.06}$$

T1 vs t2: 0

- T2 versus T3:

$$X = 0 / 1.33e-4 = \mathbf{0}$$

T3 vs t4: 0

- T4 versus T6:

$$X = 0 / 1.33e-4 = \mathbf{0}$$

T6 vs t9: 0

- T9 versus T10:

$$X = 0 / 1.33e-4 = \mathbf{0}$$

T10 vs t13= 0

T13 vs T8: **5.71**

T8 vs T11: 4.57

T8 vs T12: 1.35

T8 vs t1: 5.71

T8 vs T5: **2.71**

T8 vs t7: **3.6**

→ Como el valor de X de T13 vs T8 es superior a 3.84 (valor estandarizado de X de chi-cuadrado), se puede decir que existen cifras significativas entre T8 y los demás tratamientos.

4. Cálculo de probabilidades "Chi²"

Con el valor de X obtenido en el paso anterior se debe calcular el valor del Chi² mediante el programa

- T8 versus T12:

$$\mathbf{X > x = 0.25}$$

- T12 vs T5= **0.62**

- T5 versus T7

$$\mathbf{X > x = 0.81}$$

- T11 versus T1

$$\mathbf{X > x = 0.81}$$

- T2 versus T3

$$\mathbf{X > x = 1}$$

- T4 versus T6:

$$\mathbf{X > x = 1}$$

- T9 versus T10:

$$\mathbf{X > x = 1}$$

- T13 vs T8:

$$X > x = \underline{\mathbf{0.017}}$$

- T8 vs T11: **0.03**

- T8 vs T12: **0.25**

- T8 vs t1: **0.017**

T8 vs T5: **0.1**

- T8 vs t7: **0.06**

→ Finalmente, se concluye que existen diferencias significativas entre todos los tratamientos y T8, ya que este arrojó un valor de $p < \alpha$.

A continuación, se sigue con las variables callo, hiperhidricidad y mortandad:

Callo

InfoStat/L - Datos Cali Pampa Para estadística - [Resultados]

Archivo Edición Datos Resultados Estadísticas Gráficos Ventanas Ayuda Aplicaciones

CALLO 13 1,00 sd 0,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-Valor
Modelo	2,9E-03	12	2,4E-04	sd	sd
Tratamiento	2,9E-03	12	2,4E-04	sd	sd
Error	0,00	0	0,00		
Total	2,9E-03	12			

Contrastes

Tratamiento	SC	gl	CM	F	p-Valor
Svs6	0,0E-06	1	8,0E-06	sd	sd
Gv3	2,0E-04	1	2,0E-04	sd	sd
Sva1	1,8E-05	1	1,8E-05	sd	sd
Lvs9	7,2E-05	1	7,2E-05	sd	sd
Svs9	1,1E-03	1	1,1E-03	sd	sd
Sv8	1,1E-03	1	1,1E-03	sd	sd
Total	1,6E-03	5	3,3E-04	sd	sd

Coefficientes de los contrastes

Tratamiento	Cont.1	Cont.2	Cont.3	Cont.4	Cont.5	Cont.6
T1	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00
T10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T3	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T5	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00
T6	-1,00	-1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T8	0,00	0,00	-1,00	0,00	0,00	0,00
T9	0,00	0,00	0,00	-1,00	-1,00	-1,00

$$\text{Valor } x = \text{CM contraste} / \text{CMT}$$

$$\text{CM Total} = \text{SC Total} / \text{gl Total}$$

$$\text{CM TOTAL} = 2.9 \text{ E-3} / 12 = \underline{2.42\text{E-4}}$$

- T5 versus T6:

$$X = 8\text{e-6} / 2.42\text{e-4} = 0.033$$

- T3 versus T7:

$$X = 0 / 2.42\text{e-4} = 0$$

- T2 versus T8:

$$X = 2\text{e-6} / 2.42\text{e-4} = 8.28\text{e-3}$$

- T1 versus T13:

$$X = 0 / 2.42\text{e-4} = 0$$

- T4 versus T9:

$$X = 3.2\text{e-5} / 2.42\text{e-4} = 0.13$$

- T10 versus T11:

$$X = 0 / 2.42\text{e-4} = 0$$

Cálculo de probabilidades "Chi²"

- T5 versus T6

$$X > x = 0.86$$

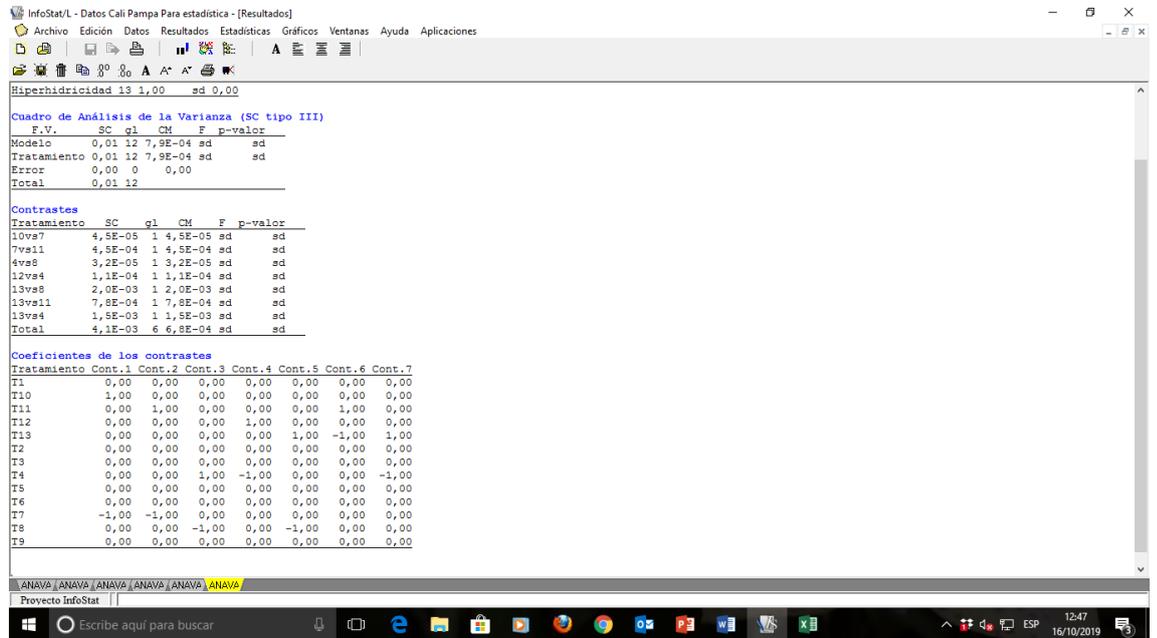
- T3 versus T7

$$X > x = 1$$

- T2 versus T8

- **X>x= 0.93**
- T1 versus T13
- **X>x= 1**
- T4 versus T9:
- **X>x= 0.72**
- T10 versus T11:
- **X>x= 1**

Hiperhidricidad



$$\text{Valor } x = \text{CM contraste} / \text{CMT}$$

CM Total = SC Total/gl Total

$$\text{CM Total} = 0,01 / 12 = \underline{8,33e-4}$$

T13 vs T2: 1.56E-4

T3 VS T9: 0

T10 VS T7: 0.05

T11 VS T12: 0

T4 VS T6: 0

T1 VS T5: 0

Cálculo de probabilidades "Chi²"

T13 vs T2: **0.99**

T3 VS T9: **1**

T10 VS T7: **0.82**

T11 VS T12: **1**

T4 VS T6: **1**

T1 VS T5: **1**

Mortandad

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Mortandad	13	1,00		sd 0,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,3E-03	12	1,1E-04	sd	sd
Tratamiento	1,3E-03	12	1,1E-04	sd	sd
Error	0,00	0	0,00		
Total	1,3E-03	12			

Contrastes

Tratamiento	SC	gl	CM	F	p-valor
T5 versus T12	3,2E-05	1	3,2E-05	sd	sd
T7 versus T3	1,3E-05	1	1,3E-05	sd	sd
T9 versus T4	8,0E-06	1	8,0E-06	sd	sd
T8 versus T11	0,00	1	0,00	sd	sd
T1 versus T2	0,00	1	0,00	sd	sd
T6 versus T10	0,00	1	0,00	sd	sd
Total	5,3E-05	6	8,8E-06	sd	sd

Cálculo de X

Valor x = CM contraste/CMT

CM Total = SC Total/gl Total = 1,08e-4

T5 VS T12: 0.3
T7 VS T3: 0.12
T9 VS T4: 0.07
T8 VS T11: 0
T1 VS T2: 0
T6 VS T10: 0

Cálculo de probabilidades "Chi²"

T5 VS T12: **0.58**
T7 VS T3: **0.73**
T9 VS T4: **0.79**
T8 VS T11: 1
T1 VS T2: 1
T6 VS T10: 1

CAPÍTULO VI

- **Datos para el análisis estadístico de la Escala de Williams:**

Planta <i>P. integrifolia</i> nº	Número de hojas totales	Número de hojas con síntomas	Categoría (escala de Williams, 1977)
1	110	45	5
2	150	26	3
3	140	36	5
4	143	46	5
5	100	32	5
6	70	7	3

7	100	18	3
8	130	27	3
9	140	57	5
10	109	20	3
11	200	18	3
12	129	32	3
13	138	60	5
14	105	50	5
15	92	36	5

Análisis de la varianza

Variable N R² R² Aj CV
 Escala de Williams 30 0,89 0,89 35,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	124,03	1	124,03	232,56	<0,0001
Planta	124,03	1	124,03	232,56	<0,0001
Error	14,93	28	0,53		
Total	138,97	29			

- **Datos para el análisis estadístico de área de mancha foliar (cm²):**

Planta	Área de mancha (cm ²)
P. integrifolia	0,5
P. integrifolia	0,5
P. integrifolia	1
P. integrifolia	2
P. integrifolia	0,28
P. integrifolia	1,5
P. integrifolia	2
P. integrifolia	0,5
P. integrifolia	0,12
P. integrifolia	0,21
P. integrifolia	0,5
P. integrifolia	0,5
P. integrifolia	1,5
P. integrifolia	1
P. integrifolia	0,35
P. integrifolia	0,3
P. integrifolia	0,75
P. integrifolia	1
P. integrifolia	0,25
P. integrifolia	1
P. integrifolia	0,35

