

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BEGOMOVIRUS
EN CULTIVOS DE POROTO (*Phaseolus vulgaris* L.), AJUSTE DE
MARCADORES MOLECULARES PARA LA BÚSQUEDA DE
RESISTENCIA Y EVALUACIÓN FENOTÍPICA**

por

Ing. Agr. Pablo Gastón Reyna

**Directora: Ing. Agr. (Dra.) Patricia Rodríguez Pardina
Directora Asociada: Lic. (Dra.) María Marcela Manifesto**

**Instituto de Patología Vegetal - Unidad de Fitopatología y Modelización Agrícola –
Centro de Investigaciones Agropecuarias - INTA**



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

Córdoba, Argentina

2022

COMISIÓN ASESORA

Dra. Patricia Rodríguez Pardina, Instituto de Patología Vegetal - Unidad de Fitopatología y Modelización Agrícola - Centro de Investigaciones Agropecuarias - INTA

Dra. Marianela Soledad Rodríguez, Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales - Unidad de Estudios Agropecuarios - Centro de Investigaciones Agropecuarias - INTA

Dr. Fabián José Giolitti (en reemplazo del Dr. Daniel Adrián Ducasse), Instituto de Patología Vegetal - Unidad de Fitopatología y Modelización Agrícola - Centro de Investigaciones Agropecuarias - INTA

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

A mi esposa Lourdes,
A mi papá y mamá,
A mis hermanos,
A mi Renatito,
A los amigos que coseché.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Patricia Rodríguez Pardina, por brindarme la oportunidad de ingresar y acompañarme en el camino de la carrera del doctorado; por su enseñanza, por su tiempo y recursos apostados en mí.

A mi directora de beca, la Dra. Irma Graciela Laguna, a mi co-directora de beca y tesis María Marcela Manifesto, a Marianela Rodríguez, Fabián Giolitti y Daniel Ducasse que formaron parte de mi comisión asesora.

A las autoridades del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), el director Mario Alejandro Rago y director del Instituto de Patología Vegetal (IPAVE) Alejandro Giayetto, por darme el permiso para el uso de las instalaciones, equipos, vehículos e infraestructura del CIAP, y poder moverme libremente en este ámbito.

Al Estado, por brindarle a muchos jóvenes y a mí, la posibilidad de acceder a una beca del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a los recursos y espacios brindados por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), que me permitieron realizar este trabajo de investigación, capacitarme y crecer profesionalmente.

A la Universidad Nacional de Córdoba (UNC) y Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales (FCEFyN), por aportar todo lo necesario para el desarrollo de mi profesión y realización de esta carrera de posgrado.

A mis amigos del CIAP, con los que compartí momentos inolvidables. Hermosos almuerzos, “after offices”, viajes, fútbol y muchas cosas más. Fueron pilares fundamentales en la concreción de este doctorado. Voy a estar eternamente agradecido por haberlos cruzado en mi camino y formar tan hermoso vínculo de amistad.

A mi amada Lourdes, por creer siempre en mí, por apoyarme y aconsejarme en mis malos momentos, y por alentarme a cumplir mis sueños.

A la lucha y esfuerzo continuo de mi papá Antonio, que me dio su todo para crecer y formarme, y a sus tan valiosos ejemplos de trabajo, responsabilidad y dedicación. A la

dulzura y calidez de mi mamá Noemí, que siempre se ocupó de mí y mis hermanos para que aprovecháramos nuestro tiempo al máximo.

A todos aquellos que fui encontrando en este camino y colaboraron, de una u otra manera, para que este trabajo fuera posible.

A todos ellos, muchas gracias!

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

*En revistas científicas:

Reyna, P. G., Bejerman, N., Laguna, I. G., Rodríguez Pardina, P. (2021). Biological and molecular characterization of bean bushy stunt virus, a novel bipartite begomovirus infecting common bean in northwestern Argentina. Arch Virol 166, 1409–1414. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05002-4>

*En congresos:

Pablo Reyna, Irma G. Laguna, Patricia Rodríguez Pardina (2017). Survey of begomoviruses in bean crops of the northwest region of Argentina during 2014-2016 growing seasons. 12° Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão – CONAFE, Piracicaba – Brasil.

Reyna, P.G., Bejerman, N., Laguna, I. G., Rodríguez Pardina, P. (2021). Detección de begomovirus en malezas y reporte de una infección mixta entre euphorbia yellow mosaic virus y una nueva especie en *Euphorbia heterophylla* L. recolectada en cercanías a cultivos de poroto del NOA. 5° Congreso Argentino de Fitopatología-Modalidad virtual. ISBN 978-987-24373-3-6

Reyna, P. G., Rodríguez Pardina, P., Luna, D., Rodríguez, M. S. (2021). Efectos fisiológicos causados por el nuevo begomovirus bean bushy stunt virus detectado en el norte de Argentina en plantas de poroto y soja. 5° Congreso Argentino de Fitopatología-Modalidad virtual. ISBN 978-987-24373-3-6

Reyna P., Suarez, F., Balzarini, M., Rodríguez Pardina, P. (2021). Incidencia de begomovirus en relación al clima en cultivos de soja y poroto del norte argentino. 5° Congreso Argentino de Fitopatología-Modalidad virtual. ISBN 978-987-24373-3-6

Suarez Franco, Franca Giannini Kurina, Cecilia Bruno, Patricia Rodríguez Pardina, María de la Paz Giménez, **Pablo Gastón Reyna**, Karina Torrico y Monica Balzarini (2021). Métodos de selección de predictores para la construcción de modelos de riesgo de enfermedad en cultivos a partir de variables climáticas. 50° Jornadas Argentinas de Informática, Congreso Argentino de Agroinformática. ISSN: 2525-0949

*En simposios:

Reyna, P., Bejerman, N., Laguna I. G., Rodríguez Pardina, P. (2019). Characterization of a new bipartite begomovirus infecting bean in northwestern (NW) Argentina. 9th International Geminivirus Symposium and 7th International ssDNA Comparative Virology Workshop, University of California - Davis - Estados Unidos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	1
RESUMEN	3
SUMMARY	5
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	7
1. Introducción	8
1.1 El poroto común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y su importancia.....	8
1.2 El cultivo de poroto	10
1.3 Sanidad del poroto.....	10
1.4 Geminivirus.....	12
1.5 Begomovirus	13
1.5.1 Características genómicas de los begomovirus	14
1.5.2 Evolución de los begomovirus.....	16
1.5.3 Demarcación de especies y nomenclatura de begomovirus.....	17
1.5.4 Pérdidas ocasionadas por begomovirus	18
1.5.5 Begomovirus: ambiente e insecto vector	19
1.5.6 Manejo agronómico de begomovirus	21
1.6 Resistencia genética frente a begomovirus	23
1.7 Comportamiento sanitario de cultivares de poroto en Argentina.....	24
1.8 Hipótesis.....	26
1.9 Objetivos generales	26
1.10 Objetivos específicos.....	26
CAPÍTULO 2: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BEGOMOVIRUS EN CULTIVOS DE POROTO Y MALEZAS ALEDAÑAS DEL NOA	28
2.1 Introducción	29
2.2 Objetivos	31

2.3 Materiales y métodos	31
2.3.1 Presencia de begomovirus en Argentina.....	31
2.3.2 Caracterización molecular de nuevos begomovirus	34
2.3.3 Caracterización biológica de nuevos begomovirus.....	37
2.3.3.1 Ajustes de inoculación por biobalística	37
2.3.3.2 Rango de hospedantes.....	38
2.4 Resultados	40
2.4.1 Presencia de begomovirus en Argentina.....	40
2.4.2 Caracterización molecular de nuevos begomovirus	45
2.4.3 Caracterización biológica de nuevos begomovirus.....	59
2.4.3.1 Ajustes de inoculación por biobalística	59
2.4.3.2 Rango de hospedantes.....	60
2.5 Discusión.....	64
2.6 Conclusión.....	67
CAPÍTULO 3: MODELADO DE INCIDENCIA DE BEGOMOVIRUS EN EL NOA A TRAVÉS DE VARIABLES BIOMETEOROLÓGICAS	68
3.1 Introducción	69
3.2 Objetivos	70
3.3 Materiales y métodos	70
3.4 Resultados	72
3.5 Discusión.....	75
3.6 Conclusión.....	77
CAPÍTULO 4: EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE CULTIVARES COMERCIALES DE POROTO FRENTE A INFECCIONES DE BBSV	78
4.1 Introducción	79
4.2 Objetivos	80
4.3 Materiales y métodos	80
4.3.1 Preparación de plántulas	80

4.3.2 Inoculación y mantenimiento de plantas	80
4.3.3 Variables y parámetros registrados y evaluados.....	81
4.4 Resultados	83
4.4.1 Eficiencia de inoculación (%).....	83
4.4.2 Correlación síntoma-infección viral	83
4.4.3 Parámetros fisiológicos: altura, número de hojas y área foliar	88
4.4.4 Parámetros fisiológicos: contenido y fluorescencia de clorofila	92
4.4.5 Parámetros fisiológicos: rendimiento	95
4.5 Discusión.....	96
4.6 Conclusión.....	98
CAPÍTULO 5: USO DE MARCADORES MOLECULARES EN BÚSQUEDA DE RESISTENCIA GENÉTICA A BEGOMOVIRUS	99
5.1 Introducción	100
5.2 Objetivos	102
5.3 Materiales y métodos	103
5.3.1 Selección de marcadores moleculares	103
5.3.2 Ajuste de marcadores moleculares del tipo SCAR: SR2 y SW12 ₇₀₀	106
5.3.3 Ajuste de marcadores moleculares del tipo SNP	106
5.3.3.1 Ajustes del marcador SNP: CB_00434 (<i>bgm-1</i>).....	107
5.3.3.2 Ajuste de marcadores moleculares del tipo SNP: CB_475, S04_2531038, S1137_407 y S08_9202267	107
5.3.4 Validación del marcador CB_475 en muestras de campo	112
5.3.5 Evaluación de proyección de uso de marcadores ajustados hacia la resistencia de otros begomovirus: el caso BBSV	112
5.4 Resultados	113
5.4.1 Ajuste de los marcadores moleculares SCAR: SR2 y SW12 ₇₀₀	113
5.4.2 Ajuste del marcador SNP: CB_00434 (<i>bgm-1</i>)	113

5.4.3 Ajuste de los marcadores moleculares del tipo SNP: CB_475, S04_2531038 (BGY4.1), S1137_407 (BGY7.1) y S08_9202267 (BGY8.1).....	120
5.4.4 Validación del marcador CB_475 en muestras de campo	126
5.4.5 Evaluación de proyección de uso de marcadores ajustados hacia la resistencia a otros begomovirus: el caso BBSV	126
5.5 Discusión.....	129
5.6 Conclusión.....	133
6. CONSIDERACIONES FINALES	134
7. BIBLIOGRAFÍA.....	138

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<: menor

>: mayor

aa: aminoácido

ANOVA: del inglés, analysis of variance; análisis de la varianza

CIAT: Centro Internacional de Agricultura Tropical

CTAB: del inglés, cetyltrimethylammonium bromide; cetiltrimetilamonio bromuro

cv.: cultivar

dcDNA: del inglés, double strain deoxyribonucleic acid; ácido desoxirribonucleico de doble cadena

DNA: del inglés, deoxyribonucleic acid; ácido desoxirribonucleico

ELISA: del inglés, enzyme-linked immunosorbent assay; ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FAO: del inglés, Food and Agriculture Organization of the United Nations; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

hab: habitante

Hr: humedad relativa

ICTV: del inglés, International Committee on Taxonomy of Viruses; Comité Internacional de Taxonomía de Virus

ID: identificación

kb: kilobase

LB: del inglés lysogeny broth; caldo de lisogenia (medio útil para el crecimiento bacteriano)

M: masa molar

MAGyP: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca

MHyFP: Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas

m s.n.m: metros sobre el nivel del mar

NOA: noroeste argentino

nt: nucleótido

NW: del inglés, new world; nuevo mundo

ORF: del inglés, open reading frame; marco abierto de lectura

OW: del inglés, old world; viejo mundo

PCR: del inglés, polymerase chain reaction; reacción en cadena de la polimerasa

psi: del inglés, pound per square inch o pound-force per square; libra por pulgada cuadrada (unidad de medida de presión)

pv: patovar

qPCR: del inglés, quantitative polymerase chain reaction; reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa

QTL: del inglés, quantitative trait locus; locus de caracteres cuantitativos

R: entorno y lenguaje de programación estadística

RCA: del inglés, rolling circle amplification; amplificación por círculo rodante

RNA: del inglés, ribonucleic acid; ácido ribonucleico

sp: especie

spp: especies

ssDNA: del inglés, single strain deoxyribonucleic acid; ácido desoxirribonucleico de simple cadena

TAE: tris acetato EDTA, solución de uso corriente en electroforesis

TBE: tris borato EDTA, solución de uso corriente en electroforesis

U: unidad

VA, va: virus ausente

VP, vp: virus presente

RESUMEN

Dentro del conjunto de legumbres secas, el poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) constituye un cultivo relevante que es producido en áreas tropicales y subtropicales del mundo. En Argentina, bajo condiciones de secano y en forma extensiva, es cultivado en la región noroeste. Existen diversos factores que afectan la estabilidad de su producción, entre ellos se destacan las enfermedades virales ocasionadas por begomovirus.

Los objetivos del presente trabajo fueron: (i) Detectar la presencia de begomovirus en lotes de producción de poroto y en malezas aledañas en Argentina, (ii) Identificar y caracterizar nuevas especies, (iii) Determinar su probabilidad de incidencia a través de variables biometeorológicas, (iv) Evaluar el comportamiento de cultivares de poroto frente a sus infecciones y (v) Analizar una selección de germoplasma a través del ajuste de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia a estos patógenos.

Los resultados obtenidos revelaron la presencia de begomovirus, en 181 muestras de 570 recolectadas durante los años 2016, 2017 y 2018. Se reportó la presencia de euphorbia yellow mosaic virus y secuencias parciales de pepper blistering leaf virus infectando la maleza *Euphorbia heterophylla* L. en coinfección con el componente DNA-A de una nueva especie de nombre propuesto “euphorbia severe leaf golden mosaic virus (EuSLGMV)”. Además, se reportó otro nuevo begomovirus, infectando poroto, denominado “bean bushy stunt virus (BBSV)”.

Se logró modelar la probabilidad de incidencia de begomovirus con una eficiencia predictiva del 82%, determinando a las temperaturas máximas invernales, la humedad relativa y las precipitaciones pre-siembra como las variables más explicativas en este modelo.

La evaluación y observación de las respuestas de tres cultivares de poroto (Alubia selección Cerrillos, Leales CR5 y NAG12 INTA) y uno de soja (Jack) frente a infecciones por BBSV, fue posible gracias al ajuste de un sistema de inoculación por biobalística. Se observó una marcada susceptibilidad en el cultivar Alubia caracterizada por una fuerte reducción de la altura, número de hojas y área foliar, y la no producción de granos. Los cultivares Leales CR5 y NAG12, aun expresando ese tipo de alteraciones, aunque menos severas que en el cultivar Alubia, tuvieron la capacidad de producir granos comportándose de manera más tolerante. En cuanto a soja, se determinó experimentalmente como un hospedero alternativo de BBSV.

Finalmente, el uso del marcador molecular SNP CB_475, asociado al gen de resistencia *bgm-1*, permite inferir que la selección de germoplasma y muestras de campo analizadas se asocian a patrones de susceptibilidad. Por otro lado, el marcador BGY7.1, asociado a un QTL que actúa de manera aditiva, no determinó resistencia (o su aumento) en los cultivares evaluados, pero sí podría estar diferenciando materiales de distintos acervos génicos.

SUMMARY

Within the dry legumes, the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) constitutes a relevant crop which is produced in tropical and subtropical areas of the world. In Argentina, is cultivated under dry and extensive conditions in the northwestern region. There are several factors that affect the stability of its production, among them are viral diseases caused by begomoviruses.

The objectives of this work were: (i) To detect the presence of begomoviruses in bean production fields and neighboring weeds in Argentina, (ii) To identify and characterize new begomovirus species, (iii) To determine their probability of incidence through biometeorological variables, (iv) To evaluate the behavior of common bean cultivars against begomovirus infections and (v) To evaluate a selection of germplasm through the adjustment of molecular markers linked to resistance genes to these pathogens.

The results obtained revealed the presence of begomovirus, in 181 samples out of 570 collected during years 2016, 2017 and 2018. The weed *Euphorbia heterophylla* L, was found to be co-infected with euphorbia yellow mosaic virus and a new begomovirus species for which the name “euphorbia severe leaf golden mosaic (EuSLGMV)” is proposed; in addition partial sequences of pepper blistering leaf were also found in the same weed sample. Another new begomovirus was also reported, infecting common beans, for which the name "bean bushy stunt virus (BBSV)" is proposed.

A predictive model, with an efficiency of 82%, was obtained for begomovirus incidence, determining maximum winter temperatures, relative humidity and pre-sowing rainfall as the most explanatory variables.

The response of three common bean cultivars (Alubia selección Cerrillos, Leales CR5 and NAG12 INTA) and one soybean cultivar (Jack) to begomovirus infection was possible thanks to the adjustment of a bioballistics inoculation system. A high level of susceptibility was observed in Alubia cultivar characterized by a severe height reduction, decrease in number of leaves and leaf area, and no grain production. Leales CR5 and NAG12 cultivars behaved as more tolerant than Alubia, as they developed milder symptoms and had higher grain production. On the other hand, soybean was found to be an alternative host of BBSV in controlled assays.

Finally, a group of selected germplasm and field samples was tested with the molecular marker SNP CB_475, associated with the resistance gene *bgm-1*, and the

results showed that all the analyzed samples are associated with susceptibility patterns, whereas the marker BGY7.1, associated with a QTL that acts additively, did not determine resistance (or its increase) in the evaluated cultivars, but it could be differentiating materials from different gene pools.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Introducción

1.1 El poroto común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su importancia

Las legumbres son un importante componente de los sistemas agrícolas de producción, principalmente en los países en vías de desarrollo (Ojiewo et al., 2019). Dentro de ellas, se encuentra al poroto común (*Phaseolus vulgaris* L.), leguminosa anual herbácea perteneciente a la familia de las fabáceas. Se trata de la segunda legumbre cultivada más importante después de la soja, y su grano un alimento esencial para el consumo humano directo (Castro-Guerrero et al., 2016; Lobaton et al., 2018; Varela et al., 2018).

Según la FAO, la producción mundial de porotos se encuentra próxima a los 30 millones de toneladas anuales (FAO, 2022). En un análisis por continente, el 50% de los porotos se producen en Asia, el 25% en África y el 23.5% en América (60% en América del Sur). El restante 1.5% es producido entre Oceanía y Europa. A nivel país, Myanmar, India, Brasil y China producen el 60% del total mundial. Mientras que los dos primeros producen el 40% del total, Brasil y China poseen una participación similar cercana al 10%. Luego le siguen numerosos países africanos, Estados Unidos y México con una producción aproximada del 3%, y Argentina con el 2% (Figura 1) (FAO, 2022).

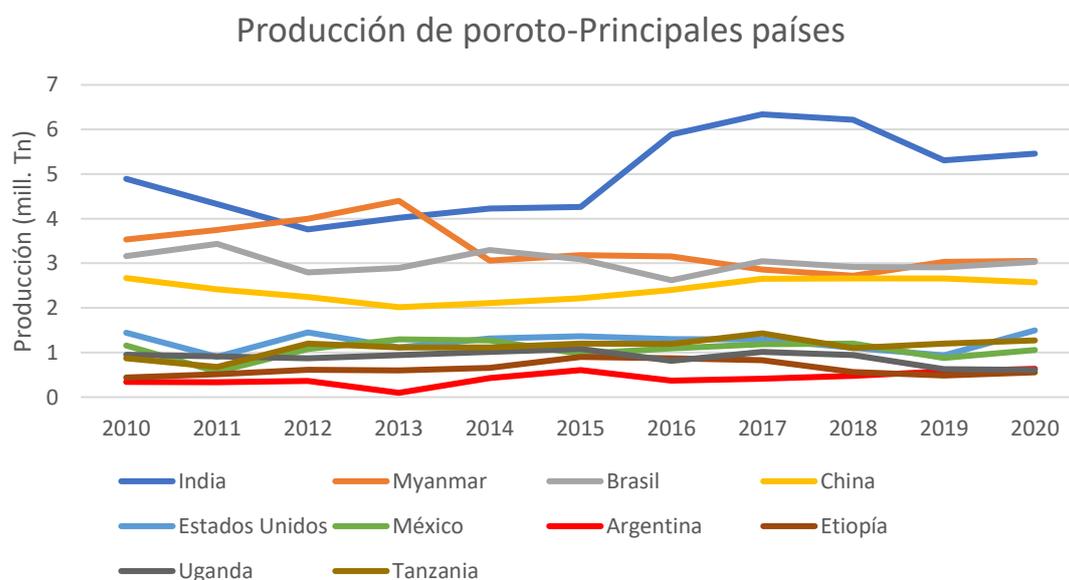


Figura 1. Producción de poroto de los principales países desde el año 2010 al 2020, según datos consultados en la FAO. Gráfico de elaboración propia.

Los países líderes en producción son también aquellos que poseen los mercados consumidores más importantes. En Argentina, sin embargo, el consumo interno de legumbres, estimado en no más de 250-300 g/hab/año, es marginal respecto a los niveles consumidos en el mundo (6 kg/hab/año) (Calzada & Treboux, 2019). Por este motivo, aproximadamente el 95% de la producción nacional de porotos se destina a exportación. De hecho, Argentina se encuentra entre los cinco principales países exportadores. Entre los destinos más importantes de las exportaciones argentinas, se encuentra, para poroto negro, Brasil acaparando el 36% del mercado, seguido por países centroamericanos; y para poroto blanco, países de la costa mediterránea (Argelia, España, Italia, Turquía, entre otros).

En Argentina, con un rendimiento promedio de 1-1.5 t/ha, el poroto es producido actualmente en una superficie cercana a las 500.000 ha (MAGyP, 2021) en una región que abarca desde el límite con Bolivia hasta el norte de la provincia de Córdoba. La producción se concentra, principalmente, en la provincia de Salta (77%) y, en menor medida, en Santiago del Estero (12%), Jujuy (6%) y Tucumán (3%). Córdoba y Catamarca participan en una proporción aún menor que el resto de las provincias (2%) (Figura 2) (Maggio, 2021; MHyFP, 2016).

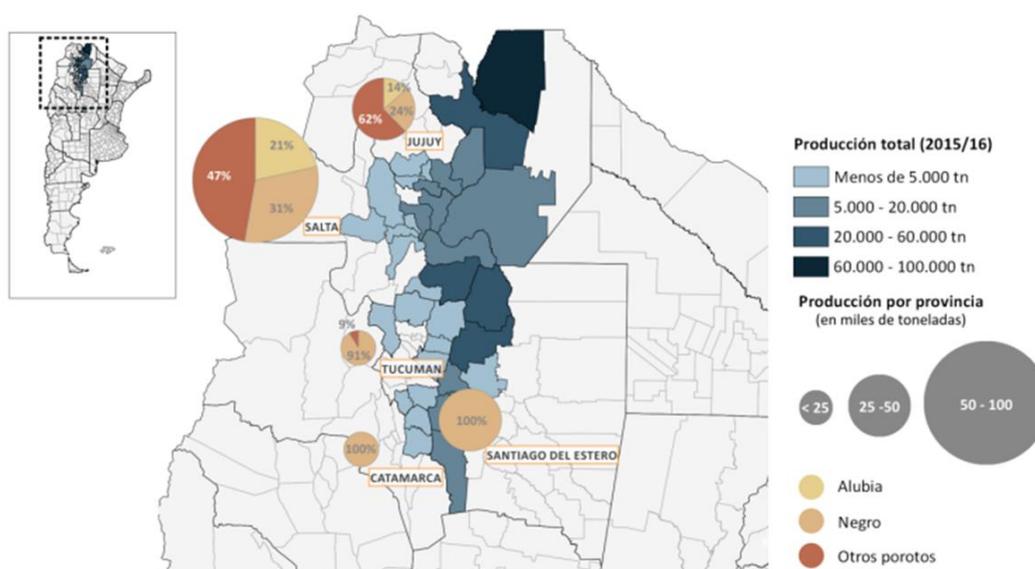


Figura 2. Distribución provincial de producción de poroto. Se incluyen los tipos comerciales (alubia, negro y otros), y los volúmenes producidos. Fuente: Ministerio de Agroindustria (MHyFP, 2016).

1.2 El cultivo de poroto

Las condiciones deseables para el cultivo del poroto deben considerar una serie de factores y características particulares. Es una especie termófila indiferente al fotoperiodo, de ciclo estival, sensible a heladas, y que presenta un ciclo de germinación a madurez fisiológica de 90 a 110 días (Maggio, 2021). Exige para un normal y adecuado crecimiento y desarrollo, un rango de temperaturas medias mensuales de 16 a 25 °C, siendo la mínima y máxima media mensual óptima de 10 °C y 28 °C respectivamente. Temperaturas extremas durante las etapas de floración y llenado de granos son uno de los factores más importantes que influyen negativamente en la formación de frutos. Temperaturas por encima de 35 °C y por debajo de 10 °C generan aborto de flores y vainas, disminución en la producción de flores y problemas de fecundación. También pueden dificultar la germinación y emergencia. La amplitud térmica diaria también posee efectos negativos sobre el cultivo; temperaturas nocturnas mayores a 19 °C afectan el desarrollo de flores y formación de vainas (Abán, 2019).

Por otro lado, el poroto posee un desarrollo radicular limitado que disminuye su capacidad competitiva frente a malezas y exige suelos bien drenados y no compactados. No tolera suelos salinos, adaptándose de mejor manera a suelos moderadamente ácidos (pH 5.5-7.2) (Tejerina, 2021). El requerimiento óptimo de agua durante el ciclo del cultivo oscila entre 350 a 500 mm, distribuidos uniformemente (Calderoni & Campi, 2021). La deficiencia hídrica es perjudicial principalmente en las fases de germinación, floración y llenado de granos (Abán, 2019).

1.3 Sanidad del poroto

El cultivo de poroto es susceptible al ataque de numerosas plagas, malezas y enfermedades, y debido a su ciclo relativamente corto, requiere de mucha atención y cuidado. Las plagas animales incluyen insectos, ácaros, nematodos y moluscos, pero son reducidos los organismos que ocasionan pérdidas importantes. El corto ciclo del cultivo evita que ciertas plagas lleguen a establecerse en poblaciones económicamente peligrosas (De Simone & Failde de Calvo, 2002; Reginatto, 2018).

Las enfermedades son causadas por hongos, bacterias y/o virus, que generan grandes pérdidas económicas por disminución de la cantidad y calidad de los granos cosechados, y por los costos elevados de producción destinados a agroquímicos o semillas más costosas por su resistencia a agentes patógenos.

Algunas enfermedades pueden agruparse de acuerdo a los momentos fenológicos del cultivo en el que es más susceptible para sus ocurrencias (Figura 3). Así, por ejemplo, en primeros estadios (germinación e implantación del cultivo), los hongos de suelo son los principales agentes patógenos que pueden ocasionar podredumbres de semillas, de raíces y plántulas. Entre ellos se menciona a *Rhizoctonia solani* y *Fusarium spp.*, causantes de podredumbres radiculares, y a *Phytophthora spp.* causante de podredumbre húmeda o “damping-off” (Casalderrey, 2018; Maggio, 2021).

En estados vegetativos más avanzados, las enfermedades prevalentes son originadas por hongos afines a la infección de tallos y tejido foliar. Aquí se encuentra a Mustia Hilachosa (*Thanatephorus cucumeris*), Antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) y a Mancha Angular (*Phaeoisariopsis griseola*), entre otras. También tienen incidencia en estados vegetativos más avanzados y reproductivos otros agentes patogénicos como la Roya (*Uromyces appendiculatus*), Macrophomina (*Macrophomina phaseolina*) y Sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*), entre otras (Casalderrey, 2018; Maggio, 2021; Mamaní Gonzáles et al., 2017).

Entre las enfermedades originadas por bacterias se puede mencionar la causada por el complejo compuesto por los agentes: *Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli* y *Pseudomonas syringae pv. syringae*, donde las enfermedades responden individualmente a los nombres Bacteriosis común y Halo bacteriano, respectivamente (Casalderrey, 2018; Espeche, Tarulli, & Devani, 2021). Las mismas pueden encontrarse desde estadios vegetativos tempranos.

Por otro lado, se encuentra a las virosis. Entre ellas se destacan las originadas por los virus bean common mosaic virus (BCMV), alfalfa mosaic virus (AMV), cucumber mosaic virus (CMV), bean yellow mosaic virus (BYMV) y cowpea mild mottle virus (CpMMV). Pero sin lugar a dudas las enfermedades generadas por infecciones de begomovirus constituyen las principales limitantes sanitarias para este cultivo en Argentina (Maggio, 2021; Rodríguez Pardina, 2020).

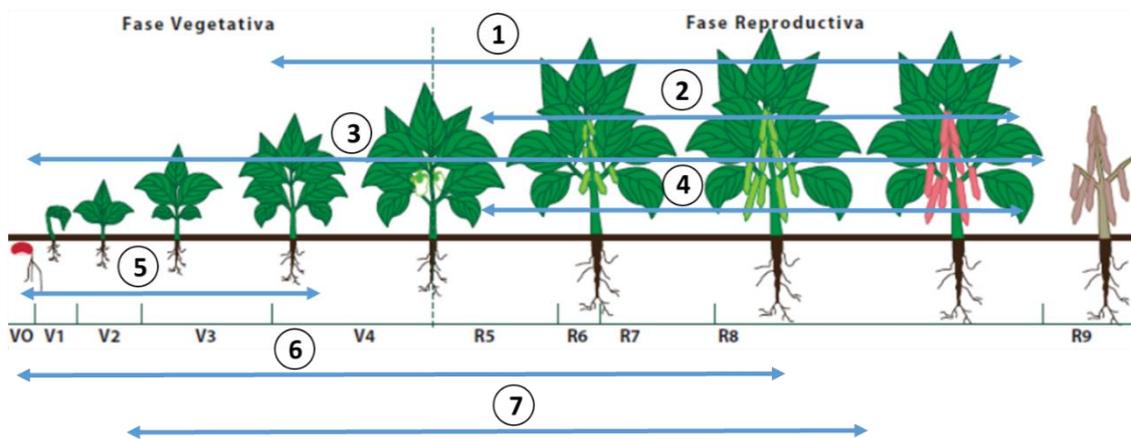


Figura 3. Estados fenológicos del poroto y momentos de mayor susceptibilidad para la ocurrencia de enfermedades. En 1: Mustia hilachosa, Mancha angular y Antracnosis; 2: Roya, Macrophomina, Alternaria, Diaporthe, Cercospora, Oídio, Sclerotinia; 3: Bacteriosis; 4: Sclerotinia; 5: *Rhizoctonia sp.*, *Fusarium spp* y *Phytophthora spp.*; 6: Virosis: AMV, CMV, BCMV, BYMV, CpMMV; 7: Geminivirus (begomovirus).

1.4 Geminivirus

En Argentina la primera epifitía ocasionada por geminivirus, se observó en la década del '70 y fue consecuencia de la expansión de la soja y del algodón (Morales & Anderson, 2001). Desde entonces, es común observar la presencia de geminivirus, en cultivos de poroto y en malezas aledañas.

Actualmente la familia *Geminiviridae*, de acuerdo al rango de hospedantes, insecto vector, organización del genoma e identidad de nucleótidos, se encuentra constituida por 14 géneros: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Citlodavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grabovirus*, *Maldovirus*, *Mastrevirus*, *Mulcrilevirus*, *Opunvirus*, *Topilevirus*, *Topocuvirus* y *Turncurtovirus* (Fiallo-Olivé et al., 2021). Los integrantes de esta familia están generalmente confinados a las células del floema, se caracterizan por poseer partículas geminadas bisegmentadas isocaédricas de alrededor de 20 a 38 nm de diámetro (Figura 4), y un genoma constituido por DNA circular de cadena simple (ssDNA). El genoma de los geminivirus puede ser monopartito, con una simple molécula de DNA de ~ 2.600-3.600 nt, o bipartito, con dos moléculas de DNA (llamadas DNA-A y DNA-B), con un tamaño total de ~5.200 nt (Zerbini et al., 2017).

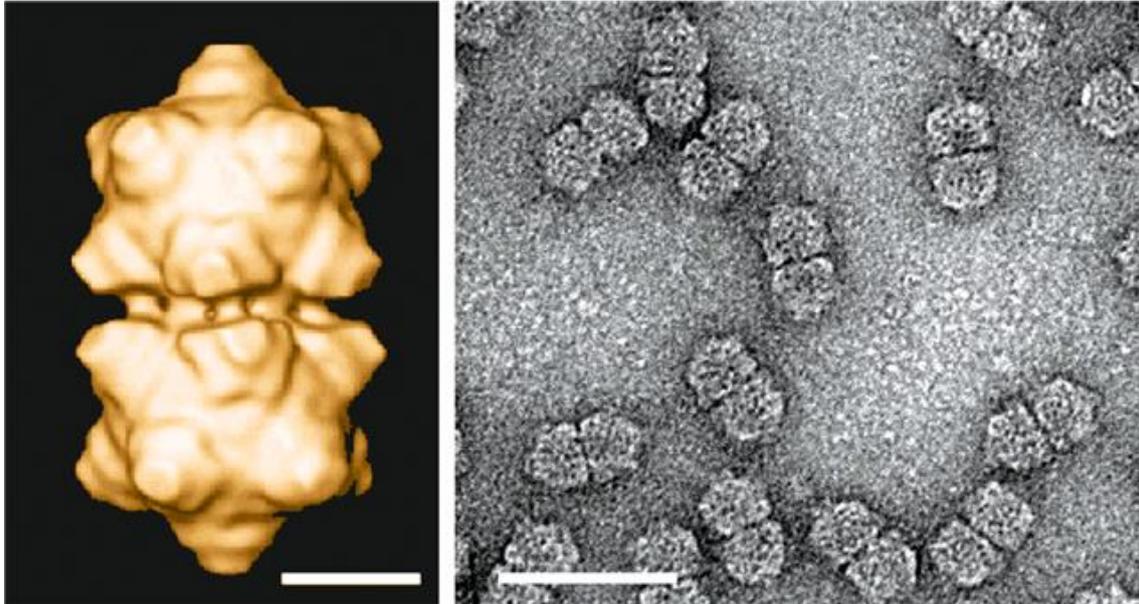


Figura 4. Partículas geminadas isocaédricas característica de los geminivirus. (Izquierda) Reconstrucción de microscopio crio-electrónico de maize streak virus (MSV). La barra representa 10 nm. (Derecha) Purificación de partículas de MSV teñidas con acetato de uracilo mostrando las típicas subunidades geminadas cuasi-isométricas. La barra representa 50 nm. Ambas figuras fueron tomadas de Zangh et al., 2001.

En la naturaleza, los geminivirus son transmitidos por insectos que se alimentan del floema, incluyendo a varias especies de cicadélidos, membrácidos, áfidos y moscas blancas de la especie *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Inoue-Nagata, Lima, & Gilbertson, 2016; Varsani et al., 2017; Zerbini et al., 2017). No obstante, no son transmitidos a través de semillas, mientras que muchos otros son injerto-transmisibles y algunos mecánicamente transmisibles. Las plantas infectadas con geminivirus muestran un amplio rango de síntomas incluyendo atrofia, crecimiento distorsionado, estriado y rayado clorótico de hojas en plantas monocotiledóneas; y hojas arrugadas, ampolladas, distorsionadas, mosaico/moteado verde-amarillo, clorosis internerval, manchas cloróticas, engrosamiento de nervaduras, amarillamiento y enanismo en dicotiledóneas (Inoue-Nagata et al., 2016).

1.5 Begomovirus

El género *Begomovirus* es el más importante de la familia *Geminiviridae* en cuanto a número de especies. Aquí están incluidos algunos de los virus más importantes de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En Argentina, hasta el presente, se han identificado y caracterizado siete begomovirus en cultivos de poroto: bean golden

mosaic virus (BGMV); bean dwarf mosaic virus (BDMV); tomato yellow spot virus (ToYSV); soybean blistering mosaic virus (SbBMV); tomato mottle wrinkle virus (ToMoWV); tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) y sida golden mosaic Brazil virus (SiGMBRV) (Inoue-Nagata et al., 2016; Rodríguez-Pardina et al., 2011; Rodríguez-Pardina et al., 2006; Varela et al., 2018; Vizgarra et al., 2006; Worrall et al., 2015).

Los begomovirus comparten las características de la familia, son afines a las células floemáticas de plantas dicotiledóneas y son transmitidos, de manera persistente circulativa, por un complejo de especies crípticas de moscas blancas de la especie *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Islam et al., 2018; Navas-Castillo et al., Fiallo-Olivé, 2011; Polston & Capobianco, 2013).

1.5.1 Características genómicas de los begomovirus

Los begomovirus pueden ser subdivididos en dos grupos: bipartitos o monopartitos. Los primeros poseen un genoma compuesto por dos componentes de aproximadamente 2.6 kb cada uno (denominados DNA-A y DNA-B), que prevalecen en el Nuevo Mundo (NW) (sur de los Estados Unidos, México, el Caribe, Centro y Sudamérica); y los monopartitos, que poseen un genoma compuesto de un solo DNA genómico de 2.9 kb aproximadamente, que prevalecen en el Viejo Mundo (OW) (Europa, África, Asia y Australia). Frecuentemente, los begomovirus monopartitos están asociados con moléculas circulares simples de DNA de la mitad del tamaño del DNA-A (Zhou, 2013) denominados alfa (α), beta (β) y delta (δ) satélites. Los β -satélites son esenciales para la inducción de los síntomas típicos de enfermedad, participan en la supresión del silenciamiento génico transcripcional y postranscripcional, y pueden afectar a los genes sensibles al ácido jasmónico involucrados en la defensa de los hospedantes. Los α -satélites no tienen contribuciones conocidas a la patogenia aunque se han reportado casos de menor virulencia en su presencia al regular los niveles de los β -satélites (Idris et al., 2011; Leke et al., 2013; Zhou, 2013). Por otro lado los δ -satélites poseen un tamaño de aproximadamente un cuarto del genoma de los begomovirus son no codificantes y reducen la acumulación de partículas virales en begomovirus bipartitos (Lozano et al., 2016).

Los dos componentes, denominados DNA-A y DNA-B poseen secuencias que codifican diferentes proteínas, tanto en la cadena viral como en la complementaria. Hay seis genes que están presentes en todos los begomovirus: el DNA-A contiene un gen en la cadena viral (AV1) y tres o cuatro en la cadena complementaria (AC1, AC2, AC3 y

AC4), mientras que el componente B posee dos genes, uno en la cadena viral (BV1) y otro en la complementaria (BC1) (Varsani et al., 2017) (Figura 5).

El gen AC1, codifica una proteína esencial: la proteína Rep (*Replication Associated Protein*) encargada de dirigir el complejo enzimático de duplicación hacia el origen de replicación en la molécula de DNA (Kittelman et al., 2009); separar la doble cadena y cortarla para iniciar la multiplicación por el mecanismo del círculo rodante (Bernardi & Timchenko, 2008); separar el genoma reproducido en monómeros circulares de cierta longitud para la producción de progenie de viriones y suprimir la expresión de su propio promotor (Sunter et al., 1993).

El gen AC2, codifica para la proteína activadora transcripcional TRAP (*Transcriptional Activator Protein*), necesaria para la expresión de los genes AV1 y BV1 (Lazarowitz & Shepherd, 1992; Sunter & Bisaro, 1992).

El gen AC3, por medio de la proteína REN (*Replication Enhancer Protein*), incrementa la eficiencia de la reproducción (Orozco et al., 1997) y actúa como un factor accesorio que promueve la acumulación del DNA viral. El gen AC4 no tiene efectos detectables sobre la multiplicación, pero actúa en la supresión del silenciamiento génico postranscripcional (Hanley-Bowdoin et al., 1999; Vanitharani et al., 2004).

El gen AV1 codifica para la proteína de cubierta (CP), la cual forma las partículas geminadas típicas de estos virus. Además se encuentra relacionada con la especificidad del insecto vector y es la más conservada dentro de los begomovirus (Cantú-Iris et al., 2019).

El DNA-B codifica para las funciones asociadas con el movimiento viral (Fondong, 2013). El gen BC1 codifica la proteína de movimiento (*Movement protein-Mp*), relacionada con el movimiento del virus de célula a célula a través de plasmodesmos, el transporte intercelular selectivo del dsDNA, el rango de hospedantes y el desarrollo de síntomas. El gen BV1 codifica la proteína transportadora (*Nuclear shuttle protein-Nsp*), que se relaciona con el tipo de hospedante y con el movimiento hacia afuera del núcleo, pues potencia la salida de los dsDNA y ssDNA a través de la membrana nuclear hacia el citoplasma y hacia las células adyacentes del floema (Fondong, 2013; Nawaz-ul-Rehman & Fauquet, 2009).

En resumen, los dos componentes son completamente diferentes, pero necesarios en conjunto para que una infección sea exitosa. El DNA-A contiene toda la información que se requiere para la replicación y formación de la cápside del virus, mientras que el componente B, codifica para las proteínas involucradas en el movimiento viral de célula

a célula, en el rango de hospederos y en el desarrollo de los síntomas en la planta (Garrido-Ramirez, Sudarshana, & Gilbertson, 2000; J. C. F. Silva et al., 2017).

Entre los codones de iniciación AV1 y AC1, y BV1 y BC1 de los componentes A y B respectivamente, existe una región intergénica (IR) que incluye un segmento de 180 a 200 nucleótidos, llamada región común (RC). Esta región es la única altamente conservada entre ambos componentes y la que posee la secuencia nonanucleotídica conservada ‘TAATATTAC’ contenida en una estructura de bucle “stem-loop” formando parte del origen de replicación (Zhou, 2013).

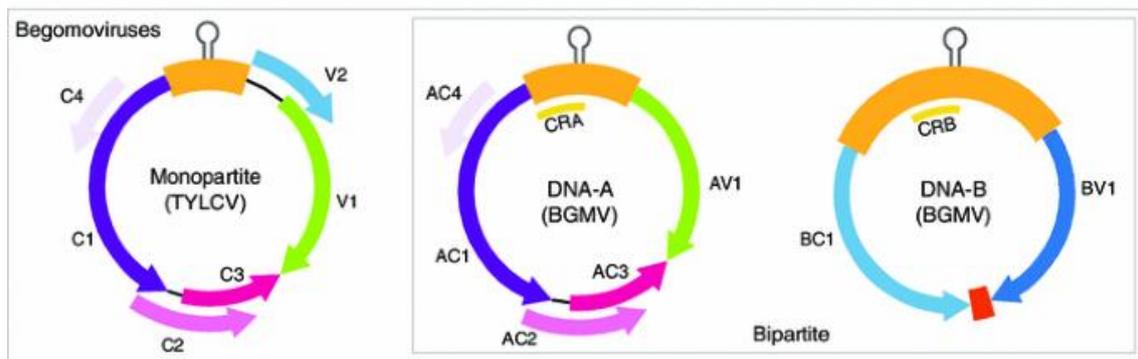


Figura 5. Representación gráfica de la organización genómica de begomovirus monopartitos y bipartitos (Zerbini et al., 2017).

1.5.2 Evolución de los begomovirus

Se considera que los begomovirus están, en la actualidad, en un franco proceso de evolución. Como para todos los virus, la evolución está sujeta a mutaciones puntuales y recombinación (López-López et al., 2019; Nawaz-ul-Rehman & Fauquet, 2009).

Si bien las mutaciones puntuales parecen ser la mayor causa de divergencia entre los aislamientos de begomovirus, la combinación y recombinación también contribuyen de manera significativa a la evolución de estos virus (Nawaz-ul-Rehman & Fauquet, 2009).

Durante las infecciones mixtas se observan procesos de recombinación (intercambio de DNA entre el mismo componente de diferentes virus) y pseudo-recombinación (componente A de un virus y B de otro) (Silva et al., 2014). Se ha demostrado que los begomovirus pueden valerse del proceso de recombinación para reparar el DNA viral durante la replicación (Preiss & Jeske, 2003), por lo tanto, la recombinación entre dos virus debería ocurrir con mucha frecuencia en el caso de

infecciones mixtas, comunes en áreas tropicales y subtropicales del mundo (Crespo-Bellido et al., 2021; Lefeuvre & Moriones, 2015; Silva et al., 2014). La recombinación entre especies ha dado origen a una gran diversidad entre los begomovirus y juega un rol importante en la emergencia de cepas más severas o nuevas especies que pueden afectar tipo y severidad de síntomas, rango de hospedantes y capacidad de transmisión por vectores (Ala-Poikela et al., 2005; Vaghi Medina et al., 2014).

1.5.3 Demarcación de especies y nomenclatura de begomovirus

Los virus del género *Begomovirus* son considerados patógenos emergentes de cultivos en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Por tener un genoma de DNA pequeño, fácil de manipular, y debido a las recientes innovaciones en materia de clonación y secuenciación, se ha producido un notorio incremento del número de secuencias genómicas de begomovirus. Los problemas para asignar los nuevos virus a las especies establecidas requieren de directrices para su clasificación y nomenclatura. Las directrices tienen en cuenta principalmente a) las características biológicas a nivel de género y b) los resultados obtenidos tras el uso de la herramienta de clasificación estandarizada, Sequence Demarcation Tool (SDT), que realiza alineaciones de secuencias por pares y cálculos de identidad (Muhire, et al., 2014). Actualmente, los umbrales de demarcación, basados en identidades por pares de secuencia de todo el genoma (o del componente DNA-A), son del 91% y 94% para los begomovirus pertenecientes a diferentes especies y cepas, respectivamente (Brown et al., 2015).

Si la nueva secuencia comparte < 91% de identidad con cualquier otra secuencia conocida de begomovirus debe considerarse miembro de una nueva especie, y deben proponerse entonces los nombres apropiados de las especies y de los virus. En cambio, si la secuencia comparte < 94% (y más del 91%) de identidad con todos los aislados descritos para esa especie, debe proponerse un nombre de cepa.

La nomenclatura de nuevas especies es de carácter único, no utilizado para ninguna otra especie reconocida por el ICTV y sigue la plantilla "género epíteto específico" (Walker et al., 2021). Sin embargo, los begomovirus aún no han sufrido el alcance de esta nueva norma y conservan por el momento, y hasta su actualización, el formato de la vieja plantilla que sigue la forma "Host symptom virus" (ej. Bean golden mosaic virus) y a la cual se le pueden agregar algunos descriptores extra en caso de ser necesario diferenciar cepas, aislamientos, referenciar nuevos hospederos, síntomas, sitios o momentos de muestreo (Brown et al., 2015).

1.5.4 Pérdidas ocasionadas por begomovirus

Las pérdidas ocasionadas por begomovirus pueden alcanzar valores del 20 al 100% (Cuéllar & Morales, 2006; Fekete, 2010) dependiendo de las poblaciones del insecto vector, la susceptibilidad de los hospederos, las prácticas de manejo, y las condiciones ambientales (Morales & Anderson, 2001).

En la zona tradicionalmente porotera de Argentina, la convivencia de cultivos de soja y poroto se traduce en una alta incidencia de virosis (Vizgarra et al., 2006). Allí los insectos vectores (moscas blancas) multiplican su población dispersándose de un cultivo a otro y aumentando la probabilidad de ocurrencia de enfermedades ocasionadas por begomovirus. Esto lleva a los productores a practicar, principalmente, el control químico sobre el insecto vector ya sea a través del uso de insecticidas en aplicaciones directas o a la semilla. Generalmente, los insecticidas utilizados son altamente tóxicos y costosos, incidiendo en la degradación del medio ambiente y en los costos de producción (Morales Garzón, 2000; Vizgarra et al., 2001).

En general las infecciones ocasionadas por begomovirus en poroto, se traducen en sintomatologías diversas ocasionando daños fisiológicos muchas veces difíciles de cuantificar. De acuerdo al cultivar y al estado de la planta en el momento de la infección, los síntomas pueden variar, ocurriendo deformación, abarquillamiento y disminución del tamaño de hojas y ramas. En floración puede ocurrir aborto de flores y reducción del número de vainas y granos por vaina. También pueden observarse síntomas de enanismo, distorsión de hojas y deformación de vainas. Los síntomas de clorosis y mosaicos también tienen sus consecuencias negativas ya que reducen y afectan el área fotosintéticamente activa (De Freitas-Vanzo et al., 2020; De Simone & Failde de Calvo, 2002) (Figura 6).

Si bien los begomovirus no se transmiten por semilla, la severidad del daño sufrida en el cultivo afecta su valor biológico originando posteriormente plantas de menor vigor.



Figura 6. Síntomas de mosaicos cloróticos y ampollados en hojas de poroto (Gentileza del Ing. Agrónomo Alejandro M. Rago).

1.5.5 Begomovirus: ambiente e insecto vector

Los begomovirus se consideran virus emergentes ya que la incidencia y severidad de las enfermedades que causan, se han incrementado considerablemente en las últimas décadas (Navas-Castillo et al., 2011). Como en la mayoría de los patosistemas vegetales, su impacto depende de su relación con la heterogeneidad ambiental, donde los diversos factores afectan la distribución, incidencia y severidad de las enfermedades. Las poblaciones del insecto vector, la susceptibilidad de los hospederos (cultivos y malezas), las prácticas agronómicas de manejo y las condiciones ambientales son factores condicionantes de los patosistemas en los que los begomovirus son protagonistas.

La presencia de *B. tabaci* es esencial para la aparición de brotes de begomovirus, ya que a mayor población, mayor es la incidencia de los virus y los daños que causan

(Cuéllar & Morales, 2006). Las moscas blancas (Figura 7) son pequeños insectos (1 a 3 mm) del orden *Hemiptera* (Familia *Aleyrodidae*) (Fiallo-Olivé et al., 2020) con capacidad de alimentarse de un amplio rango de especies vegetales (más de 500 especies de 74 familias diferentes). Actualmente, existen más de 1550 especies, dentro de ellas se encuentra el complejo de especies crípticas de *Bemisia tabaci* que considera al menos 39 miembros con características morfológicas similares pero con grandes diferencias a nivel biológico y genético (Alemantri et al., 2015; Ghosh, Rao, & Baranwal, 2019). Más allá de las pérdidas directas que ocasionan por el consumo de fotoasimilados, sus daños indirectos son aún mayores. La secreción de sustancias azucaradas que desechan sobre hojas y frutos, alimentan a hongos saprofitos, que recubren de un moho negro sus superficies, disminuyendo su capacidad fotosintética y la calidad del producto. Sin embargo, y más aún, su comportamiento como insecto vector de virosis, es su cualidad más inquietante (Islam et al., 2018; Krause-Sakate et al., 2020). La situación se convierte aún más preocupante debido a la particularidad de estos insectos de generar poblaciones resistentes a insecticidas (Cardona et al., 2001), ya que su ciclo de vida relativamente corto (21 días) y al gran número de oviposuras (500 por hembra), amplía las posibilidades de selección de individuos capaces de escapar a la acción de los plaguicidas.



Figura 7. (Izquierda) Individuos de mosca blanca de la especie *Bemisia tabaci*. (Derecha) Cara abaxial de hoja de poroto colonizada por un gran número de individuos adultos (Morales et al., 2006).

El comportamiento y desarrollo de las moscas blancas puede ser afectado por diferentes factores como la temperatura, la presencia de microorganismos endosimbiontes, las plantas huésped, los virus asociados y los manejos agronómicos realizados (Krause-Sakate et al., 2020). Particularmente las especies del complejo *Bemisia tabaci*, se adapta mejor a regiones con altitudes menores a 1000 m s.n.m. Las lluvias fuertes son un factor importantes en la dinámica poblacional porque disminuyen el número de adultos (Morales et al., 2006). Además, requieren de hospederos adecuados para reproducirse y un ambiente de temperaturas cálidas (como la de los trópicos) y poco lluvioso, al menos durante algunos meses del año (Krause-Sakate et al., 2020; Morales et al., 2006). Es probable que estas condiciones se den en zonas cada vez más amplias, a medida que el calentamiento global avance (Ferreira, 2015).

1.5.6 Manejo agronómico de begomovirus

El manejo de los begomovirus es un reto mundial debido a la amplia distribución de las enfermedades económicamente importantes por ellos ocasionadas, y debido a la no existencia de medidas completamente efectivas para su control. Independientemente del tipo de agricultura desarrollada, el manejo es más eficaz cuando se practica desde un enfoque de “manejo integrado de plagas (MIP)” basado en la biología y la ecología del virus y del vector, así como en el sistema de producción del cultivo. Esta forma de intervención implica tomar medidas antes, durante y después de la estación de crecimiento y desarrollo del cultivo (Rojas et al., 2018; Saeed & Samad, 2017).

Previo al establecimiento del cultivo, debe considerarse el origen de las semillas a utilizar. El uso de semillas certificadas asegura iniciar un cultivo de crecimiento uniforme y de mayor vigor, libre de patógenos, de pureza varietal y calidad genética. Además, disponer de cultivares con tolerancia/resistencia a begomovirus o, en algunos casos, al insecto vector, es fundamental ya que esto puede proporcionar una protección completa contra el desarrollo de enfermedad (Rojas et al., 2018).

Una vez seleccionado el material, el siguiente paso es definir el lugar y época de siembra para evitar los picos poblacionales del insecto vector y consecuentemente las altas incidencias de virosis. La siembra de poroto en época no coincidente con el periodo de post-infección de la soja y siembras alejadas a este cultivo u otros que posean plantas infectadas, retrasan la infección y proporcionan protección principalmente a las plantas jóvenes que suelen ser muy susceptibles (Rojas et al., 2018).

También se recomienda el uso de cultivos de barrera, como el maíz, para reducir el movimiento del vector entre las plantaciones, y la eliminación de malezas que pueden servir de huéspedes para el insecto vector y de reservorios para los begomovirus (Rojas et al., 2018).

Durante el establecimiento del cultivo, las medidas que se emplean incluyen mantener plantas en buen estado hídrico y nutricional, la eliminación de plantas infectadas y el manejo de los insectos vectores. La aplicación de insecticidas para controlar moscas blancas es la medida más utilizada, pero puede causar problemas ambientales y de salud humana no deseados (Vizgarra et al., 2006). Además, el uso reiterado de insecticidas favorece el desarrollo de poblaciones resistentes de mosca blanca de difícil control con sus futuras complicaciones (Saeed & Samad, 2017).

Finalmente, y luego de la cosecha, la implementación de períodos regionales libres de cultivos de poroto puede ser una medida efectiva que aprovecha el estrecho rango de hospederos de algunos begomovirus como BGMV y bean golden yellow mosaic virus (BGYMV). Además, deben eliminarse plantas voluntarias y malezas (Rojas et al., 2018).

Como se observa, el manejo de estos patógenos se basa en medidas preventivas. Dentro de ellas, la resistencia genética aparece como la estrategia de control más económica y fiable, especialmente en el contexto ecológico actual de preservación de la biodiversidad y el medio ambiente en el que el uso de productos fitosanitarios se vuelve limitado. La utilización de variedades resistentes es, con mucho, la estrategia más eficaz

de manejo contra estos virus (Meziadi et al., 2017; Rojas et al., 2018; Saeed & Samad, 2017; S. P. Singh et al., 2000; Singh & Schwartz, 2010).

1.6 Resistencia genética frente a begomovirus

La incorporación de varios genes/alelos ha sido reconocida como una de las estrategias más interesantes y apropiadas en la búsqueda de una resistencia amplia y estable a estas enfermedades (Singh et al., 2000; Valdés et al., 2017). En poroto, la resistencia genética a begomovirus ha sido fundamentalmente abocada hacia la defensa contra BGYMV y BGMV.

El BGMV fue el primer geminivirus reportado como una amenaza potencial para la producción de poroto en Sudamérica. Desde 1960, se convirtió en el problema más difundido en la producción de poroto en Brasil, Argentina y Bolivia, debido a la expansión exponencial de la soja, un huésped alternativo y adecuado para la reproducción de *B. tabaci* en la región. Por otro lado, BGYMV se distribuye principalmente en Centroamérica y la región del Caribe, comportándose como un virus devastador en áreas de producción de poroto por debajo de 1000 m s.n.m afectando países como República Dominicana, Guatemala, El Salvador, Haití, Honduras y Nicaragua. También ha sido reportado en partes de Costa Rica, el sur de México y en Florida (USA). Originalmente descritos como dos cepas del mismo virus, BGMV y BGYMV, causan síntomas similares, sin embargo, se distinguen a nivel de especie por su capacidad de transmitirse mecánicamente. Mientras BGYMV puede transmitirse de manera mecánica, BGMV sólo lo hace a través de su insecto vector *Bemisia tabaci* (Morales, 2000).

El manejo de estos patógenos, en términos de resistencia, fue posible al observar comportamientos diferenciales en progenies de cruzamientos intra e inter raciales de poroto (Blair et al., 2007; Singh et al., 2000). De esta manera se han determinado distintas líneas o materiales parentales de características sobresalientes como el retraso en la expresión de síntomas (Osorno et al., 2004), la resistencia a la clorosis de hojas (Velez et al., 1998) y el desarrollo normal de vainas, en presencia de alta presión de enfermedad (Acevedo Román, Castañeda, Angel Sánchez, Muñoz, & Beaver, 2004).

En estas líneas se han encontrado diferentes genes y regiones a los que se asocian distintos marcadores moleculares utilizados en los programas de mejoramiento genético. Estudios genéticos descubrieron los genes independientes *bgm-1* (Blair & Beaver, 1993), *bgm-2* (Velez Jose et al., 1998), y *bgm-3* (Osorno et al., 2007) que condicionan altos niveles de resistencia contra el amarillamiento de hojas, el mosaico y la clorosis. Los Bgm

(Acevedo Román et al., 2004) y Bgp-2 (Osorno et al., 2007) confieren resistencia a la deformación de vainas, mientras que los QTL en los cromosomas Pv04 y Pv07 contribuyen a un retraso/reducción de la clorosis foliar (Miklas et al., 1996). De todos ellos, *bgm-1* es el gen más utilizado en programas de mejora genética para la resistencia, en parte por su origen centroamericano, pero también por el amplio desarrollo de marcadores moleculares asociados a él (Blair et al., 2007; Urrea et al., 1996) utilizados para movilizar el gen a germoplasma de interés.

1.7 Comportamiento sanitario de cultivares de poroto en Argentina

En Argentina, el cultivo de poroto, es sembrado en el noroeste argentino (NOA) en forma extensiva como una de las legumbres de mayor importancia económica, allí se cultivan diferentes tipos de porotos, existiendo dos tipos comerciales predominantes, el “Alubia”; y el “Negro”. El 80-85% de la producción se reparte en partes iguales entre poroto “Alubia” (blanco de alta calidad y valor destinado a países europeos del Mediterráneo) y poroto “Negro” (destinado principalmente a países latinoamericanos y africanos). El 15-20% restante corresponde a porotos de color, cranberry y colorados destinados a países europeos y Estados Unidos (Calzada & Treboux, 2019).

Se estima que en 1980 la producción de poroto tipo Alubia ocupaba el 80% del área porotera, sin embargo, comenzaron a surgir problemas, particularmente sanitarios, siendo el “achaparramiento” un problema muy serio de la producción, diezmando miles de hectáreas principalmente en las regiones más cálidas y secas, desde el este de Tucumán hasta al este de Salta.

Se identificó al achaparramiento como un problema de naturaleza viral causado por el BDMV, begomovirus llamado comúnmente “virus del mosaico enano del poroto”. Luego se detectó la presencia de BGMV (Morales, 1990, 2000, 2006; Morales & Anderson, 2001) que produce el síntoma de mosaico dorado (actualmente uno de los begomovirus más difundidos en la región). Desde entonces, en el país, se han incorporado distintas medidas de manejo para contrarrestar esta problemática. De ellas, la introducción, selección, obtención y producción de materiales con mejor comportamiento es de las estrategias más sustentables. Sin embargo, la rápida adopción de estos cultivares por los productores, su empleo en un esquema de manejo de plagas y enfermedades defectuoso, y el uso generalizado de semilla de baja calidad, aceleran la pérdida de tolerancia y el potencial productivo de los materiales mejorados (De Simone & Failde de Calvo, 2002).

Aun así, se siguen distinguiendo tres grupos bien marcados respecto a su sanidad frente a virosis. En un extremo se encuentran los genotipos de grano blanco tipo Alubia, que muestran un alto número de plantas con síntomas y de los más severos; le siguen los genotipos de grano rojo, de comportamiento intermedio, con un número mínimo de plantas con incidencia y síntomas leves e intermedios; y en el otro extremo están los genotipos de granos negros, con síntomas mínimos o nulos siendo estos los más tolerantes (Morales Garzón, 2000; Rodríguez Pardina et al., 2018; Vizgarra et al., 2006).

Ahora bien, el comportamiento diferencial de los cultivares es orientativo ya que se basa en evaluaciones visuales que dependen del criterio del evaluador y de las infecciones a campo, que son esporádicas y que dificultan la selección de buenos materiales.

1.8 Hipótesis

Existen distintas especies y/o razas de begomovirus, aún no identificadas, que afectan al cultivo de poroto en Argentina, cuya caracterización es posible mediante el clonado y secuenciación de su genoma viral.

La presencia de begomovirus en cultivos de poroto está influenciada por diferentes variables biometeorológicas.

Las respuestas fisiológicas del poroto, frente a infecciones dadas por begomovirus, difiere según las distintas variedades utilizadas.

Es posible seleccionar resistencia a begomovirus en germoplasma de poroto mediante la utilización de marcadores moleculares.

1.9 Objetivos generales

Identificar y caracterizar nuevas especies de begomovirus en cultivos de poroto y en malezas aledañas.

Determinar la probabilidad de incidencia de begomovirus a través de variables biometeorológicas.

Describir las respuestas fisiológicas de cultivares de poroto frente a infecciones ocasionadas por begomovirus.

Evaluar marcadores moleculares que permitan encontrar fuentes de resistencia para el mejoramiento sanitario del cultivo.

1.10 Objetivos específicos

Detectar, mediante técnicas moleculares, la presencia de begomovirus en lotes de producción de poroto y en malezas aledañas en Argentina.

Caracterizar, de manera molecular y biológica, los diferentes aislamientos de begomovirus detectados.

Ajustar las técnicas de inoculación de begomovirus a plantas de poroto por bombardeo génico.

Modelar la probabilidad de incidencia de begomovirus determinando las variables biometeorológicas de mayor influencia.

Describir el comportamiento y las alteraciones fisiológicas de diferentes cultivares comerciales de poroto frente a infecciones ocasionadas por begomovirus.

Ajustar el uso de marcadores moleculares del tipo SCAR y SNP ligados a genes de resistencia a begomovirus en poroto.

Caracterizar una selección de germoplasma (poblaciones nativas silvestres y cultivares comerciales) y muestras de poroto de campo mediante marcadores moleculares ajustados ligados a genes de resistencia a begomovirus

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BEGOMOVIRUS EN
CULTIVOS DE POROTO Y MALEZAS ALEDAÑAS DEL NOA**

2.1 Introducción

La identificación de nuevas especies de begomovirus ha crecido considerablemente en las últimas décadas (Navas-Castillo et al., 2011) debido, principalmente, a importantes avances en el área de la biología y tecnología molecular y a la característica particular de estos virus de poseer un genoma de DNA pequeño, fácil de manipular (Brown et al., 2015).

El desarrollo de técnicas para la amplificación de genomas circulares como las amplificaciones por círculo rodante (RCA) (Haible, Kober, & Jeske, 2006) o de pequeños fragmentos por PCR, el uso de técnicas de detección basadas en serología (ej. ELISA) o en la hibridación de ácidos nucleicos, el uso de enzimas de restricción, el clonado y secuenciación, crearon nuevas posibilidades para descubrir especies de begomovirus. Particularmente, la hibridación de ácidos nucleicos, se ha utilizado desde la década del '80 por su mayor especificidad en comparación con la prueba ELISA (Agdia-EMEA, 2022). Esta técnica se constituye en una herramienta indispensable para la detección y caracterización de agentes infecciosos cuando la obtención de reactivos de diagnóstico por serología es imposible o muy dificultosa, y aun cuando la concentración del patógeno en los tejidos es muy baja (Conci et al., 2008; Maule, Hull, & Donson, 1983). El fundamento de la misma se basa en la propiedad físico-química que tienen los ácidos nucleicos de desnaturalizarse y volver a unirse, bajo condiciones apropiadas de temperatura, pH, presencia de solventes orgánicos, composición del ácido nucleico y homología entre las hebras intervinientes en la reacción. En los ensayos de hibridación, si existiera la formación de una doble cadena "híbrida" entre el ácido nucleico de la muestra a probar, generalmente unido a una matriz sólida como membranas de nylon, y el material marcado que se usa como "sonda" o "detector", la reacción de complementariedad se podrá visualizar revelando la reacción de hibridación con sustratos específicos (Conci et al., 2008). Concretamente, las sondas de hibridación molecular son fragmentos de DNA o RNA marcados mediante radiación o agentes químicos (digoxigenina, biotina, u otros) con el fin de ser utilizados para la detección de secuencias complementarias (Alaniz, 2015).

En Argentina, el uso de sondas de hibridación ha permitido la evaluación y diagnóstico de muestras de campo, la identificación y detección de begomovirus, y ha generado sospecha de presencia de especies aún no identificadas (Rodríguez Pardina et al., 2011; Varela., 2018).

La caracterización de esas nuevas especies se basa en la comparación de sus secuencias nucleotídicas con las de begomovirus ya disponibles, y en determinar características particulares como el tamaño del genoma, su constitución, la secuencia de las regiones codificantes, y la homología entre componentes genómicos (Brown et al., 2015; Zerbini et al., 2017). Sin embargo, una adecuada identificación no sólo requiere de una precisa caracterización molecular sino también de establecer propiedades biológicas basadas en la exploración de un rango de hospedantes y en cumplimentar con los postulados de Koch (Fuentes Castillo, 2007). En este sentido, el aislamiento de los distintos begomovirus es elemento fundamental para poder llevar a cabo dicho propósito, fundamentalmente debido a una alta probabilidad de encontrar a estos virus en infecciones mixtas. Sumado a ello, debe considerarse una característica particular de estos patógenos que es su afinidad por las células floemáticas. Este hecho se traduce en una problemática para la transmisión experimental. La inoculación mecánica de planta a planta es posible sólo para algunos begomovirus, y a tasas generalmente bajas. La transmisión por injerto requiere la presencia de planta viva infectada, y no todas las plantas pueden ser fácilmente injertadas. La mayoría de los begomovirus pueden ser transmitidos por moscas blancas pero esto requiere de plantas vivas infectadas y de instalaciones para la cría del vector (Guenoune-Gelbart et al., 2010). Por otro lado, la agroinoculación, utilizando *Agrobacterium tumefaciens* como vector, genera efectos de fondo que pueden enmascarar el verdadero desempeño del virus en estudio (Ascencio-Ibañez & Settlage, 2007). El escaso éxito de estos métodos no permite mantener y/o aislar cultivos puros de begomovirus, ni cumplir con los postulados de Koch; sin embargo existen técnicas como el bombardeo de partículas (o biobalística) que sí permiten desarrollar estos postulados, mantener aislados los distintos virus, infectar plantas sanas para reproducir los síntomas de enfermedad, obtener partículas virales puras, explorar rango de hospedantes y evaluar la resistencia de plantas a infecciones por begomovirus (López-López et al., 2013).

La inoculación por biobalística tiene por objetivo transformar objetivos tan diversos como células bacterianas, fúngicas, de insectos, vegetales y/o animales (BIO-RAD, 2000) a través de la introducción de ácidos nucleicos. Para ello utiliza micropartículas de metales pesados, biológicamente inertes (oro o tungsteno), que son cubiertas con DNA o RNA, y son aceleradas hacia un tejido blanco en el cual penetran, y una vez allí, se insertan directamente en el genoma de las células objetivo (López-López et al., 2013; Sanford, 1988). Los microproyectiles son impulsados por gas comprimido (normalmente helio) en una cámara de vacío (Guenoune-Gelbart et al., 2010). Este

método de inoculación viral ha reportado eficiencias de hasta el 100%, y no solo ha sido utilizado con éxito para inocular begomovirus sino también potyvirus, luteovirus, nepovirus, polerovirus entre otros (López-López et al., 2013).

Como sea, las infecciones por geminivirus dentro de los agroecosistemas son dinámicas, porque son interacciones complejas que involucran factores diversos y cambiantes, como los propios virus, los sistemas de producción, el ambiente y el vector. Por tanto, la identificación de estos patógenos debe ser un proceso permanente y preciso, dado que los nuevos patógenos requieren cambios continuos en las estrategias de manejo a seleccionar (Rojas et al., 2018). En este capítulo, se pretende aportar información sobre la presencia de begomovirus que afectan cultivos de poroto y malezas alledañas en la región noroeste de la Argentina, e identificar y caracterizar nuevas especies a través del uso de herramientas de la biología molecular, la bioinformática y mediante el ajuste de un sistema de inoculación por biobalística, para ser utilizado en la caracterización biológica de los virus identificados.

2.2 Objetivos

Detectar, mediante técnicas moleculares, la presencia de begomovirus en lotes de producción de poroto y en malezas alledañas en Argentina.

Caracterizar, de manera molecular y biológica, los diferentes aislamientos de begomovirus detectados.

Ajustar las técnicas de inoculación de begomovirus a plantas de poroto por bombardeo génico.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Presencia de begomovirus en Argentina

Para determinar la presencia de begomovirus en las zonas de producción de poroto en Argentina, durante las campañas 2016, 2017 y 2018, se recorrieron 64 lotes en distintas localidades de Córdoba, Jujuy, Salta, Santiago del Estero y Tucumán (Figura 8). Se recolectaron un total de 570 muestras con síntomas típicos de infección viral tales como achaparramiento; arrugado, ampollado y aguzamiento de hojas; proliferación de yemas; enanismo; acortamiento de entrenudos y clorosis (parches cloróticos, mosaicos, clorosis

internervales, etc.) (Figura 9). Las plantas recolectadas se encontraban principalmente en estados fenológicos reproductivos (floración y llenado de granos). Además, también se recolectaron malezas (31) en lotes y zonas aledañas a las de poroto.

Las muestras se analizaron con una sonda universal, producida a partir de DNA marcado con digoxigenina de los virus BGMV, tomato mottle virus (ToMoV) y tomato rugose mosaic virus (ToRMV), para detectar especies pertenecientes al género *Begomovirus*. Aquellas positivas fueron, posteriormente, sometidas a pruebas de hibridación con sondas específicas para los virus detectados en cultivos de poroto en Argentina (bean golden mosaic virus (BGMV); tomato yellow spot virus (ToYSV); soybean blistering mosaic virus (SbBMV); tomato mottle wrinkle virus (ToMoWV); tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) y sida golden mosaic Brazil virus (SiGMBrV)) según metodología descrita por Rodríguez Pardina (P. E. Rodríguez Pardina et al., 2011).

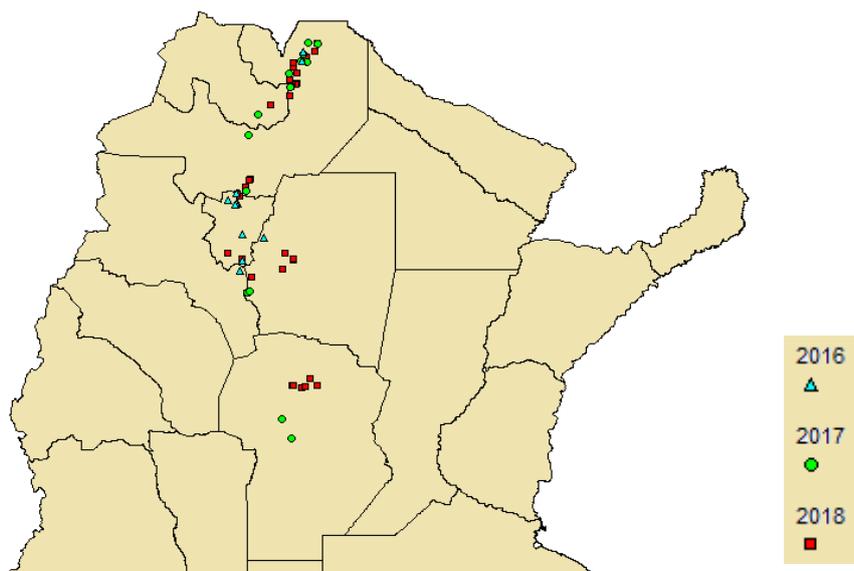


Figura 8. Localización de lotes de producción de poroto muestreados durante las campañas agrícolas 2016, 2017 y 2018.

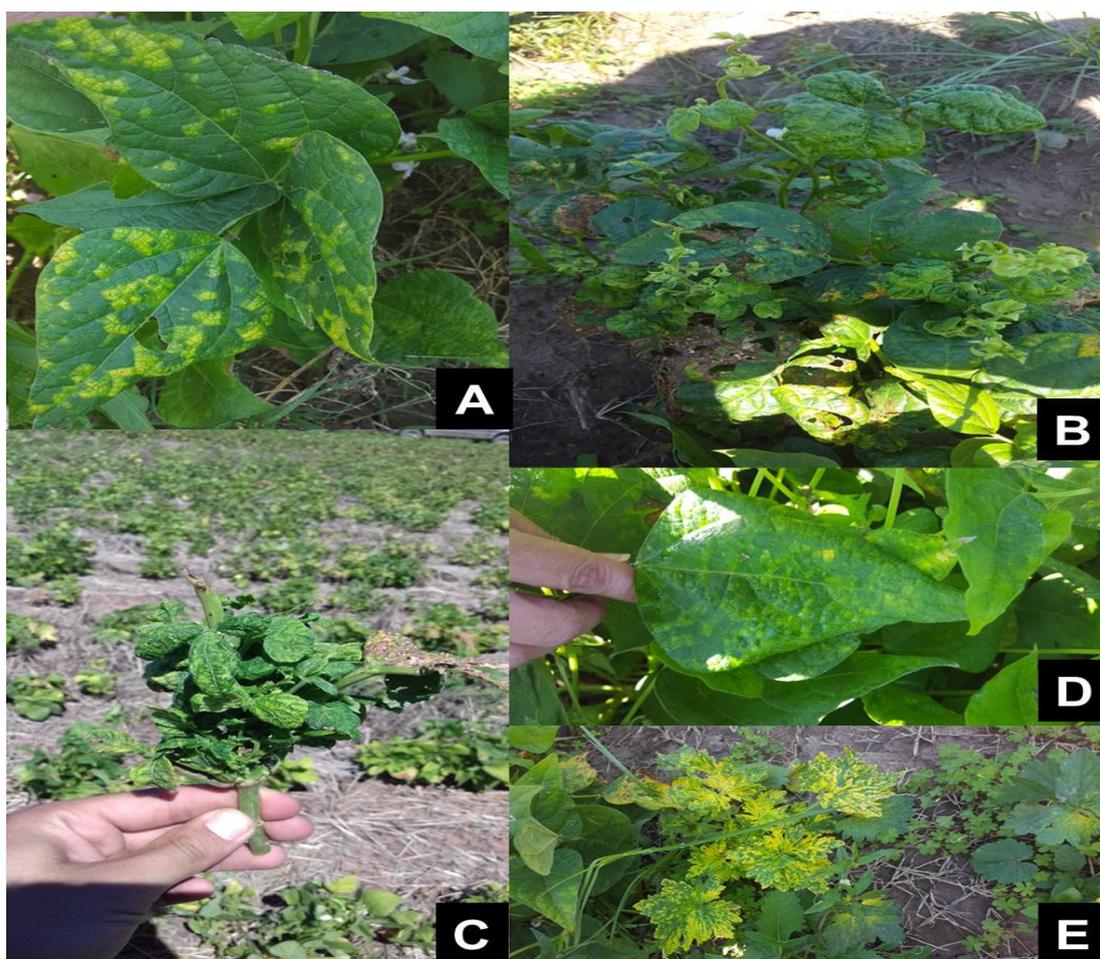


Figura 9. Síntomas producidos por begomovirus en plantas de poroto (A a D) y en *Leonorus sibricus* L (E). Se observan síntomas de parches cloróticos (A), achaparramiento (B), enanismo (C), mosaico y moteado (D), y fuerte clorosis generalizada (E).

2.3.2 Caracterización molecular de nuevos begomovirus

El DNA total, de muestras en las que los begomovirus no pudieron identificarse a nivel de especie a través de sondas de hibridación específicas, fue extraído mediante el método CTAB (Doyle & Doyle, 1987) y se utilizó para la amplificación del genoma viral mediante círculo rodante con el *TempliPhi Amplification Kit* (GE Healthcare, E.E.U.U) o con la enzima *phi29 DNA Polymerase* (New England BioLabs, E.E.U.U), según protocolo descrito por Nagata (Inoue-Nagata et al., 2004). El DNA circular amplificado fue digerido con diferentes enzimas de restricción. Los productos obtenidos se visualizaron a través de uso de transiluminador luego de ser corridos en gel de agarosa al 1% con TAE 0.5X durante 30 minutos. Los cortes linealizados (una sola banda de aproximadamente 2.6 kb), se ligaron con el vector pBluescript KS+ (pKS+ Stratagen mc) (Sambrook & Russell, 2001) utilizando la enzima *T4 DNA Ligase* (New England BioLabs, E.E.U.U), para su posterior clonado.

Durante el proceso de clonado se utilizaron las células competentes *DH5 α* . Los clones generados y verificados (mediante nuevos cortes enzimáticos con las enzimas correspondientes), fueron sometidos a extracciones de DNA de alta calidad con el kit *Zyppy™ Plasmid Miniprep* (Zymo Research, E.E.U.U) y enviados a la unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar para su secuenciación. La secuenciación inicial de los insertos virales se realizó utilizando los oligonucleótidos M13F y M13R, y se completó utilizando el método de “Primer walking” (Sverdlov & Azhikina, 2005), con oligonucleótidos específicos diseñados con el programa AmplifX (Jullien, 2013).

Las secuencias de nucleótidos fueron analizadas con el programa Chromas lite 2.01, ensambladas con SeqMan™ II y comparadas con las de otros begomovirus, utilizando el programa Blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) (Altschul et al., 1990). Para los análisis comparativos de secuencia se utilizó el programa Sequence Demarcation Tools versión 1.2 (SDT v1.2) (Muhire et al., 2014) con la opción de alineamiento MUSCLE (Edgar, 2004). Los análisis filogenéticos se realizaron comparando las secuencias obtenidas con las de otros begomovirus disponibles en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Tabla 1). Las mismas fueron posteriormente alineadas con la opción MUSCLE incluida en el programa MEGA X. Los árboles filogenéticos, se construyeron utilizando el programa anterior bajo el criterio de

Maximum Likelihood (ML) con el modelo General Time Reversible I + G bootstrap replications 3000 (Kumar et al., 2018). Los análisis de recombinación se realizaron mediante el uso del software RDP4 (Martin et al., 2015).

Tabla 1. Begomovirus utilizados en comparaciones de pares de secuencias, filogenia, y análisis de recombinación.

Begomovirus	Acrónimo	GenBank Número de accesión	
		DNA-A	DNA-B
Abutilon mosaic Bolivia virus	AbMBoV	-	HM585446
Abutilon mosaic Brazil virus	AbMBV	-	FN434439
African cassava mosaic virus	ACMV	J02057	J02058
Bean bushy stunt virus	BBSV	MN414067	MN414068
Bean dwarf mosaic virus	BDMV	M88179	M88180
Bean golden mosaic virus	BGMV	FJ665283	-
Bean golden mosaic virus	BGMV	M88686	M88687
Cabbage leaf curl virus	CabLCV	MH359396	MH359395
Cleome leaf crumple virus	CleLCrV	-	JF694460
Common bean severe mosaic virus	CBSMV	-	KX096981
Corchorus mottle virus	CoMoV	-	JQ805780
Cowpea bright yellow mosaic virus	CoBYMV	-	MH469732
Chino del tomate Amazonas virus	CdTAV	MH243423	-
Euphorbia yellow mosaic virus	EuYMV	FJ619507	FJ619508
Hybanthus yellow mosaic virus	HybYMV	-	KX156610
Macroptilium yellow mosaic Florida virus	MacYMFV	-	AY044136
Macroptilium yellow spot virus	MaYSV	KC004121	-
Melochia mosaic virus	MelMV	KT201151	KT201152
Passionfruit severe leaf distortion virus	PSLDV	-	FJ972768
Pavonia yellow mosaic virus	PavYMV	-	KT948788
Pepper blistering leaf virus	PepBLV	MN518738	-
Pepper golden mosaic virus	PepGMV	-	GU128147
Pepper huasteco yellow vein virus	PHYVV	-	MN013409

Begomovirus	Acrónimo	GenBank Número de accesión	
		DNA-A	DNA-B
Pepper huasteco yellow vein virus	PHYVV	-	X70419
Pepper leafroll virus	PepLRV	KC769819	-
Rhynchosia golden mosaic Sinaloa virus	RhGMSinV	-	DQ406673
Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus	RhGMYuV	-	KT381194
Rhynchosia rugose golden mosaic virus	RhRGMV	-	HM236371
Sida angular mosaic virus	SiAMV	-	KX691415
Sida golden mosaic Brazil virus	SiGMBRV	KY555798	-
Sida mosaic Bolivia virus 2	SiMBoV2	KJ742421	-
Sida yellow mosaic virus	SiYMV	JX871369	-
Solanum mosaic Bolivia virus	SoMBoV	KJ592721	-
Solanum mosaic Bolivia virus	SoMBoV	HM585435	-
Soybean blistering mosaic virus	SbBMV	EF016486	-
Soybean chlorotic spot virus	SoCSV	JX122965	-
Tobacco yellow crinkle virus	TbYCV	-	KP641346
Tomato dwarf leaf virus	ToDfLV	MN508220	-
Tomato golden vein virus	TGVV	JF803258	-
Tomato interveinal chlorosis virus	ToICV	JF803253	-
Tomato mottle leaf curl virus	ToMoLCV	MT214088	-
Tomato mottle virus	ToMoV	L14460	L14461
Tomato mottle wrinkle virus	ToMoWV	JQ714137	JQ714138
Tomato mottle wrinkle virus	ToMoWV	KY555800	-
Tomato rugose mosaic virus	ToRMV	AF291705	AF291706
Tomato yellow spot virus	ToYSV	DQ336350	DQ336351
Tomato yellow vein streak virus	ToYVSV	EF417915	EF417916
Tomato yellow vein streak virus	ToYVSV	GQ387369	-
Tomato yellow vein streak virus	ToYVSV	KC136337	-
Tomato yellow vein streak virus	ToYVSV	KY555801	-
Triumfetta yellow mosaic virus	TrYMV	-	KU131589

2.3.3 Caracterización biológica de nuevos begomovirus

La caracterización biológica de nuevos begomovirus, se basó en la exploración de un rango de hospedantes inoculados por biobalística (Guenoune-Gelbart et al., 2010; López-López et al., 2013).

2.3.3.1 Ajustes de inoculación por biobalística

Se evaluaron inoculaciones por biobalística sobre hipocótilos y hojas unifoliadas de 28 plantas de poroto cultivar Alubia Cerrillos (Tabla 2). Para ello, los componentes genómicos DNA-A y DNA-B, de los begomovirus a caracterizar, clonados en el vector pBluescript KS+ (pKS+ Stratagen mc) se multiplicaron en 50 µl de medio LB + ampicilina. Se realizaron extracciones plasmídicas de los crecimientos obtenidos, mediante maxiprep según protocolo adaptado de Sambrook & Russell, 2001. Los plásmidos purificados fueron digeridos con sus correspondientes enzimas en volumen final de 150 µl, verificados en gel de agarosa al 1% teñidos en GelRed™ y recircularizados con 2.5 µl de *T4 DNA Ligase* (3U/ µl) en volumen final de 400 µl por 20 h a 16 °C (Blawid et al., 2013; Ribeiro et al., 2007).

Posteriormente, se pesaron 60 mg de partículas de tungsteno y se colocaron en un 1 ml de glicerol al 60%. Una cantidad de 50 µl de esta suspensión se mezclaron junto a 50 µl de CaCl₂ 2.5 M y 20 µl de espermidina. Luego se adicionaron 10 µg de cada componente genómico y se mezclaron por agitación leve en vórtex por 10 minutos. Se centrifugó a 12 mil rpm por 10 segundos y se descartó el sobrenadante. Se realizó un doble enjuague con 150 µl de etanol absoluto retirando el sobrenadante en cada etapa. El pellet obtenido se resuspendió por pipeteo con 50 µl de etanol absoluto (Blawid et al., 2013; Ribeiro et al., 2007). Una alícuota de 8 µl de esta suspensión fue utilizada para las inoculaciones con el equipo Bio-Rad PDS-1000/He (BioRad, E.E.U.U) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Para las inoculaciones en hipocótilos, las semillas fueron colocadas en cámara húmeda hasta su germinación (48-72 h). Las plántulas disparadas en hojas unifoliadas fueron directamente sembradas en vasos descartables de 170 cc. En ambos casos, se probaron presiones de inoculación de 650 y 1100 psi con uno o dos disparos por planta (Tabla 2). Luego de ser inoculadas, todas las plántulas se trasplantaron a macetas de 3 l y fueron mantenidas en invernáculo para su observación.

Las infecciones virales, se corroboraron a través de PCR de hojas nuevas de las que se extrajo DNA a través del protocolo CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μ l con buffer TAS 1x, solución Enhancer 0.2 x, 0.25 mM MgCl₂, 2.5 mM dNTPs MIX, 2.5 mM de cada iniciador específico del componente DNA-A del begomovirus a caracterizar, 2 μ l de DNA base (150-500 ng) y 0.2 unidades de Taq T-Holmes ADN polimerasa (5000 U/ml). Las condiciones de ciclado fueron melting a 94 °C por 30 s, annealing según cebador utilizado y extensión a 72 °C por 90 s. El número de ciclos empleados fue de 35, con una etapa previa a 94 °C por 2 min, y una posterior a 72 °C por 10 min.

Tabla 2. Número de plantas inoculadas mediante bombardeo génico según tratamiento.

Presión utilizada (psi)	Tejido blanco a un (1) disparo		Tejido blanco a dos (2) disparos	
	Hipocótilo	Unifoliada	Hipocótilo	Unifoliada
650	5	3	5	3
1100	3	3	3	3
ID Muestras (650 psi)	1*-2-3-4-5*	19*-20*-21	9*-10*-11-12- 13	22*-23*-24
ID Muestras (1100 psi)	6*-7*-8	25*-26*-27	14*-15-16-17- 18*	28*-29*-30

*Muestras utilizadas para su análisis por PCR.

El equipo utilizado para las amplificaciones fue un termociclador Ivema T18 (Ivema, Argentina). Los productos amplificados fueron observados en geles de agarosa al 1% (p/v) teñidos con GelRed™, visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta y analizados mediante el uso del software Quantity One.

2.3.3.2 Rango de hospedantes

Se realizó una selección de hospedantes considerando su importancia económica y productiva en la región norte del país, como también malezas comunes y especies utilizadas en estudios de investigación:

- Poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivares Alubia Cerrillos, NAG12 y LCR5
- Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)
- Pimiento (*Capsicum annuum* L.)
- Soja (*Glycine max* L.)
- Cola de León (*Leonorus sibiricus* L.)
- Afata (*Malvastrum coromandelianum* L. (Garcke))
- Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*)

Las plantas seleccionadas fueron inoculadas con los clones correspondientes a los componentes A y B de los begomovirus a caracterizar. Luego de inoculadas, las mismas fueron trasplantadas a macetas de 2-3 l y se mantuvieron en invernadero en observación periódica hasta la aparición de síntomas. Las infecciones virales se corroboraron por PCR con los iniciadores específicos diseñados para los DNA-A de cada entidad viral correspondiente.

2.4 Resultados

2.4.1 Presencia de begomovirus en Argentina

Para la campaña 2016, se obtuvo una prevalencia (lotes infectados/lotes muestreados) de 100% de begomovirus, mientras que para el año 2017 y 2018, las mismas fueron del 31.25% y 31.58%, respectivamente (Figura 10).



Figura 10. Prevalencias de begomovirus en lotes de producción de poroto muestreados durante las campañas 2016, 2017 y 2018.

Las mayores prevalencias, por provincias muestreadas, tuvieron lugar en Salta durante las tres campañas evaluadas siendo del 100% para el año 2016 y del 55.56% y 61.1% para las campañas 2017 y 2018, respectivamente. Jujuy también presentó una alta prevalencia (100%) sin embargo fue evaluada durante una sola campaña (Figura 11). A su vez, el 52.89% de las muestras recolectadas en el 2016 se encontraban infectadas por begomovirus mientras que en los años 2017 y 2018 los porcentajes de plantas infectadas fueron menores: 21.4% y 28.9% respectivamente (Figura 12).

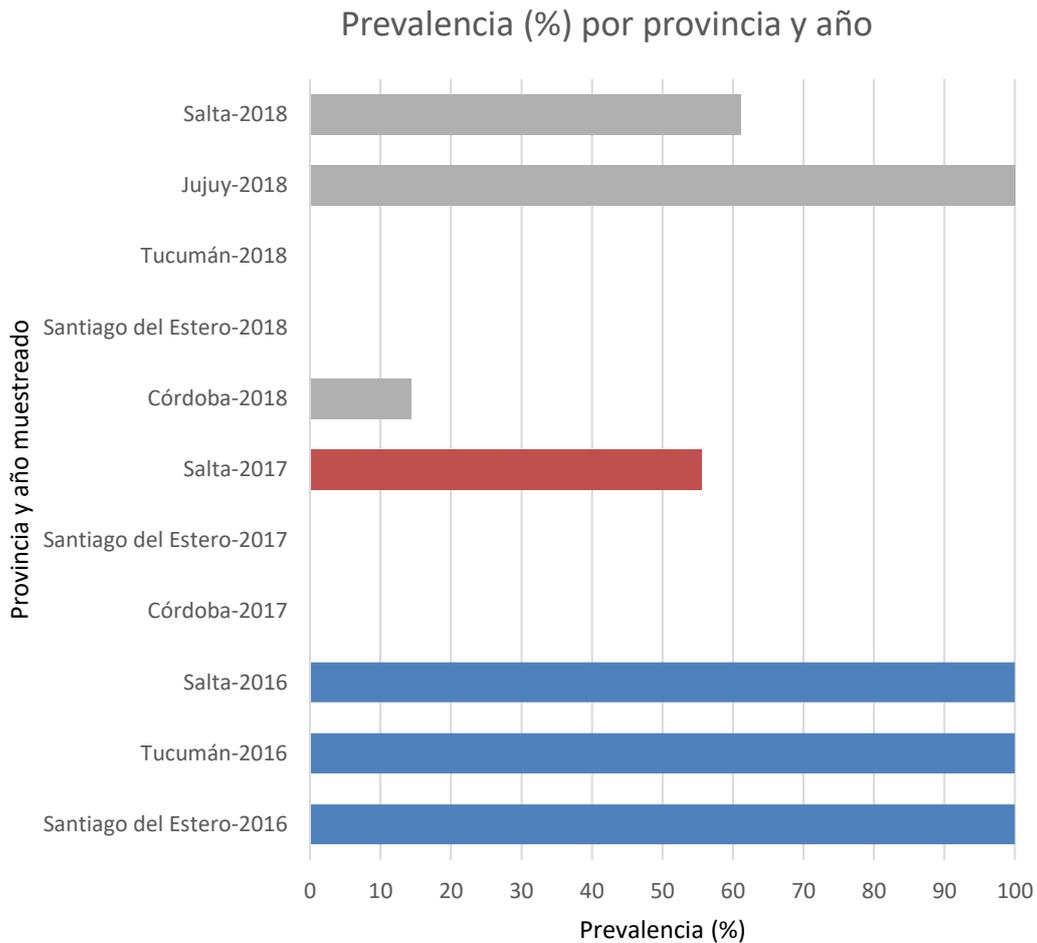


Figura 11. Prevalencias de begomovirus en lotes de producción de poroto, según provincia y campaña de muestreo. Barras de diferente color representan los distintos años de muestreo (en gris año 2018, en rojo año 2017 y en azul año 2016).

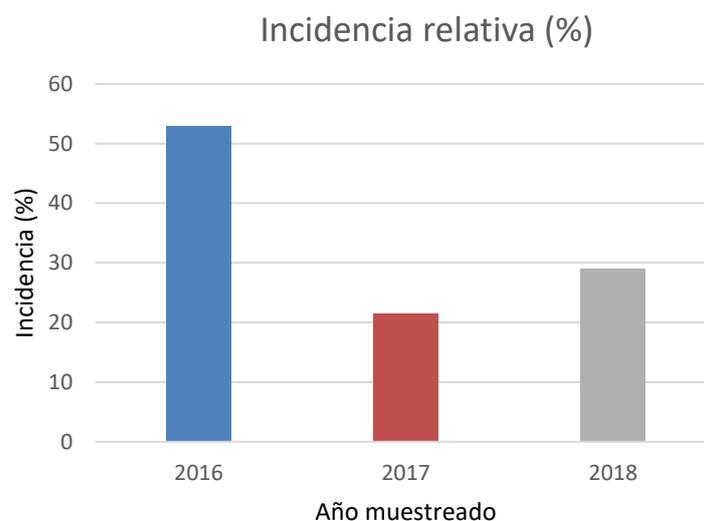


Figura 12. Incidencias relativas de begomovirus en lotes de producción de poroto durante tres campañas de muestreo.

De las 181 muestras positivas para begomovirus, de las tres campañas evaluadas a nivel de especie, 40.33% estaban infectadas con BGMV, 31.49% con ToMoWV, 15.47% con ToYVSV, 5.52% con ToYSV, 1.1% con SiGMBrV y 0.55% con SbBMV. En la figura 13 se detalla la incidencia relativa (%) de cada especie de begomovirus detectada en cada uno de los tres años de muestreo.

Por otro lado, se observó que la provincia de Salta presentó la mayor diversidad de begomovirus (Figura 14) y de lotes afectados por infecciones mixtas (dos o más especies infectando una misma planta) principalmente en localidades del norte de esta provincia (Coronel Cornejo, General Mosconi y Tartagal). La provincia de Jujuy también presentó una diversidad alta, sin embargo, sólo fue evaluada durante un año de muestreo (Figura 14). Cabe destacar la observación de un alto número (53) de muestras con infecciones mixtas. En ellas, las infecciones dobles (2 especies de begomovirus) fueron de las más comunes con una participación principal de BGMV, seguida de ToMoWV y ToYVSV (Figura 15).

Finalmente, se detectó un alto porcentaje de begomovirus sin identificar. Para la campaña 2016 este valor fue del 82.81% (53 de 64 muestras) mientras que para el 2017 fue del 27.8% (10 de 36 muestras). En el año 2018 sólo 10 de 81 muestras (12.34%) no fueron identificadas a nivel de especie (Figura 16).

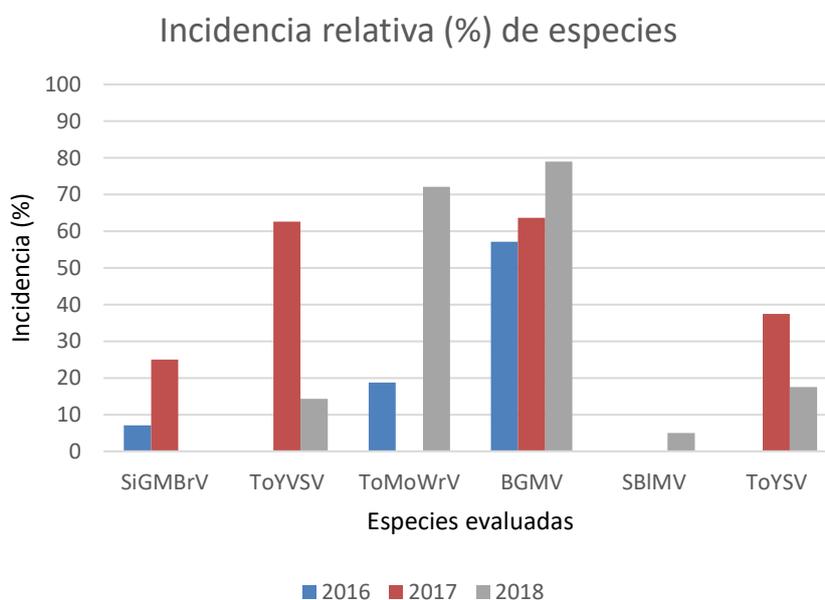


Figura 13. Incidencias relativas de diferentes especies de begomovirus en lotes de producción de poroto durante las campañas de muestreo 2016, 2017 y 2018.

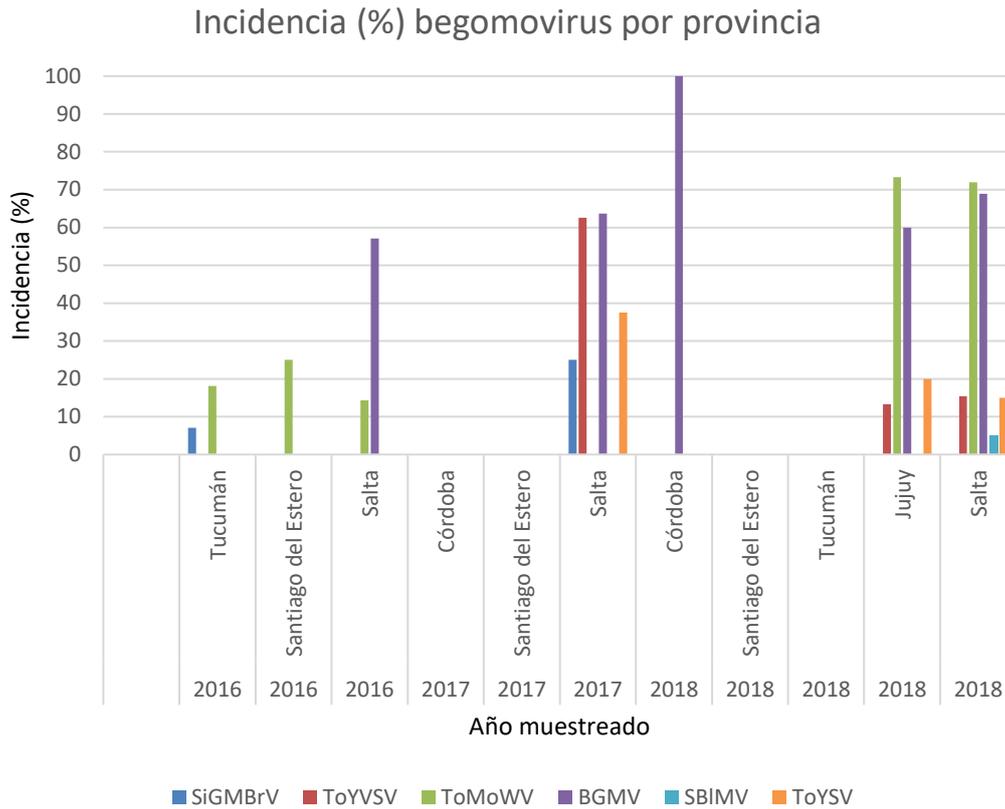


Figura 14. Incidencias relativas de las diferentes especies de begomovirus en lotes de producción de poroto según provincia, durante las campañas de muestreo 2016, 2017 y 2018.

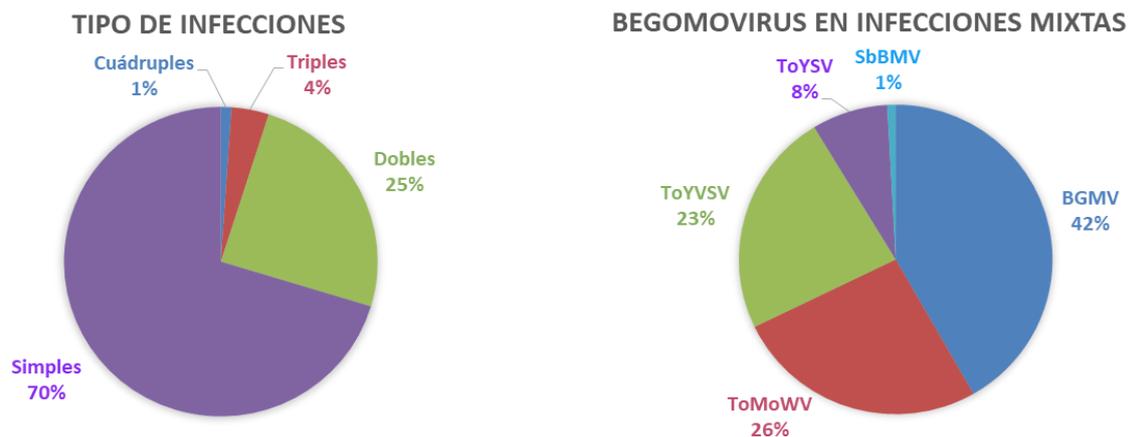


Figura 15. Tipo de infecciones de acuerdo a la cantidad de begomovirus detectados por muestra y participación de las distintas especies en las infecciones mixtas.

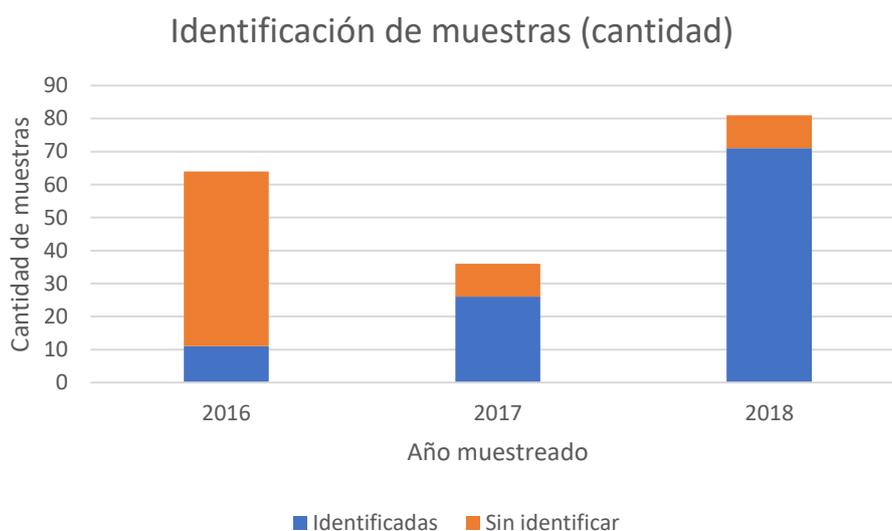


Figura 16. Número de muestras identificadas a nivel de especie y sin identificar durante las tres campañas de muestreo.

Respecto a las malezas, de las 31 muestras analizadas, 20 (64.5%), se encontraron efectivamente infectadas con begomovirus con una importante participación de ToYYSV (55%), ToYVSV (40%), SiGMBrV (35%), y SbBMV (35%). Por otro lado, BGMV, ToMoWV y EuMV fueron los begomovirus menos prevalentes con incidencias relativas del 10%, 10% y 5% respectivamente. Nueve de esas 20 plantas (45%) presentaron infecciones mixtas, siendo *Leonorus sibricus* L. y *Solanum chacoense* B. las malezas que albergaron mayor cantidad de begomovirus. Sólo tres arvenses estuvieron infectadas por begomovirus no distinguibles a nivel de especie a través del uso de las sondas de hibridación específicas (Figura 17).

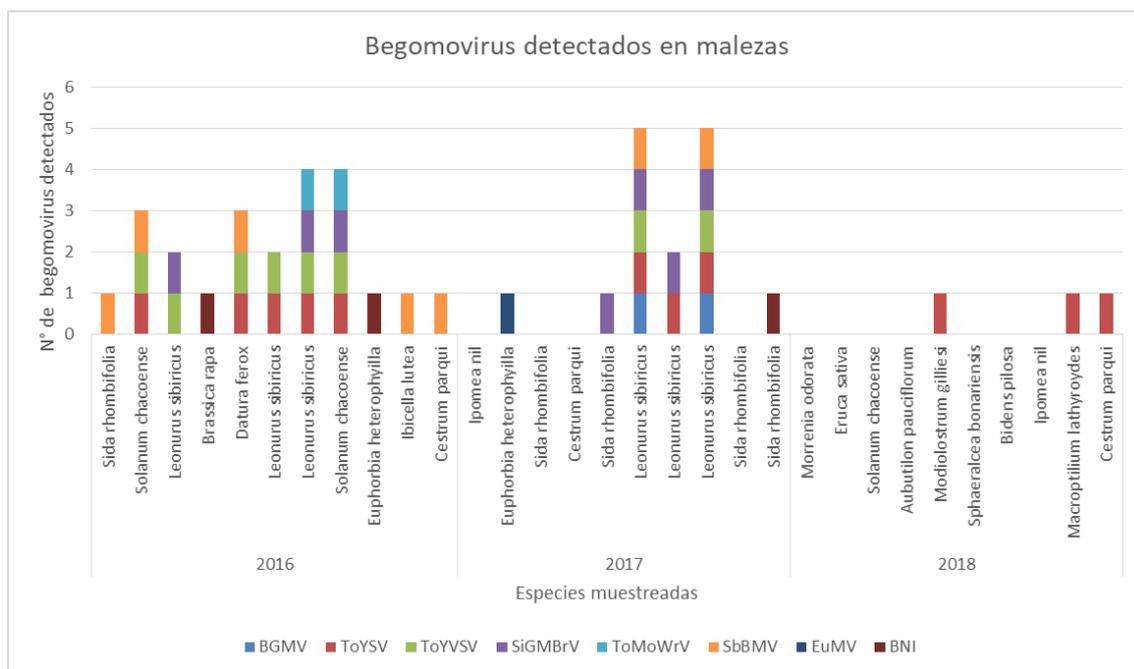


Figura 17. Begomovirus detectados en malezas recolectadas durante los años 2016, 2017 y 2018. La sigla BNI corresponde a begomovirus no identificado a través de las sondas específicas utilizadas.

2.4.2 Caracterización molecular de nuevos begomovirus

Se clonaron los DNAs amplificados y linealizados provenientes de un total de 12 muestras, de las cuales se obtuvieron 51 clones (Tabla 3). De ellos, se seleccionaron 36 para su secuenciación inicial. Análisis de homología de las secuencias obtenidas mostraron resultados diversos; entre ellos, concentraciones insuficientes para su óptima secuenciación, identidades con vectores de clonación y organelas celulares. También se observaron clones que presentaron homología con begomovirus ya descriptos en Argentina. Sin embargo, ocho de estos presentaron homología para begomovirus aún no citados en poroto para Argentina (Tabla 4). Los clones 179 Hind III-1, 179 Hind III-7 y 179 Hind III-8, provenientes de muestra de poroto recolectada en la campaña 2017 en General Mosconi (Salta), y los clones M9 EcoRV-1, M9 EcoRV-3, M9 Eco RV-4, M9 Eco RV-10 y M9 Eco RV-11 provenientes de la maleza *Euphorbia heterophylla* L. de Leales (Tucumán) de la campaña 2016, se escogieron para completar su secuenciación utilizando primers específicamente diseñados (Tabla 5).

Tabla 3. Clones generados a partir de productos de RCA de begomovirus no identificados a nivel de especie mediante sondas específicas.

Campaña	Provincia	Localidad	Lote	Material	Muestra	Enzima de corte	Clones generados	Cantidad
2017	Salta	Tartagal	5	Poroto	100	Sma I	100-Sma I	4
2017	Salta	Gral Mosconi	9	Poroto	165	Hind III	165-Hind III	4
2017	Salta	Gral Mosconi	9	Poroto	168	Hind III	168-Hind III	4
2017	Salta	Gral Mosconi	9	Poroto	169	Hind III	169-Hind III	1
2017	Salta	Gral Mosconi	9	Poroto	177	Eco RV	177-Eco RV	3
2017	Salta	Gral Mosconi	9	Poroto	179	Eco RV	179-Eco RV	5
2017	Salta	Gral Mosconi	9	Poroto	179	Hind III	179-Hind III	11
2017	Salta	Gral Mosconi	9	Poroto	180	Bam HI	180-Bam HI	4
2017	Salta	Tartagal	13	Maleza Afata	193	Sal I	193-Sal I	4

Campaña	Provincia	Localidad	Lote	Material	Muestra	Enzima de corte	Clones generados	Cantidad
2016	Tucumán	Leales	SD	Maleza.Lecherito (<i>Euphorbia hetrophylla</i> L.)	9	Eco RV	M9-EcoRV	9
2016	Tucumán	Zárate	5	Poroto chaucha cv. High Style	48	Eco RI	P48-Eco RI	1
2016	Santiago del Estero	Añatuya	4	Soja	7	Cla I	S7-Cla I	1

Tabla 4. Clones seleccionados para su secuenciación inicial, y homología de las secuencias analizadas (Virus Forward y Virus Reverse).

Muestra	Clon	Provincia	Localidad	Virus (Forward)	Virus (Reverse)
165 Hind III	1	Salta	Gral. Mosconi	Bean golden mosaic virus DNA-A. Identidad 97%	Bean golden mosaic virus BR DNA-A. Identidad 98%
165 Hind III	3	Salta	Gral. Mosconi	Bean golden mosaic virus BR DNA-A. Identidad 96%	Bean golden mosaic virus BR DNA-A. Identidad 96%
165 Hind III	4	Salta	Gral. Mosconi	Cloning vector pPS-BR, complete sequence	Bean golden mosaic virus BR DNA-A. Identidad 88%
168 Hind III	1	Salta	Gral. Mosconi	Bean golden mosaic virus Br DNA-A. Identidad 99%.	Bean golden mosaic virus DNA-A. Identidad 97%.
168 Hind III	2	Salta	Gral. Mosconi	Bean golden mosaic virus Br DNA-A. Identidad 97%.	Bean golden mosaic virus DNA-A. Identidad 96%.
168 Hind III	3	Salta	Gral. Mosconi	Bean golden mosaic virus DNA-A. Identidad 75%.	Bean golden mosaic virus DNA-A. Identidad 96%.
168 Hind III	4	Salta	Gral. Mosconi	Cloning vector pPS-BR. Identidad 97%	Bean golden mosaic virus BR DNA-A. Identidad 98%.
179 Hind III	1*	Salta	Gral. Mosconi	Pepper leafroll virus DNA-A. Identidad 84%.	Pepper leafroll virus DNA-A. Identidad 86%.
179 Hind III	6	Salta	Gral. Mosconi	Pepper leafroll virus isolate. Identidad 84%. Tomato yellow vein streak virus Identidad 83%	Pepper leafroll virus-Sida mosaic Bolivia virus Soybean blistering mosaic virus isolate NOA DNA-A. Identidad 84%
179 Hind III	7*	Salta	Gral. Mosconi	Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus DNA-B. Identidad 79%.	Pavonia yellow mosaic virus DNA-B. Identidad 74%.

Muestra	Clon	Provincia	Localidad	Virus (Forward)	Virus (Reverse)
179 Hind III	8*	Salta	Gral. Mosconi	Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus DNA-B. Identidad 79%.	Rhynchosia golden mosaic Yucatan virus DNA-B. Identidad 74%.
180 Bam HI	1	Salta	Gral. Mosconi	Bean golden mosaic virus DNA-A. Identidad 99%.	Bean golden mosaic virus DNA-A. Identidad 96%.
180 Bam HI	5	Salta	Gral. Mosconi	Bean golden mosaic virus. Identidad 99%.	Bean golden mosaic virus DNA-A. Identidad 96%.
180 Bam HI	8	Salta	Gral. Mosconi	Bean golden mosaic virus BR DNA-A	Bean golden mosaic virus BR DNA-A
M 9 Eco RV	1*	Tucumán	Leales	Euphorbia yellow mosaic virus DNA-B. Identidad 90%.	Euphorbia yellow mosaic virus DNA-B. Identidad 88%.
M 9 Eco RV	3*	Tucumán	Leales	Sida mosaic Bolivia virus DNA-A. Identidad 88%/Tomato rugose yellow leaf curl virus. Identidad 87%.	Cabbage leaf curl virus DNA-A. Identidad 83%/ Tomato rugose yellow leaf curl virus. Identidad 83%.
M 9 Eco RV	4*	Tucumán	Leales	Euphorbia yellow mosaic virus DNA-A. Identidad 94%.	Euphorbia yellow mosaic virus DNA-A. Identidad 92%.
M 9 Eco RV	10*	Tucumán	Leales	Pepper blistering leaf virus DNA-A. Identidad 87.97%.	Pepper blistering leaf virus DNA-A. Identidad 85.32%.
M 9 Eco RV	11*	Tucumán	Leales	Pepper blistering leaf virus DNA-A. Identidad 88.44%.	Pepper blistering leaf virus DNA-A. Identidad 85.26%.
P 48 Eco RI	1	Tucumán	Zárate	Solanum mosaic Bolivia virus DNA-B. Identidad 85%.	Escherichia coli strain C chromosome. Identidad 100%.

(*) Clones con resultados de homología para begomovirus aún no descriptos en Argentina y otros seleccionados para su caracterización.

Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para la secuenciación por “Primer Walking”. ID (identificación del cebador), Tm (temperatura de melting °C), Q (calidad %), L (largo de secuencia), C (componente genómico).

Secuencia	ID	Tm	Q	L	C
GAAGTTCTTCGCGTAACTGAG	179.Hind.III.1Fw	54	79	22	A
GTTGGCTCTCCACAAGGCTTATCTC	179.Hind.III.1Rv	59	87	25	A
GCCCCAATAAGCTCTTTCCAG	M.9.Eco.RV.3Fw	55	87	21	A
GCGATAAATCCTGGGCTTCCGA	M.9.Eco.RV.3Rv	59	95	22	A
GAGCGATCAGTTGCGAAACGA	M.9.Eco.RV.4Fw	58	95	21	A
CGACATAATAAGGGCTGGTGA	M.9.Eco.RV.4Rv	54	80	21	A
GCAATGGTCTATCTTCATACAGC	179.Hind.III.7Fw	53	86	23	B
CAACGCGTTCTTGCTTATATTACC	179.Hind.III.7Rv	55	76	24	B
GCAATGGTCTATCTTCATACAGC	179.Hind.III.8Fw	53	86	23	B
CAACGCGTTCTTGCTTATATTACC	179.Hind.III.8Rv	55	76	24	B
CGATATGCTGAAGGCTGATGGCAA	M9.EcoRv.1Fw	59	100	24	B
CGGCTAGGTTGCCATGACTGTGGA	M9.EcoRv.1Rv	62	87	24	B

Los análisis de secuencias pusieron en manifiesto que los clones 179 Hind III-1 y 179 Hind III-8, corresponden a los de un virus de una especie no descrita, ya que su identidad, tras ser comparada con la de otros begomovirus, es inferior al límite sugerido por el ICTV para el género *Begomovirus* en la integración de sus miembros (Brown et al., 2015). Se propone para este nuevo virus el nombre “bean bushy stunt virus” (BBSV). El componente A (179 Hind III-1) (Número de acceso GenBank MN414067) posee una longitud de 2572 pb, mientras que la del B (179 Hind III-8) (Número de acceso GenBank MN414068) es de 2522 pb. Ambas secuencias poseen la región típica de origen de replicación viral (TAATATTAC) y los marcos abiertos de lectura (ORF) correspondientes. El DNA-A posee un ORF en sentido viral (AV1) y cuatro en sentido complementario (AC1, AC2, AC3 y AC4); en tanto el DNA-B dispone de un ORF en sentido viral (BV1) y uno en sentido complementario (BC1) (Tabla 6).

Comparaciones de identidades nucleotídicas del DNA-A y del DNA-B con otras 20 secuencias de begomovirus, establecen que ambos componentes comparten identidades inferiores al 85% (Figura 18). Las mayores similitudes se encontraron con los virus pepper leafroll virus (PepLRV) para el DNA-A (84.65%) y melochia mosaic virus (MelMV) para el DNA-B (72.04%) (Tabla 7).

Tabla 6. Marcos abiertos de lectura correspondientes a los componentes DNA-A y DNA-B del nuevo begomovirus BBSV detectado en poroto.

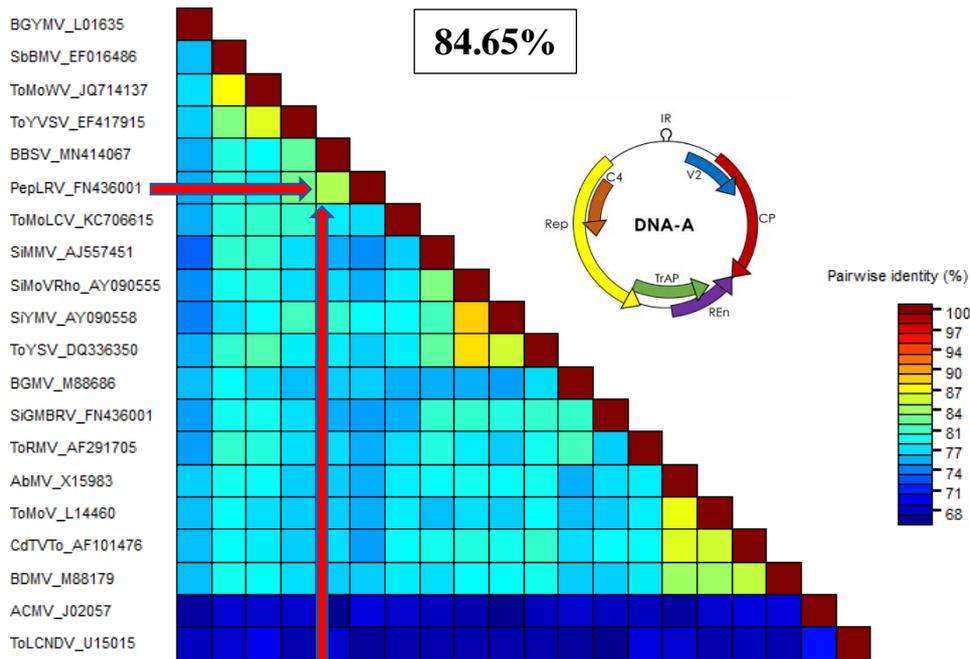
Orientación	Gen	Posición	Nº nt	Nº aa	Componente genómico
+	CP (AV1)	162-911	750	249	A
-	Rep (AC1)	2439-1384	1056	351	A
-	TrAp (AC2)	1442-1053	390	129	A
-	Ren (AC3)	1306-908	399	132	A
-	AC4	2282-1989	294	97	A
+	NSP (BV1)	326-1132	802	268	B
-	MP (BC1)	2079-1201	879	292	B

Tabla 7. Comparación de identidades nucleotídicas de los componentes A y B de bean bushy stunt virus (BBSV) y otros begomovirus.

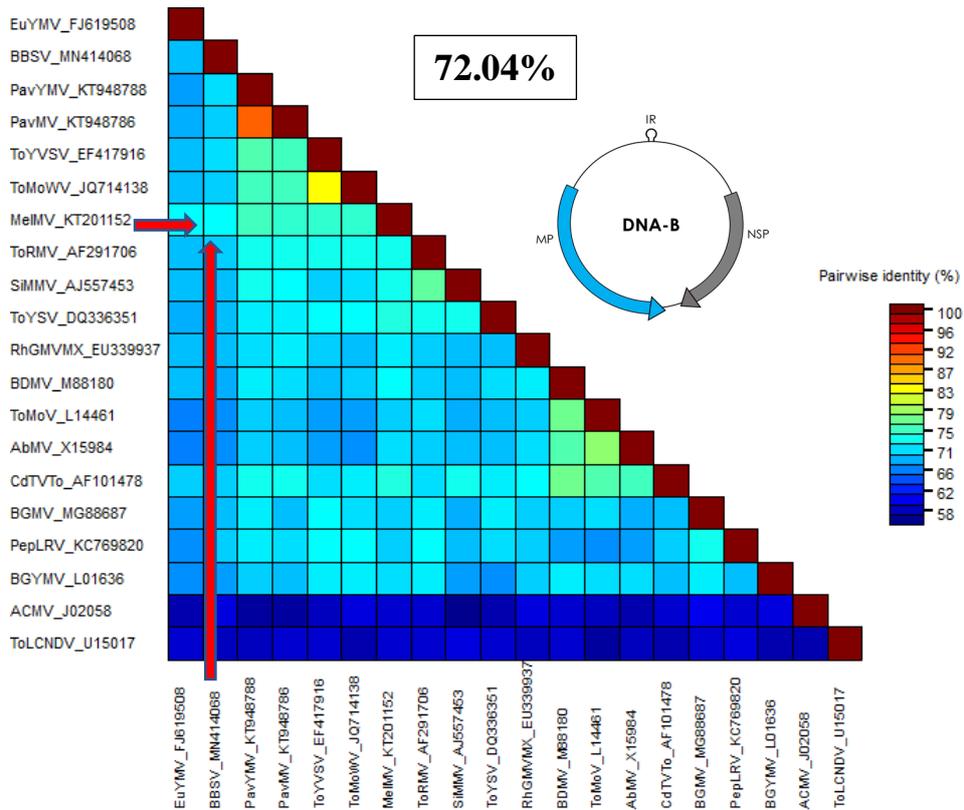
Virus	Nº de Acceso	DNA-A %	DNA-B %
Pepper leafroll virus (PepLRV)	FN436001/KC769820	84.65	70.35
Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV)	EF417915/EF417916	81.66	70.96
Sida yellow mosaic virus (SiYMV)	AY090558	79.86	-
Soybean blistering mosaic virus (SbBMV)	EF016486	79.77	-
Tomato mottle wrinkle virus (ToMoWV)	JQ714137/JQ714138	78.45	70.18
Melochia mosaic virus (MelMV)	KT20151/KT201152	76.90	72.04
Pavonia yellow mosaic virus (PavYMV)	KT948787/KT948788	76.21	71.12
Pavonia mosaic virus (PavMV)	KT948785/KT948786	75.37	70.48
Bean golden mosaic virus (BGMV)	M88686/MG88687	76.72	69.28
Tomato yellow spot virus (ToYSV)	DQ336350/DQ336351	78.13	69.17

Límite* 91% de identidad en el componente DNA-A

*Límite actual establecido por el ICTV como criterio de demarcación de miembros de diferentes especies para el género *Begomovirus*.



A



B

Figura 18. Comparación de secuencias nucleotídicas entre el DNA-A y DNA-B de bean bushy stunt virus (BBSV) y otros begomovirus obtenida mediante Sequence Demarcation Tools (SDT), con la opción de alineamiento Muscle. Las flechas rojas indican la máxima similitud observada (84.65% y 72.04%).

En cuanto a las relaciones filogenéticas, se observa que, considerando el DNA-A y otras 37 secuencias, el nuevo virus se encuentra asociado junto a PepLRV en un grupo compartido con aislamientos de ToMoWV y ToYVSV de Argentina, Brasil y Chile; con SbbIMV y TGMV (tomato golden mosaic virus) (Figura 19). Por otro lado, el DNA-B junto a otras 39 secuencias, establecen a BBSV en un grupo compartido con ToMoWV, ToYVSV y con dos begomovirus aislados de malezas, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV) y MelMV (Figura 20). Cabe destacar que no se detectaron eventos de recombinación en ninguno de los dos componentes analizados.

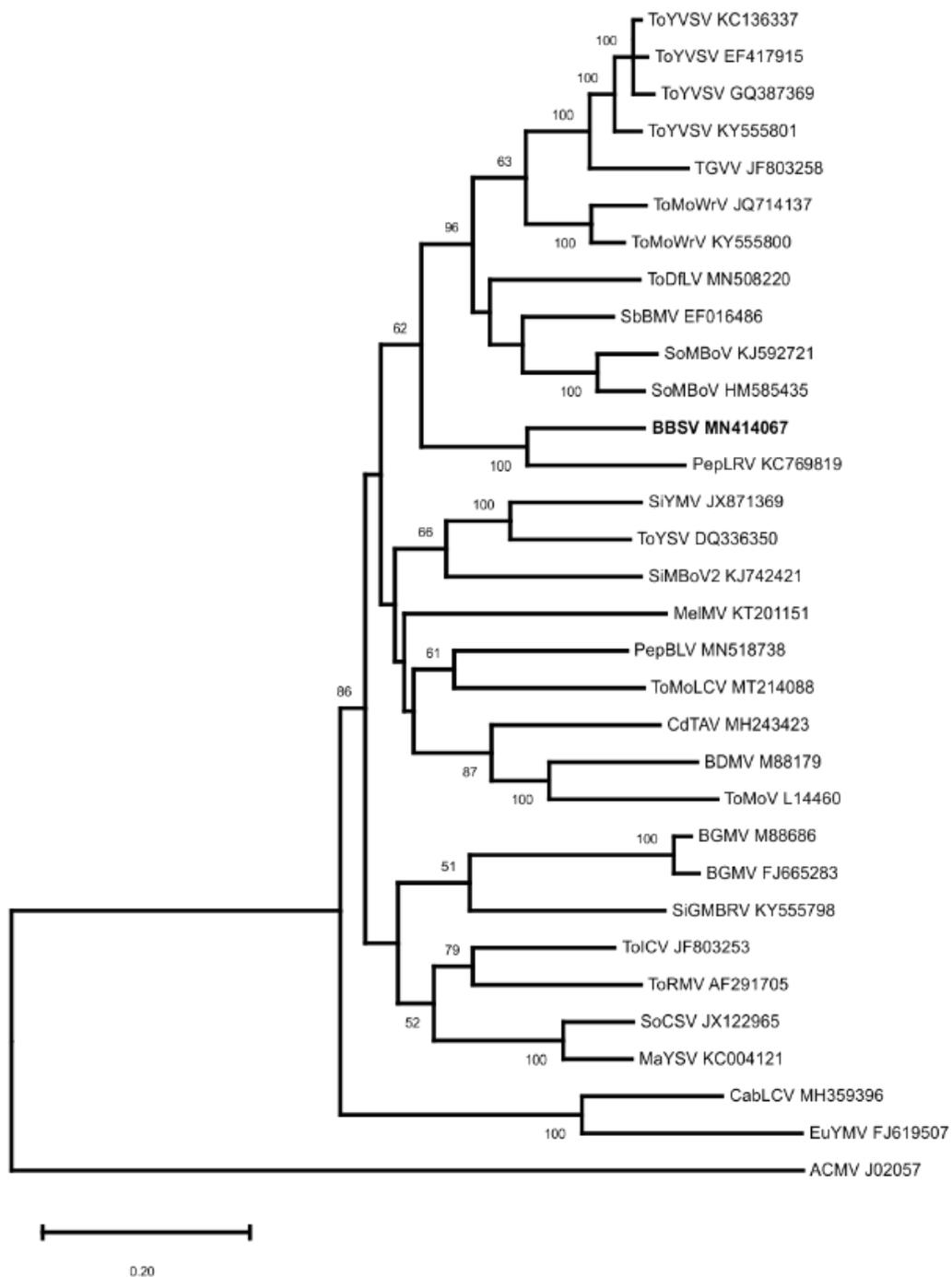


Figura 19. Árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento y comparación de secuencias nucleotídicas completas de DNA-A de BBSV y otros begomovirus disponibles online que presentan altas similitudes o interés por su presencia en la zona de trabajo, similitud en la expresión de síntomas y rango de hospedantes. Las secuencias fueron alineadas con el programa MEGA X con la opción MUSCLE, y el árbol filogenético construido bajo el criterio de Maximum Likelihood (ML) con el modelo General Time Reversible I + G bootstrap replications 3000. Los acrónimos utilizados en el análisis son detallados en la Tabla 1.

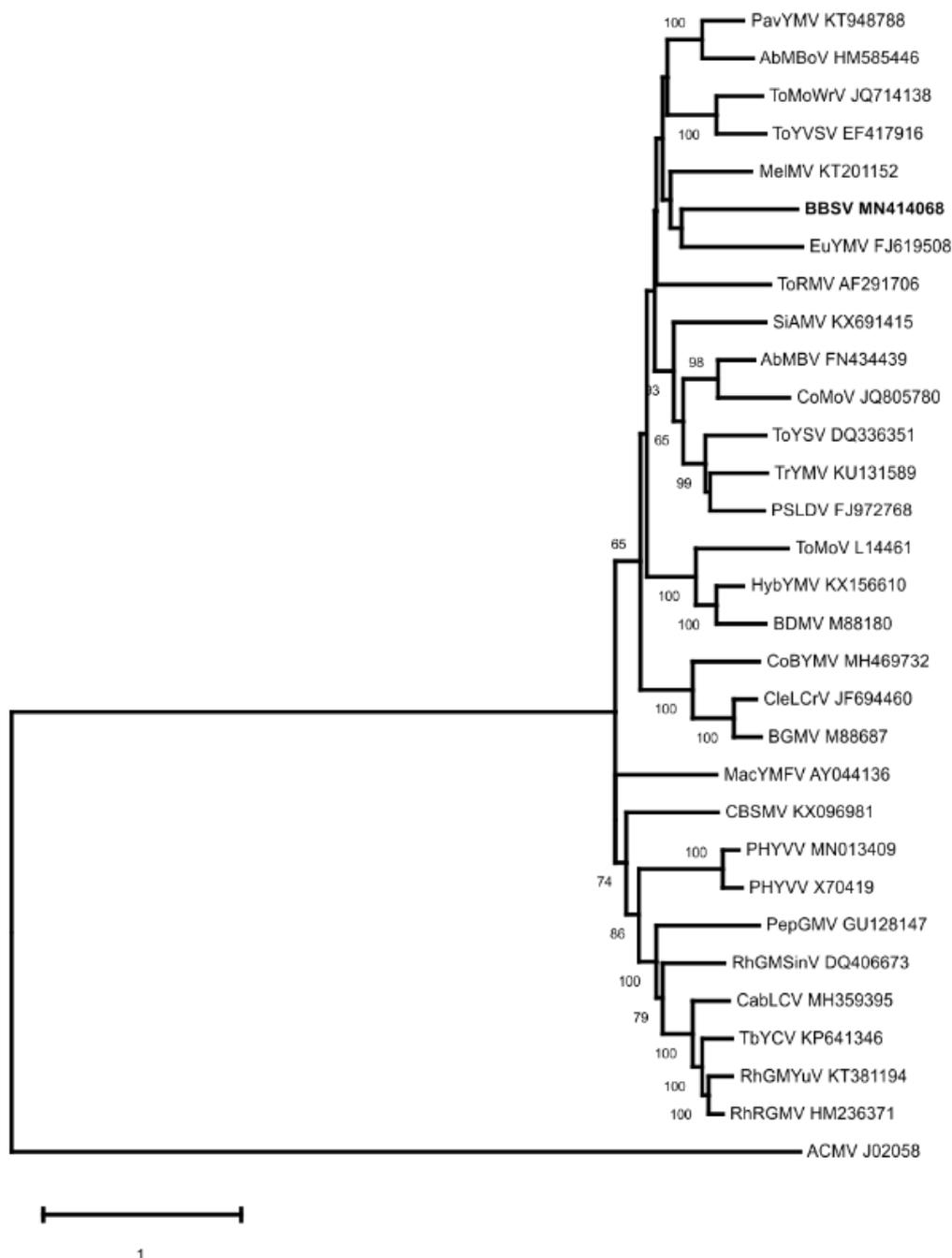


Figura 20. Árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento y comparación de secuencias nucleotídicas completas de DNA-B de BBSV y otros begomovirus disponibles online que presentan altas similitudes o interés por su presencia en la zona de trabajo, similitud en la expresión de síntomas y rango de hospedantes. Las secuencias fueron alineadas con el programa MEGA X con la opción MUSCLE, y el árbol filogenético construido bajo el criterio de Maximum Likelihood (ML) con el modelo General Time Reversible I + G bootstrap replications 3000. Los acrónimos utilizados en el análisis son detallados en la Tabla 1.

También se completaron mediante “primer walking”, las secuencias de los clones M9 Eco Rv 3, M9 Eco Rv 1 y M9 Eco Rv 4. Los dos primeros exhibieron similitudes de identidad del 93.66% y 88.13% con los componentes A y B de EuYMV respectivamente (Tabla 8), considerando a ambos como componentes de un nuevo aislamiento de EuYMV (Número de acceso GenBank MZ217125 y MZ217126) debido a que el porcentaje de identidad del DNA-A está por encima del límite de demarcación de nuevas especies (Brown et al., 2015). Por otro lado, el clon M9 Eco Rv 3, presentó una similitud del 84.31% con un virus de la especie *Tomato rugose yellow leaf curl virus*, por lo que este aislamiento sí se consideró un virus aún no descripto (Tabla 8, Figura 21).

Las secuencias de los clones M9 Eco Rv 10 y M9 Eco Rv 11, no fueron completadas mediante primer walking, sin embargo, se determinó que el 80% de las secuencias parciales obtenidas tienen una similitud próxima al 86% con el componente DNA-A de pepper blistering leaf virus. Es importante recalcar que, de acuerdo a los resultados obtenidos, la maleza *Euphorbia heterophylla* L. albergó al menos tres begomovirus distintos.

Tabla 8. Identidad de secuencias más cercanas para los componentes DNA-A y DNA-B de los clones aislados de la maleza *Euphorbia heterophylla* L.

Clon	DNA (componente)	Identidad asociada más cercana	% de identidad asociada
M9 Eco Rv 3	A	Tomato rugose yellow leaf curl virus	84.31
M9 Eco Rv 4	A	Euphorbia yellow mosaic virus	93.66
M9 Eco Rv 1	B	Euphorbia yellow mosaic virus	88.13

El DNA-A de M9 Eco Rv 3 posee una longitud de 2649 pb y los correspondientes marcos abiertos de lectura señalados para estos virus. Además, posee la región típica de origen de replicación viral (TAATATTAC) (Tabla 9). Para este aislado (Número de acceso GenBank MZ019476) se propone el nombre “euphorbia severe leaf golden mosaic virus” (EuSLGMV). Respecto a sus relaciones filogenéticas, se observa a EuSLGMV en un clado único, apartado, pero cercano a diferentes aislados del virus tomato rugose yellow leaf curl virus (Figura 22).

Tabla 9. Marcos abiertos de lectura correspondientes al componente DNA-A de EuSLGMV aislado de la maleza *Euphorbia heterophylla* L.

Orientación	Gen	Posición	Nº nts	Nº aa
+	CP (AV1)	235-996	762	253
-	Rep (AC1)	2641-1448	1194	397
-	TrAp (AC2)	1527-1138	390	129
-	Ren (AC3)	1391-993	399	132
-	AC4	2493-2074	366	121

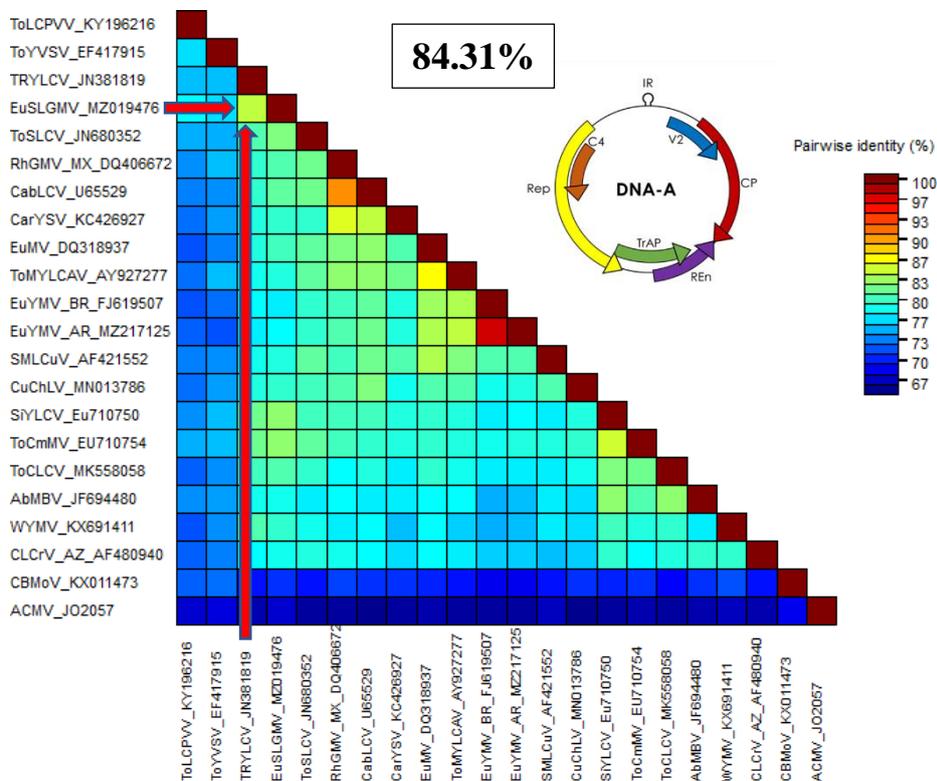


Figura 21. Comparación de secuencias nucleotídicas entre el DNA-A de EuSLGMV (clon M9 Eco Rv 3) y otros begomovirus obtenida mediante Sequence Demarcation Tools (SDT), con la opción de alineamiento Muscle. Las flechas rojas indican la mayor identidad observada (84.31%).

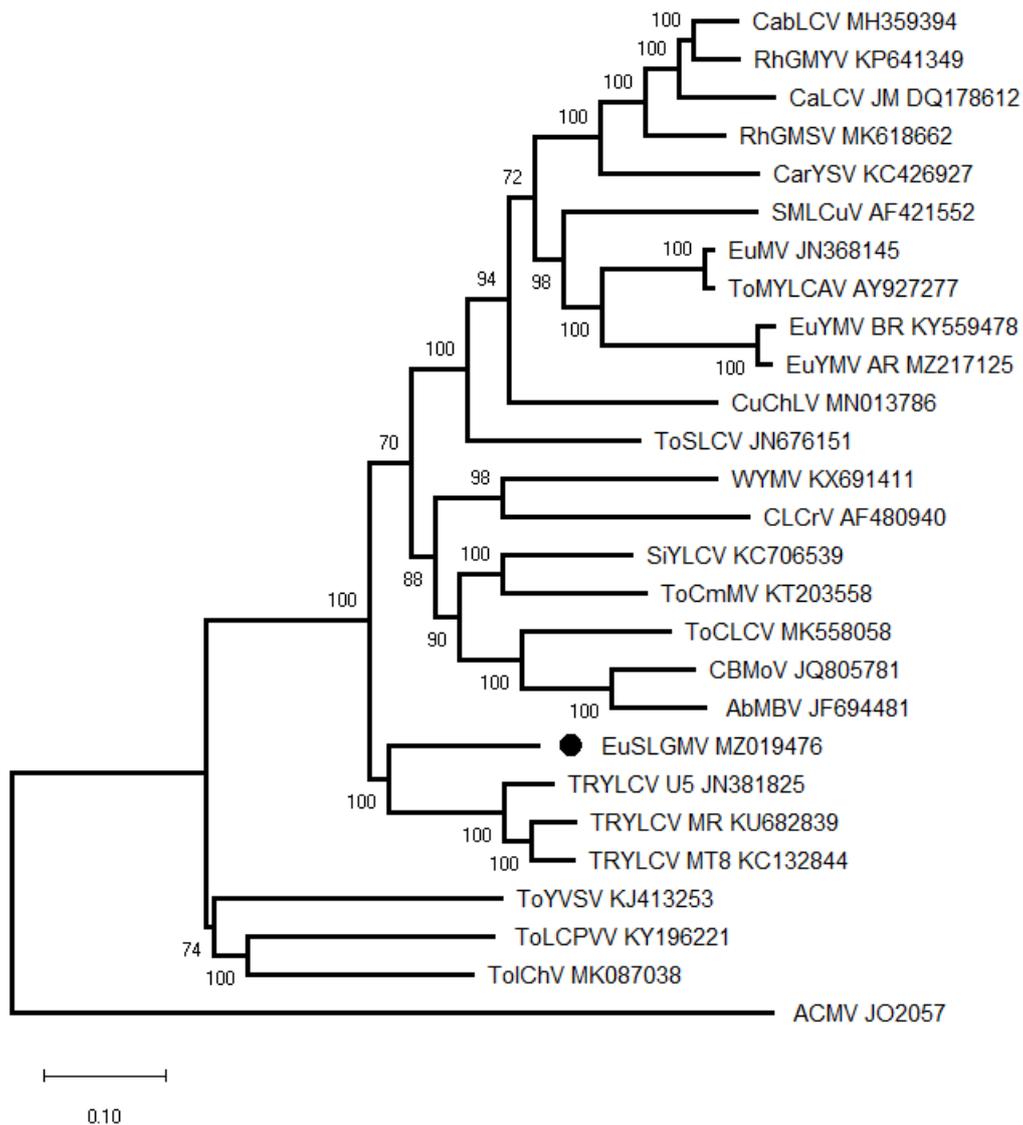


Figura 22. Árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento y comparación de secuencias nucleotídicas completas de DNA-A de EuSLGMV y otros begomovirus disponibles online que presentan altas similitudes o interés por su presencia en la zona de trabajo, similitud en la expresión de síntomas y rango de hospedantes. Las secuencias fueron alineadas con el programa MEGA X con la opción MUSCLE, y el árbol filogenético construido bajo el criterio de Maximum Likelihood (ML) con el modelo General Time Reversible I + G bootstrap replications 3000. Los acrónimos utilizados en el análisis son detallados en la Tabla 1.

2.4.3 Caracterización biológica de nuevos begomovirus

2.4.3.1 Ajustes de inoculación por biobalística

Un total de 28 plántulas de poroto fueron inoculadas con los componentes DNA-A y DNA-B del nuevo begomovirus bean bushy stunt virus, aislados a través de la enzima *Hind III* de los clones 179 Hind III-1 y 179 Hind III-8 respectivamente (Figura 23). Todas las plantas inoculadas en su primer par de hojas (unifoliadas) desarrollaron síntomas de enanismo, achaparramiento y enrollado de hojas independientemente del número de disparos y presiones empleadas. Por otro lado, las plántulas inoculadas en hipocótilos, no desarrollaron síntomas como tampoco los testigos mock inoculados (Figura 24).

Productos esperados de 1309 pb fueron amplificados con los primers específicos (5'- GAAGTTCTTCGCGTAACTGAG -3' / 5'- GAGATAAGCCTTGTGGAGAGCCAAC -3'; Tm= 56.5 °C) del componente DNA-A de BBSV (Figura 25).

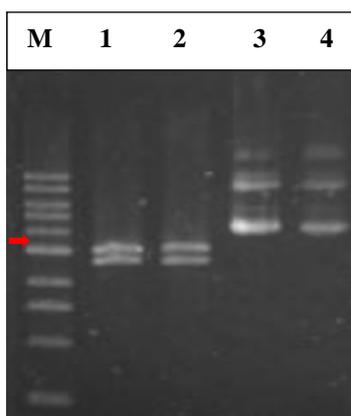


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los componentes genómicos de BBSV. M: Marcador de peso molecular 1 kb (Sigma-Aldrich). 1 y 2: DNA-A y DNA-B aislados mediante la enzima *Hind III* de su vector de clonación (~3000 pb). 3 y 4: Diluciones 1/10 de los plásmidos puros sin cortar. En flecha roja se indica el tamaño de banda correspondiente a los 3000 pb.



Figura 24. (A), planta de poroto inoculada con síntomas producidos por BBSV. (B), hoja en detalle con síntoma de achaparramiento y disminución de tamaño. (C), hoja de planta sin inocular.

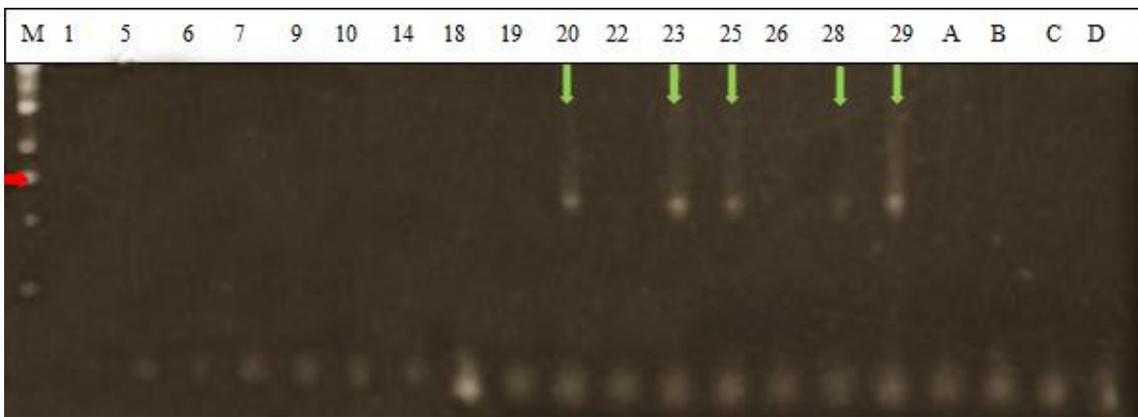


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR de muestras inoculadas por biobalística. (M) Marcador 1 kb (Sigma-Aldrich). 1 a 18 corresponden a plántulas inoculadas en hipocótilos. 19 a 29 corresponden a plántulas inoculadas en el primer par de hojas unifoliadas (se observan amplificaciones en 20, 23, 25, 28 y 29). (A) Mock inoculado a 650 psi y (B) a 1100 psi, (C) testigo sano de poroto, (D) mix. Se indica el tamaño de banda correspondiente a los 1500 pb (flecha roja), y las muestras positivas para el tamaño de banda 1309 pb (flechas verdes).

2.4.3.2 Rango de hospedantes

Ninguna de las plantas inoculadas con los componentes DNA-A y DNA-B de EuYMV desarrolló síntomas de enfermedad, y sus amplificaciones por PCR fueron negativas, a diferencia de los cultivares de poroto y soja que sí presentaron síntomas asociados a enfermedad (tal como se observó en el punto 2.3.3.1) cuando fueron inoculadas por BBSV. La ausencia de síntomas en plantas inoculadas por EuYMV y en

tomate, pimiento, arabidopsis, cola de león y afata inoculadas por BBSV, también se reflejó en resultados negativos de amplificación por PCR (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de observación de síntomas y PCR para las distintas especies de plantas inoculadas por BBSV y EuYMV.

	BBSV		EuYMV	
	Síntoma	PCR	Síntoma	PCR
Poroto	Sí	Sí	No	No
Soja	Sí	Sí	No	No
Tomate	No	No	No	No
Pimiento	No	No	No	No
Cola de León	No	No	No	No
Afata	No	No	-	-
Arabidopsis	No	No	-	-

Respecto a los cultivares de poroto, pudo notarse en Alubia una gran disminución del crecimiento y enrollado de hojas. Las plantas de NAG12 y LCR5, si bien pudieron desarrollar mayor número de hojas respecto a Alubia, las mismas presentaron marcado ampollado, aguzado y clorosis internerval; además se observó disminución del crecimiento. Las plantas de soja, también presentaron ampollado de hojas y crecimiento reducido (Figura 26 y 27).

El análisis de las plantas inoculadas por BBSV, pone en manifiesto que los síntomas observados en soja y poroto se correlacionan con la presencia del virus, ya que se logró amplificar el tamaño de fragmento esperado de 1309 pb (Figura 28). Sólo una muestra resultó negativa (muestra 16), se trata de una planta de poroto cultivar NAG12 que tampoco presentó síntomas.

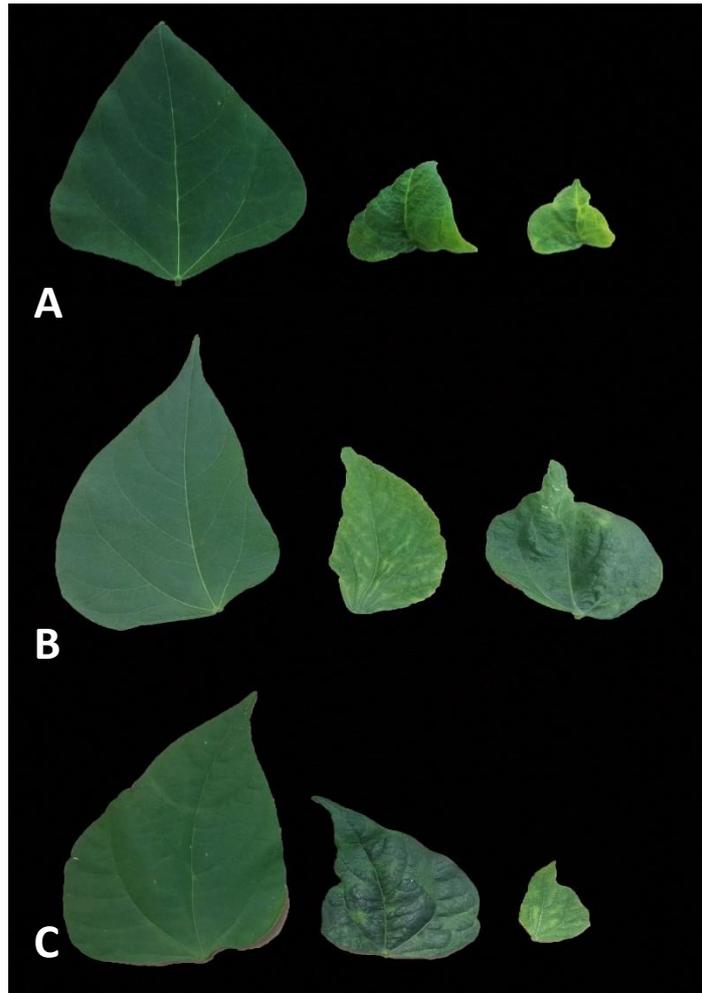


Figura 26. Distorsiones observadas en hojas inoculadas de los cultivares de poroto Alubia (A), LCR5 (B) y NAG12 (C). El primer foliolo, de izquierda a derecha, corresponde a uno de planta sana para cada cultivar correspondiente.

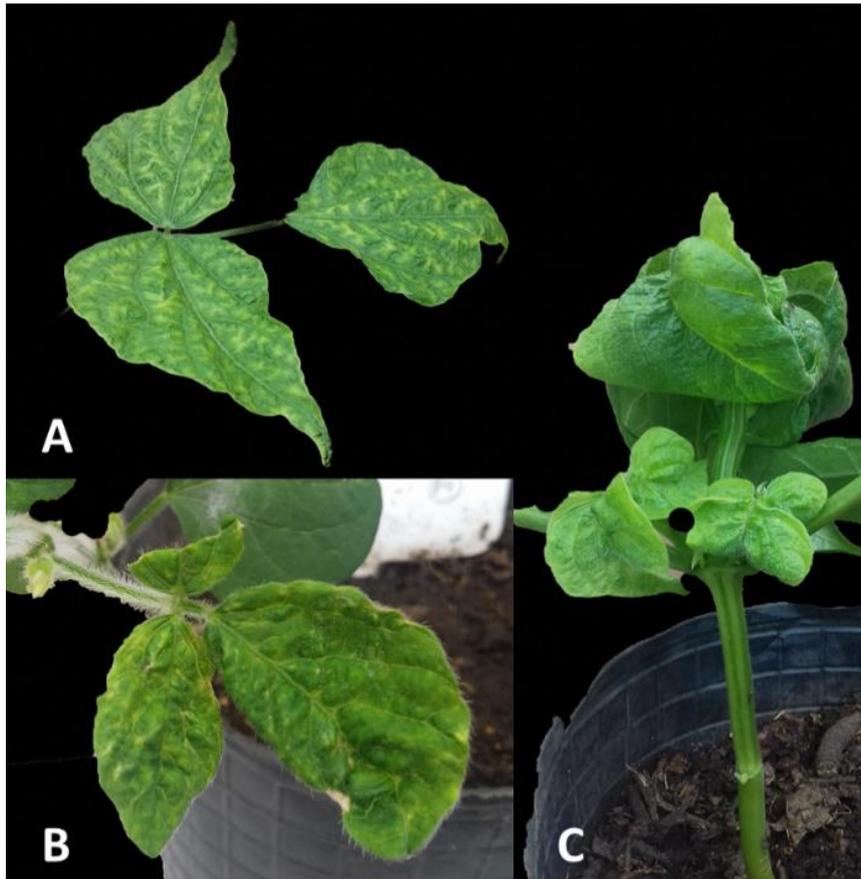


Figura 27. Síntomas observados en hojas y plantas inoculadas con BBSV de (A) poroto cultivar LCR5, (B) soja y (C) poroto cultivar Alubia.

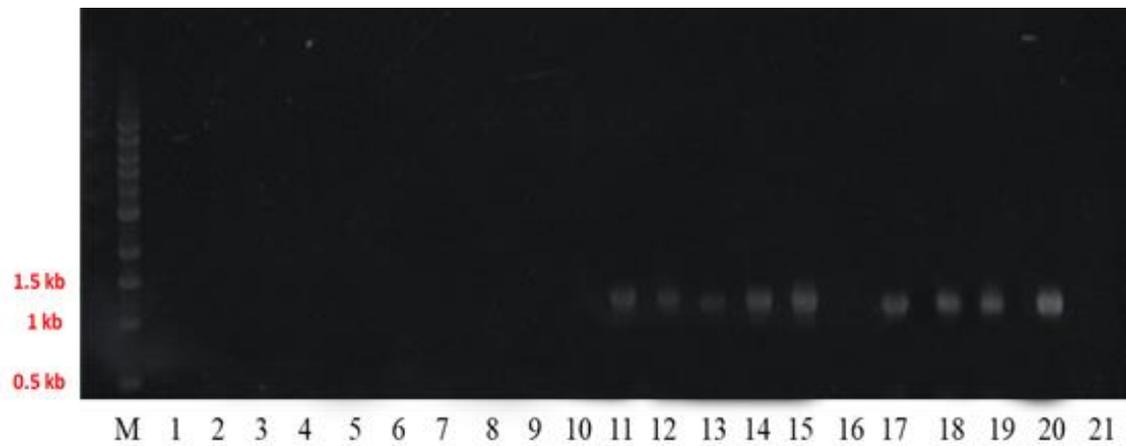


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de diferentes especies vegetales inoculadas con BBSV. (M) Marcador 1 kb (Sigma-Aldrich). 1 a 4 corresponden a tomate, 5 a 8 pimiento, 9 cola de león (*Leonorus sibiricus* L.), 10 afata (*Malvastrum coromandelianum*), 11 a 13 soja, 14 a 19 poroto, 20 control positivo, 21 mix.

2.5 Discusión

En Argentina, la primer epifitía ocasionada por begomovirus se observó en la década del '80 y fue consecuencia de la expansión geográfica de los cultivos de soja y algodón (Morales & Anderson, 2001). En adición, la presencia de una importante especie críptica de mosca blanca, la New World 2 (NW2), y dos especies introducidas, Middle East-Asia Minor one (MEAM1) y Mediterranean, fue confirmada en cultivos de poroto en el norte argentino (Alemandri et al., 2015). Así es, que es común observar la presencia de begomovirus en poroto, cultivos cercanos y malezas. Hasta el momento, en Argentina, se han identificado y caracterizado seis begomovirus, BGMV, ToYSV, SbBMV, ToMoWV, ToYVSV y SiGMBRV, afectando cultivos de poroto (Barreto et al., 2013; Rodríguez-Pardina et al., 2006; Rojas et al., 2005).

Pruebas de detección de estos patógenos basadas en sondas de hibridación de DNA muestran su presencia permanente en las regiones productivas del norte del país (Reyna et al., 2021; Rodríguez-Pardina et al., 2006; Varela et al., 2018). Tal es el caso de la provincia de Salta, que presentó, en este trabajo, durante los tres años evaluados, la mayor incidencia y diversidad de especies. Estos hechos son muy importantes ya que podrían dar lugar a nuevas especies a través de procesos como la recombinación o pseudo-recombinación (Blawid et al., 2013; Rojas et al., 2005). De esta forma, las sondas de detección específicas pueden ayudarnos a demostrar la presencia de begomovirus previamente reportados o dar pista sobre la presencia de especies desconocidas. Sin embargo, pueden ocurrir falsos negativos como se observó inesperadamente en tres muestras correspondientes a aislados de BGMV (165 Hind III, 168 Hind III y 180 Bam HI) que no pudieron ser detectadas por su sonda específica. Es posible que las extracciones de DNA viral no fueran las ideales o que el título viral fuera bajo (Aidawati et al., 2007). Por otro lado, del total de muestras recolectadas, solo el 31.75% estaba infectado con begomovirus; por lo que las restantes podrían tener la causa de sus síntomas en otros virus (Rodríguez Pardina, 2020; Rodríguez Pardina et al., 2004) u otros agentes como los herbicidas (Rodríguez Pardina et al., 2018).

En este capítulo se reportó y caracterizó a BBSV, un nuevo begomovirus que infecta cultivos de poroto en Argentina (Reyna et al., 2021), y de manera parcial a EuSLGMV (ya que su componente genómico DNA-B no fue hallado para su caracterización) en infección mixta con euphorbia yellow mosaic virus infectando la maleza *Euphorbia heterophylla* L. En los análisis correspondientes, se determinó que el

componente genómico DNA-A de BBSV tiene la mayor identidad con PepLRV, un begomovirus detectado en Colombia que infecta al ají (*Capsicum spp.*) y causa síntomas similares de enrollamiento de hojas. También se observó en poroto, con valores de alta incidencia, e infectando plantas silvestres como *Nicandara physaloide* (Martínez-Ayala et al., 2014). Además, otros begomovirus se agruparon filogenéticamente con BBSV y PepLRV, incluido ToMoWV, un begomovirus recombinante entre ToYVSV y SbBMV, detectado en tomate (Vaghi Medina et al., 2014). ToYVSV también fue reportado en tomate y papa en Brasil (Albuquerque et al., 2010) y SbBMV fue reportado infectando poroto, soja y tomate en Argentina (Rodríguez Pardina et al., 2011). Todos ellos fueron reportados en Argentina infectando poroto (Varela et al., 2018). Por otro lado, el componente genómico DNA-B de BBSV, tiene la mayor identidad con MelMV, un begomovirus aislado en Brasil de la maleza *Melochia sp.*, esta especie es una maleza común en América del Sur, que a menudo crece cerca de cultivos económicamente importantes (Fiallo-Olivé, Zerbini, & Navas-Castillo, 2015). Otro begomovirus relacionado filogenéticamente fue euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV) aislado de *Euphorbia heterophylla* L. en Brasil (Fernandes et al., 2011) y también casualmente de la misma maleza en este trabajo, sin embargo, BBSV fue detectado en una zona productiva distinta (General Mosconi, Salta) de donde se reporta a EuYMV (Leales, Tucumán).

La inoculación por biobalística permitió determinar y confirmar que la soja y el poroto común son los cultivos hospederos más importantes de BBSV. Por otro lado, algunos virus detectados en poroto en Argentina, como SbBMV, ToYSV, ToYVSV y ToMoWV, también infectan tomate y pimiento (Albuquerque et al., 2010; Rodríguez Pardina et al., 2011; Vaghi Medina et al., 2014), mientras que PepLRV, el miembro más estrechamente relacionado con BBSV, infecta pimiento y poroto (Martínez-Ayala et al., 2014). Sin embargo, BBSV no pudo infectar tomate ni pimiento, dos cultivos que también se producen en el noroeste argentino. Este restringido rango de huéspedes podría limitar la posibilidad que BBSV evolucione rápidamente y cause mayores pérdidas económicas. Sin embargo, debe considerarse que los resultados de los experimentos de inoculación, no siempre se corresponden a la misma situación bajo infecciones naturales a campo dadas por su insecto vector, donde la expresión de síntomas y la variedad de huéspedes puede variar. Además, de acuerdo con las relaciones filogenéticas de BBSV y su similitud genética con begomovirus aislados de malezas como *Melochia sp.* (Fiallo-Olivé et al., 2015), *Nicandra physaloides* (Martínez-Ayala et al., 2014) y *Euphorbia heterophylla*

(Fernandes et al., 2011; Zambrano, Fernández-Rodríguez, & Marys, 2012), es necesario realizar ensayos de inoculación no solo en plantas de valor económico, sino también en malezas ya que pueden constituir los reservorios y fuentes primarias de estos patógenos. Tal es el caso de las malezas analizadas en este capítulo, donde pudo observarse una alta incidencia de infecciones mixtas, aportando y consolidando estudios que reportan la gran capacidad de estas especies vegetales de albergar y ser sumidero de nuevos begomovirus (Barreto et al., 2013; Blawid et al., 2013; Ferro et al., 2017; Tavares et al., 2012). Así, por ejemplo, aquí se reporta a EuSLGMV, una nueva especie que se detectó infectando a la maleza “lecherito” en infección mixta con aislamientos de EuYMV y posiblemente otros begomovirus. A su vez, EuSLGMV mostró un parentesco cercano a begomovirus que se encontraron infectando cultivos de tomate en distintas regiones como Corrientes (Argentina) (Ben Guerrero et al., 2013), Salto Grande (Uruguay) (Márquez-Martín et al., 2012) y Brasil (Fonseca, Boiteux, & Costa, 2016).

Esta información es muy importante, ya que estos huéspedes silvestres son muy comunes en las áreas de producción y podrían funcionar como puentes verdes para la transmisión de BBSV y otros begomovirus (Blawid et al., 2013). A su vez, cabe señalar que los cultivos de soja y poroto se cultivan en la misma zona de producción en el norte argentino (Vizgarra et al., 2006) aunque en diferentes épocas, coincidiendo la etapa de madurez de la soja con la siembra y el inicio del crecimiento del poroto; así, este último cultivo se vuelve más apetecible para diferentes plagas como la mosca blanca. Por estas razones, es posible esperar el desarrollo de nuevos brotes epidémicos de begomovirus.

La gran variabilidad de los begomovirus, su capacidad de evolucionar, de generar nuevos individuos, su relación con el vector y la presencia de hospedantes alternativos favorecen la aparición de nuevas especies; por lo tanto, este hecho puede ser muy importante debido a los efectos negativos de este grupo de virus en los sistemas de producción. Más especies de begomovirus pueden existir; por lo tanto, el conocimiento de estos nuevos virus y su caracterización molecular y biológica son necesarios para contribuir con información para el desarrollo de estrategias de control y el manejo de enfermedades.

2.6 Conclusión

Se confirmó la presencia de begomovirus en lotes de producción de poroto en el norte argentino, y en malezas asociadas, con incidencias que varían año a año. Se observó una amplia distribución de estos patógenos en la región norte del país, donde las provincias de Salta y Jujuy presentan la mayor diversidad e incidencia de begomovirus.

Las seis especies, hasta el momento reportadas infectando poroto, se encuentran presentes y en muchas ocasiones participando en infecciones mixtas, principalmente en malezas. BGMV, ToMoWV y ToYVSV fueron las especies más incidentes. Aun así, se observó un alto porcentaje de begomovirus sin identificar.

Una nueva especie, con afinidad por leguminosas como soja y poroto, de nombre propuesto bean bushy stunt virus (BBSV) fue identificada y reportada. En malezas asociadas, se observó una alta incidencia de infecciones mixtas, comportándose las mismas como posibles reservorios de nuevos virus. Tal es el caso de la maleza *Euphorbia heterophylla* L., que albergó al menos tres begomovirus distintos, uno de ellos de nombre propuesto euphorbia severe leaf golden mosaic virus (EuSLGMV) el cual posee una identificación parcial debido a la falta de caracterización de su componente genómico DNA-B.

La caracterización biológica de BBSV fue factible mediante el ajuste de un sistema de inoculación por biobalística. Este instrumento permite explorar rango de hospedantes y cumplir con los postulados de Koch, comportándose como una herramienta válida para la caracterización biológica de begomovirus.

**MODELADO DE INCIDENCIA DE BEGOMOVIRUS EN EL NOA A TRAVÉS
DE VARIABLES BIOMETEOROLÓGICAS**

3.1 Introducción

El poroto se cultiva en la región noroeste de Argentina (NOA), siendo Salta el principal productor, seguida de Jujuy, Tucumán, Santiago del Estero, Catamarca y el norte de la provincia de Córdoba (Maggio, 2021; MHyFP, 2016). Esta región posee un clima caracterizado por veranos muy cálidos y húmedos, con inviernos suaves y secos, estando sujeto a sequías periódicas (Gentile, Martin, & Gatti, 2020).

Varios factores pueden afectar el rendimiento de los cultivos de poroto, entre ellos, las enfermedades virales (Casalderrey, 2018; Maggio, 2021; Rodriguez Pardina, 2020). En Argentina, la enfermedad viral más importante en estos cultivos es la causada por begomovirus. Las pérdidas estimadas en la producción de granos por estos patógenos puede variar entre el 40 y el 100% dependiendo del manejo agronómico realizado, la tolerancia de los cultivares, las poblaciones del insecto vector y las condiciones ambientales (Cuéllar & Morales, 2006; Fekete, 2010; Morales & Anderson, 2001). La presencia de *B. tabaci* es fundamental para la aparición de brotes de begomovirus, ya que a mayor población de mosca blanca, mayor incidencia de virus y los daños que ellos ocasionan (Morales, 2006). Es posible que el complejo mosca blanca-virus esté influenciado por variables meteorológicas que repercutan en los niveles poblacionales del vector, en su comportamiento con el hospedero y con los virus capaces de transmitir o en la susceptibilidad del cultivo, influenciando de esta manera sobre la incidencia del patógeno (Alemandri et al., 2012; Cuéllar & Morales, 2006; Inoue-Nagata, Lima, & Gilbertson, 2016; Krause-Sakate et al., 2020).

El monitoreo de enfermedades en cultivos es una labor necesaria e intensiva que consume tiempo y a menudo requiere de métodos destructivos. Por ello, contar con modelos predictivos de probabilidad de desarrollo de una enfermedad en un sitio particular según el ambiente en el cual se desarrollará el patosistema moscas blancas-begomovirus-cultivo, permite ahorrar tiempos y recursos, y planificar de mejor manera distintas técnicas de manejo, como la selección de cultivares tolerantes/resistentes, el uso de distintas fechas de siembra, agroquímicos, coordinar logísticas etc., con el fin último de evitar posibles pérdidas ocasionadas por estos patógenos (Raza, Harding, Liebman, & Leandro, 2020).

La alta dimensionalidad y la correlación entre las múltiples variables candidatas a predictoras para la estimación de un modelo estadístico capaz de predecir la enfermedad de un cultivo en función del ambiente, determina la necesidad de recurrir a herramientas

metodológicas estadísticas que permitan reducir esta dimensionalidad y modelar estas relaciones de enfermedad-ambiente. El objetivo de este capítulo fue el de construir un modelo logístico de predicción de probabilidad de presencia de enfermedad utilizando las variables biometeorológicas que más favorecen la presencia y distribución de begomovirus.

3.2 Objetivos

Modelar la probabilidad de incidencia de begomovirus determinando las variables biometeorológicas de mayor influencia.

3.3 Materiales y métodos

Para evaluar la incidencia relativa de begomovirus en relación a variables climáticas, durante 14 campañas de producción comprendidas entre los años 2001 a 2018, se monitorearon lotes de cultivo de poroto localizados en la región norte de Argentina. Se recolectaron un total de 2014 muestras sintomáticas que fueron evaluadas por sondas de hibridación general que detectan a todas las especies de begomovirus, de acuerdo al protocolo previamente descripto por Rodríguez Pardina et al., 2011.

Para la generación de la base de datos climáticos, primero se realizó el proceso de depuración de datos espaciales que incluyó la homologación de coordenadas espaciales y eliminación de “outliers” globales. El proceso de extracción de las variables climáticas se efectuó utilizando la librería “Climate” de R (Czernecki, Głogowski, & Nowosad, 2020). Para cada punto (lote muestreado) se buscaron las cinco estaciones climáticas más cercanas. Las variables climáticas empleadas (14) fueron: Temperatura media (AVT), Temperatura máxima (MXT), Temperatura mínima (MNT), Temperatura de punto de rocío media (TdAV), Humedad relativa media (AVH), Humedad relativa mínima (MNH), Humedad relativa máxima (MXH), Dirección del viento (WDR), Intensidad del viento (WIn), Presión atmosférica (ATP), Precipitación acumulada (TPP), Nubosidad total (TCI), Nubosidad baja (lCI) y Visibilidad (VIS). Se realizó una interpolación espacial para cada variable climática por la cantidad de “ventanas de tiempo” consideradas (ventanas semanales, cada 10 días o mensuales) desde seis meses anteriores a la siembra del cultivo hasta el final de su ciclo. Para denotar cada variable biometeorológica se utilizó un código conformado por tres letras y el número del mes. Cuando los datos fueron tomados de a dos periodos decádicos (veinte días) se usó guion

bajo con los números 1 o 2 para indicar si son los primeros veinte días o los segundos veinte días del mes. Por ejemplo, ATP9 = Presión atmosférica del mes 9 (septiembre), ATP9_1 = Presión atmosférica mes de septiembre primeros 20 días. En el caso de usar subperíodos decádicos se usó la letra “d” más un número que corresponde a la decena considerada desde la fecha de siembra del cultivo, por ejemplo, MXT_d1 = máxima temperatura decena 1 o primeros 10 días después de la siembra.

La base de datos begomovirus-poroto consistió en 2014 observaciones de presencia o ausencia de begomovirus, registradas desde los años 2001 a 2018. A partir de estos datos se calculó la incidencia relativa sumando las muestras positivas de un punto geográfico y dividiendo por el total de muestras en ese punto, resultando en 156 puntos geográficos para el análisis (Figura 29).

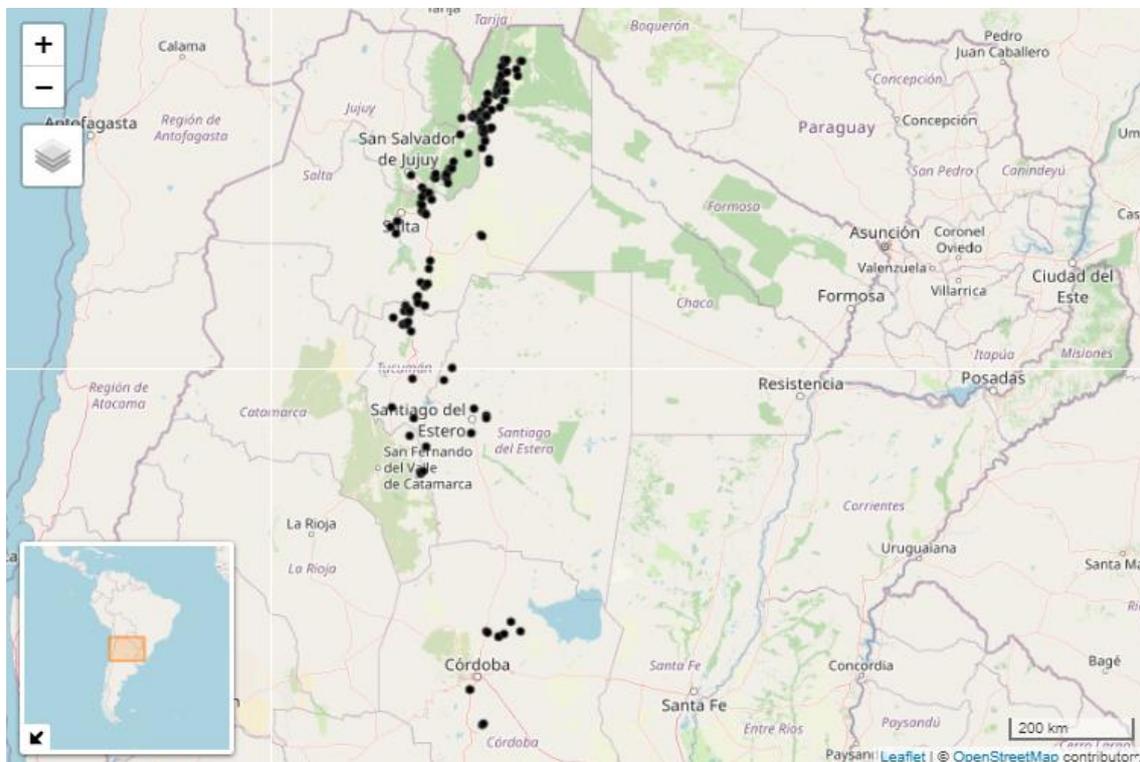


Figura 29. Localización de los puntos de muestreo analizados.

Estos puntos fueron clasificados en incidencia relativa moderada (≤ 0.50) o severa (> 0.50). La ventana de tiempo para la extracción de datos fue de 10 días. Posteriormente las variables climáticas fueron colapsadas en meses.

La selección de variables se realizó mediante el algoritmo Boruta (Kursa & Rudnicki, 2010) que se ejecutó utilizando el paquete "Boruta" de R.4.0 (R Core Team, 2020) empleando la incidencia relativa como variable dependiente. Luego, mediante la técnica de regresión logística se estimó la probabilidad de incidencia mayor o menor a

0.5 en base a varias de las variables regresoras seleccionadas (modelo de regresión logística) (Agresti & Tarantola, 2018). Si para un año y sitio específico el valor predicho por la ecuación es >0.5 , entonces la incidencia se clasificó como “Alta”. Dado que el algoritmo Boruta hace una selección que deja pasar muchas variables, también se aplicó el método de selección de variables Stepwise junto con el ajuste del modelo de regresión logística.

Para la evaluación de los modelos se consideró la precisión de la predicción, la sensibilidad (el porcentaje de valores predictivos positivos o de incidencia alta que son clasificados como positivos), y la especificidad (porcentaje de valores con baja incidencia que son clasificados como de baja incidencia) (Carmona, Moschini, Cazenave, & Sautua, 2010). Las curvas ROC (Receiver Operating Characteristics) se emplearon para determinar la capacidad discriminante de los modelos empleados (Aldas Manzano & Uriel Jimenez, 2017).

Finalmente, la capacidad predictiva de los modelos generados a partir del análisis de regresión logística se probó utilizando un procedimiento de validación cruzada que dejó un 30% de las observaciones, seleccionadas al azar, como conjunto de validación y que consecuentemente fueron excluidos desde el conjunto de datos usados para el desarrollo del modelo. El procedimiento se repitió 30 veces.

3.4 Resultados

La selección por medio del algoritmo Boruta clasificó diez variables como importantes y doce como tentativas (Figura 30).

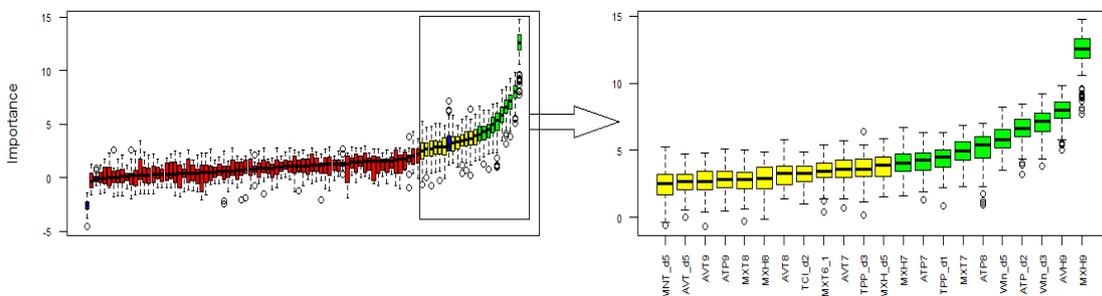


Figura 30. Clasificación de variables según algoritmo Boruta. Rojo: Variables no importantes, Amarillo: Variables tentativas, Verde: Variables importantes.

Después del procedimiento Stepwise, usando las variables importantes y tentativas, la regresión logística para la predicción de la incidencia de begomovirus incluyó a las variables Máxima temperatura de la primer decena de junio (MXT6_1), Máxima temperatura de julio (MXT7), Temperatura media de julio (AVT7), Máxima temperatura de agosto (MXT8), Temperatura media de agosto (AVT8), Humedad promedio de septiembre (AVH9) y Total de precipitaciones decena 1 (TPP_d1) (precipitaciones acumuladas 10 días antes de la fecha de siembra). En la Tabla 11 se presentan los valores de los coeficientes de cada variable que participó de la regresión.

Tabla 11. Coeficientes de regresión logística para la incidencia de begomovirus en poroto en el norte argentino.

	Estimado	Error Est.	Valor z	Pr (> z)	
Intercepto	9.074954	10.029238	0.905	0.365545	
MXT6_1	-0.359981	0.123301	-2.920	0.003506	**
MXT7	2.149612	0.722430	2.976	0.002925	**
AVT7	-2.324162	0.696170	-3.338	0.000842	***
MXT8	-2.198954	0.551301	-3.989	6.64e-05	***
AVT8	3.614615	0.860716	4.200	2.67e-05	***
AVH9	-0.420841	0.099897	-4.213	2.52e-05	***
TPP_d1	-0.015209	0.007135	-2.132	0.033041	*

Significancia: 0 “****”, 0.001 “***”, 0.01 “**”, 0.05 “.”, 0.1 “”, 1.

En la Tabla 12 se presentan los resultados obtenidos de la validación cruzada para el modelo.

Tabla 12. Medidas de precisión, sensibilidad y especificidad para los modelos ajustados.

	Precisión	Sensibilidad	Especificidad
Begomovirus - Poroto	0.80	0.71	0.86

De esta manera, el modelo obtenido quedó formulado de acuerdo a la Figura 31, donde MXT6_1 es la máxima temperatura en la primera decena de junio, MXT7 es la máxima temperatura de julio, AVT7 es la temperatura media de julio, MXT8 es la máxima temperatura de agosto, AVT8 es la temperatura media de agosto, AVH9 es la humedad promedio de septiembre y TPP_d1 es el total precipitaciones acumuladas en la decena 1 (10 días antes de la siembra).

$$\text{Probabilidad de incidencia} = 9.07 - 0.36 \cdot \text{MXT6_1} + 2.14 \cdot \text{MXT7} - 2.32 \cdot \text{AVT7} - 2.20 \cdot \text{MXT8} + 3.61 \cdot \text{AVT8} - 0.42 \cdot \text{AVH9} - 0.015 \cdot \text{TPP-d1}$$

Figura 31. Modelo predictivo de probabilidad de incidencia de begomovirus en cultivos de poroto.

El análisis de las curvas ROC mostró que el modelo tiene una buena capacidad para diferenciar sitios con alta probabilidad de alta incidencia de aquellos con alta probabilidad de baja incidencia (Figura 32).

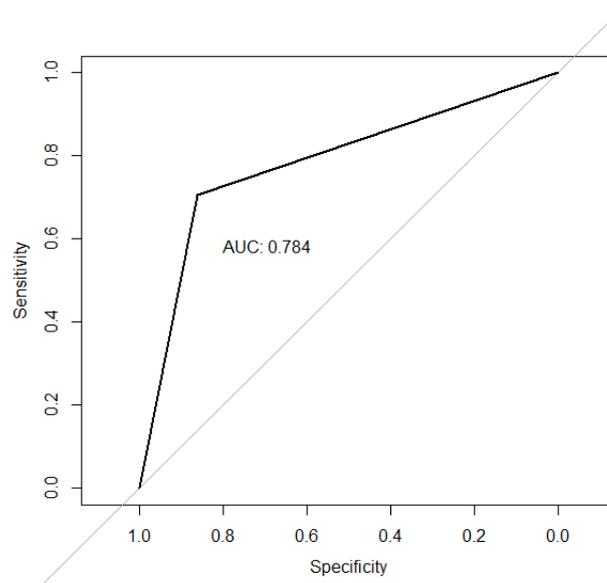


Figura 32. Curvas ROC y Área debajo de la curva (AUC). Begomovirus – Poroto.

3.5 Discusión

La distribución geográfica de cada enfermedad es variable, estando relacionada, en gran parte, con las condiciones ambientales prevalentes de cada zona donde se desarrolla el cultivo afectado. Las enfermedades causan pérdidas económicas por disminución de la cantidad y calidad de los productos, y por los incrementos en los costos de producción por la necesidad de utilizar agroquímicos o semillas mejoradas en términos de resistencia a agentes patógenos u otros (Vizgarra, 2012; Vizgarra et al., 2012; Vizgarra, et al., 2006).

En este patosistema (begomovirus-poroto), y a través del modelo predictivo logrado, se determinó a los parámetros de temperaturas máximas invernales, humedad relativa (Hr) de septiembre y a las precipitaciones (pp) 10 días antes de la siembra como las variables más explicativas de incidencias de begomovirus con una eficiencia predictiva del 82%.

Como en muchas otras enfermedades (Alemndri et al., 2012; 2021; Moschini & Fortugno, 1996; Pozzi et al., 2020), la importancia, distribución e incidencia de los begomovirus está directamente asociada a la distribución y dinámica poblacional de su insecto vector (Morales, 2006). Según Morales, estas particularidades dependen en gran medida de las condiciones climáticas que favorecen la reproducción del vector: temperaturas generalmente cálidas, humedad relativa moderada y precipitaciones relativamente bajas a moderadas (Morales, 2006).

En este trabajo, las variables seleccionadas e incluidas en el modelo, concuerdan con lo expuesto por Morales & Jones (2004) donde indican que, si los inviernos anteriores a la siembra son cálidos, la población del vector no se ve afectada y el número de individuos aumenta conforme a la temperatura. También Krause-Sakate et al., 2020, sugieren que las poblaciones de moscas blancas son afectadas por condiciones de temperaturas extremas, baja Hr (<60 %), la persistencia de lluvias y la no adaptación a elevaciones superiores a los 1000 msnm. Los autores sostienen que la temperatura es uno de los parámetros más críticos en el desarrollo del insecto, influenciando en su colonización, comportamiento y distribución. Jones (2009) y Morales (2004) reafirman lo comentado, argumentando que la incidencia de *B. tabaci*, en general, es más alta en regiones con una estación seca (Heinemann et al., 2016), de al menos 4 meses, con un registro de precipitaciones inferiores a 80 mm y una temperatura media mensual de no

menos de 21 °C en los meses más cálidos del año. Es probable que tales condiciones ocurran en áreas cada vez más amplias a medida que el calentamiento global avance.

Dentro de los factores citados, la temperatura es esencial para el desarrollo de vida del vector. En promedio, el ciclo de vida oscila entre los 17 a 27 días, pero puede ser completado entre 12-14 a 43-49 días dependiendo de las condiciones de calor o frío, respectivamente. Su rango de temperatura de desarrollo es muy amplio, siendo las más favorables entre 16 y 24 °C. Las temperaturas por debajo de los 9 °C y por encima de los 40 °C son letales para el insecto. En cuanto a la Hr, la óptima está entre el 30 y 60% (Ghosh et al., 2019; Morales & Jones, 2004; Picó et al., 1996). Otros autores también citan al fotoperíodo como factor necesario para un óptimo desarrollo del insecto (Polston & Capobianco, 2013) y la altitud (Alemandri et al., 2012; Morales et al., 2006).

Es importante tener en cuenta que, hasta el momento, no se había desarrollado un modelo predictivo de incidencia de begomovirus en cultivos de poroto como el que se presenta en este capítulo. Sin embargo, la caracterización y las observaciones antes mencionados por los distintos autores les proveen coherencia y un gran respaldo a las variables predictoras seleccionadas. Ahora bien, los modelos son un recorte de la realidad y su ajuste y aplicación debe contemplar otros factores, como la susceptibilidad del cultivo, la disponibilidad de hospederos alternativos que posibilitan la alimentación y reproducción de los vectores, el manejo agronómico realizado, etc. En este marco, el desarrollo de modelos predictivos podría componer sistemas de alerta temprana para la toma de decisiones de manejo de cultivos y, en consecuencia, reducir los riesgos de infección, sin embargo, no debe omitirse que la predicción de la probabilidad de desarrollo de una enfermedad en un cultivo es característica particular y exclusiva de cada patosistema y puede alterarse por factores no considerados.

3.6 Conclusión

El uso de herramientas estadísticas en el análisis de variables ambientales para evaluar su relación con la presencia/ausencia de begomovirus es muy útil para simplificar la alta dimensionalidad de la misma. Así es que, dentro del patosistema evaluado, se determinó a la temperatura, humedad y precipitación en épocas de pre-siembra, como las variables meteorológicas de mayor impacto en la incidencia o presión de enfermedad ocasionada por estos patógenos.

El modelo predictivo logrado, basado en las variables mencionadas, posee una buena capacidad predictiva, con alta precisión, sensibilidad y especificidad.

El trabajo realizado, a través de los monitoreos de enfermedad, el uso de base de datos de variables ambientales y el análisis estadístico posibilitó generar un aceptable modelo predictivo de probabilidad de ocurrencia de enfermedad.

**EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE CULTIVARES COMERCIALES DE
POROTO FRENTE A INFECCIONES DE BBSV**

4.1 Introducción

En Argentina, diversos trabajos de investigación y experimentación se realizan sobre el cultivo de poroto con el objetivo de desarrollar y crear variedades con características agronómicas superiores, adaptadas al sistema extensivo de producción, a las distintas zonas agroecológicas, y con calidad de granos aptas para la exportación (INTA, n.d.). La selección de germoplasma enfatiza entre los principales objetivos la tolerancia a enfermedades, constituyendo el complejo virus-moscas blancas, una de las principales limitantes bióticas que afectan el rendimiento, calidad de granos y adaptabilidad del cultivo (Pieruschka & Lawson, 2015). Como se ha mencionado, las enfermedades generadas por infecciones de begomovirus se constituyen, dentro de ese complejo, como las restricciones sanitarias más importantes para este cultivo en Argentina (Maggio, 2021; Rodríguez Pardina, 2020).

Respecto a ello, la evaluación del “mosaico dorado” en materiales de poroto se ha llevado a cabo tradicionalmente en condiciones de campo debido a la dificultad de lograr una transmisión mecánica exitosa de BGMV y de mantener colonias vivas y virulíferas de su insecto vector. Aunque el conocimiento del comportamiento a campo del germoplasma de poroto bajo la incidencia natural de BGMV es fundamental, varios factores, a menudo, dificultan la interpretación de las observaciones realizadas. Una de las principales limitaciones es la relación directa que existe entre la incidencia de BGMV y la dinámica de las poblaciones de mosca blanca. Una presencia baja o tardía de estos vectores da como resultado una incidencia baja de enfermedad y una reacción de defensa o comportamiento moderada (Agarwal et al., 2021; Morales & Niessen, 1988). También, otros patógenos, plagas y factores abióticos afectan a los mecanismos de resistencia de las plantas en la naturaleza (Morales & Niessen, 1988) complejizando la caracterización del germoplasma evaluado en campo.

Si bien, el mejoramiento y las observaciones sanitarias siempre se enfatizaron frente a las enfermedades ocasionadas por BGMV, otros begomovirus han sido reportados afectando el cultivo de poroto (Inoue-Nagata et al., 2016; Rodríguez-Pardina et al., 2006; Rodríguez Pardina et al., 2011; Varela et al., 2018; Vizgarra et al., 2006). Dentro de ellos se reporta a bean bushy stunt virus (BBSV) generando síntomas de enrollado de hojas y retraso de crecimiento en infección natural, y ampollado de hojas, enanismo y clorosis bajo infecciones experimentales sobre distintos tipos comerciales (blanco, negro y cranberry) de poroto (Reyna et al., 2021). Debido a que cada raza de

poroto fue probablemente domesticada a partir de diferentes poblaciones ancestrales, se asume que diferentes mecanismos y genes de resistencia a begomovirus han evolucionado con ellas, existiendo evidencia de comportamientos diferenciales en distintos materiales infectados (Morales & Singh, 1993).

En este capítulo, se pretende aportar información para una caracterización fenotípica de respuesta a infecciones ocasionadas por BBSV en cultivares de poroto de distintos tipos comerciales evaluando diferentes parámetros fisiológicos.

4.2 Objetivos

Describir el comportamiento y las alteraciones fisiológicas de diferentes cultivares comerciales de poroto frente a infecciones ocasionadas por begomovirus.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Preparación de plántulas

Se desinfectaron semillas de poroto de los cultivares Alubia selección Cerrillos, NAG12, LCR5 y de soja cultivar Jack, durante 30 segundos con alcohol 96% y luego con hipoclorito de sodio al 10% por 1 a 2 minutos. Finalmente fueron lavadas con agua destilada y colocadas en cámaras húmedas a 28 °C por 72 h. De las semillas germinadas, 25 de cada tipo fueron seleccionadas y sembradas en vasos plásticos de 110 cc con sustrato esterilizado constituido por tierra y arena (1:1). Las plántulas se mantuvieron en invernadero a 24 °C hasta el desarrollo de su primer par de hojas unifoliadas.

Debido a la importancia de soja como cultivo en Argentina, a su coexistencia en regiones productivas del NOA con poroto, y a su particularidad de comportarse como hospedero de begomovirus, se incluye al cultivar Jack de esta oleaginosa en esta caracterización fenotípica.

4.3.2 Inoculación y mantenimiento de plantas

La inoculación *per se* se realizó de acuerdo a los ajustes logrados y detallados anteriormente (ver apartado 2.3.3.1). La distancia de disparo al tejido banco fue de aproximadamente 2 cm y se utilizaron presiones del orden de los 900 y 1100 psi. Se utilizaron dos dosis de inóculo (1x y 2x). La dosis de inóculo 1x fue de 8 µl, mientras que la dosis 2x se trató de una adición extra de 8 µl. Por cada cultivar/especie se inocularon 20 plantas y 5 se mantuvieron como testigos mock inoculados. Luego de ser inoculadas,

todas las plántulas se trasplantaron a macetas de 3 l y fueron mantenidas en invernadero bajo condiciones controladas de riego y temperatura. Se realizaron dos aplicaciones de insecticidas (Actara (Tiametoxam) 1 g/l y Fast 1.8 (Abamectina) 1 cc/l) para el control de poblaciones de trips.

La observación del desarrollo de las plántulas y de los síntomas de enfermedad se realizó de manera periódica. Todas las plantas inoculadas fueron evaluadas por PCR para corroborar la existencia o ausencia de infección viral utilizando cebadores específicos, para el DNA-A de BBSV, descritos en el capítulo 2, que amplifican un fragmento de 1309 pb.

4.3.3 Variables y parámetros registrados y evaluados

-Eficiencia de inoculación (%)

La eficiencia de inoculación se calculó de acuerdo al cociente entre el número de plantas infectadas (PCR positivas) sobre el total de plantas inoculadas, multiplicado por 100. Este cálculo se realizó para cada cultivar/especie, y también de una manera total considerando todas las plantas tratadas.

-Correlación síntoma-infección viral

La correlación síntoma-infección viral se determinó de acuerdo a la observación de los distintos síntomas desarrollados, en los diferentes tiempos pos-inoculación considerados (10, 17, 31 y 55 días), en el total de plantas evaluadas y su infección viral corroborada por PCR. De esta manera, se creó una tabla (Tabla 13) de asociación entre los síntomas observados en los distintos momentos y la cantidad de plantas infectadas (PCR positivas).

Los síntomas observados se clasificaron de la siguiente manera:

- 1.- Achaparramiento con disminución del número y tamaño de hojas
- 2.- Disminución del tamaño de planta
- 3.- Brotes supernumerarios
- 4.- Clorosis/Mosaicos
- 5.- Ampollado
- 6.- Necrosis de brotes
- 7.- Ausencia de síntomas

Nota: Se consideró como síntoma de achaparramiento a las plantas que presentaron hojas arrugadas, enrolladas, condensadas. Estas características se diferencian del síntoma “2”; de esta manera una planta puede tener achaparramiento y tener una altura considerable.

-Parámetros fisiológicos: altura, número de hojas y área foliar

Se registró la altura, número de hojas y área foliar de cada hoja nueva expandida por planta, a los 10, 17 y 31 días después de inoculación (DDI).

Para homogeneizar este registro, sólo se contabilizaron las nuevas hojas trifoliadas totalmente expandidas, y la altura de las plantas se midió desde el nudo de inserción de los cotiledones. El área foliar se midió a través programa ImageJ (Rueden et al., 2017) sobre el total de la primera, segunda y tercera hoja trifoliada expandida a los 10, 17 y 31 días DDI, respectivamente. En las plantas mock inoculadas este registro se realizó de la misma forma para asegurar una correcta posterior comparación.

La contabilización del número de hojas y la observación de síntomas se realizó hasta los 55 DDI.

-Parámetros fisiológicos: contenido de clorofila y funcionalidad de cloroplastos

La estimación del contenido clorofila se realizó utilizando un medidor portátil SPAD-CL01 (Hansatech Instruments, Pentney King's Lynn, UK), que suministra un valor, en el rango de 0 a 100, proporcional a la cantidad de clorofila.

El estado funcional de los cloroplastos se midió a través de la fluorescencia de clorofila con el fluorómetro Pocket-PEA (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech Instruments Ltd) tomando al PI como parámetro de valor definitivo. El índice de rendimiento o “performance index” (PI) es, esencialmente, un indicador que informa sobre la funcionalidad de los fotosistemas de la planta (Hansatech Instruments Ltd, n.d.; Živčák et al., 2008).

Ambas mediciones, se tomaron sobre la porción basal y distal del folíolo central de la primera, segunda y tercera hoja trifoliada de cada planta a los 10, 17 y 31 días DDI, respectivamente.

-Rendimiento

La determinación del rendimiento se estableció a través de la contabilización del número de granos producidos.

-Análisis estadísticos

Los datos obtenidos según las evaluaciones realizadas, se analizaron a través de un análisis de la varianza (ANOVA) con el programa INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2018).

4.4 Resultados

4.4.1 Eficiencia de inoculación (%)

La eficiencia de inoculación (plantas infectadas/plantas inoculadas*100) observada fue del 42.5%. Sin embargo, este valor respondió a una variación de entre el 70 y 25% dependiente del hospedante inoculado. De las 20 plantas inoculadas del cultivar Alubia, 14 fueron infectadas por BBSV (70%). En las variedades de poroto LCR5 y NAG12 estos valores fueron del 35% y 25% respectivamente, mientras que en soja la eficiencia de inoculación fue del 40%, ya que sólo 8 de las 20 plantas inoculadas mostraron estar infectadas. Las plantas infectadas, incluidas en este análisis, amplificaron por PCR el fragmento esperado de 1309 pb.

4.4.2 Correlación síntoma-infección viral

Las amplificaciones por PCR ponen en manifiesto que, de los síntomas observados, el achaparramiento con disminución del número y tamaño de hojas (1) y la disminución del crecimiento (2), presentaron la mayor correlación con la presencia del virus en el cultivar Alubia, ya que el total de las plantas infectadas presentaron estas patologías (Figura 33). Estos síntomas acompañaron el ciclo de las plantas infectadas desde los 10 DDI. La brotación supernumeraria (3) también fue un síntoma común para esta variedad que fue observándose en el transcurso de los días. A partir de los 31 DDI, comenzaron a desarrollarse clorosis (4) con avances hacia necrosis de brotes y hojas (6) en la mayoría de las plantas infectadas de este cultivar (Tabla 13).

Por otro lado, LCR5 y NAG12 se comportaron con mayor tolerancia en comparación con el cultivar Alubia frente a las infecciones por BBSV. En estos casos, las correlaciones de síntoma e infección viral fueron bajas. En ellos la observación de síntomas no siempre estuvo asociada a enfermedad, ya que existieron casos de detección de BBSV en ausencia de síntomas, principalmente en el cultivar LCR5. Además, también se observaron plantas que no presentaron amplificaciones por PCR, pero sí desarrollaron síntomas.

En LCR5, clorosis (4) observadas a partir de los 17 DDI fue el síntoma más concordante con infección, por otro lado, la brotación supernumeraria (3) no siempre estuvo asociada con enfermedad (ver valores negativos en Tabla 13). Cabe destacar, que algunas plantas no presentaron desarrollo de síntomas (7) aun detectándose a BBSV por PCR (Figura 34).

NAG12 presentó como síntoma de mayor correlación con enfermedad inducida por BBSV, a plantas con achaparramiento (1) y clorosis (4) a partir de los 31 DDI. Plantas con disminución de su crecimiento (2) o de bajo porte no fue un síntoma de enfermedad en este cultivar (ver valores negativos en Tabla 13) (Figura 35). También pudo observarse en algunas plantas infección viral sin síntomas.

En soja, las correlaciones interpretadas también fueron bajas. Esta especie también se comportó de manera tolerante en comparación a los cultivares de poroto. En ella, el desarrollo de clorosis (4) y ampollado de hojas (5) fueron de los síntomas más comunes en plantas infectadas por BBSV (Figura 36). Sin embargo, en el desarrollo de hojas nuevas estas sintomatologías fueron desapareciendo (Tabla 13).

Tabla 13. Cantidad de plantas infectadas (PCR positivas) de acuerdo a los síntomas observados en los distintos días después de inoculación.

Cultivar/especie	DDI	Síntomas						
		1	2	3	4	5	6	7
Alubia selección Cerrillos	10	14	13	8	1	-	-	-6
	17	14	14	9	5	-	-	-6
	31	14	14	12	10	-	11	-6
	55	14	14	10	14	-	14	-6
Leales CR5	10	1	1	1	1	-	-	6
	17	1	-	-6	3	-	-	1
	31	2	-	-6	3	-	1	3
	55	2	1	-4	4	-	-	3
NAG12	10	3	-	-	-	-	-	2
	17	3	-10	-	-	-	-	-
	31	2	-10	-	3	-	-	-
	55	3	-10	3	3	-	-2	-
Soja cv. Jack	10	-	-	-	5	5	-	-
	17	-	-	-	8	8	-	-
	31	-	-	-	6	6	-	-
	55	-	-	-	1	1	4	-

*Valores negativos indican plantas con el síntoma “x” y con resultados de PCR negativos.

*Los síntomas son: Achaparramiento con disminución del número y tamaño de hojas (1), Disminución del tamaño de planta (2), Brotes supernumerarios (3), Clorosis/Mosaicos (4), Ampollado (5), Necrosis de brotes (6), Ausencia de síntomas (7).



Figura 33. Síntomas de achaparramiento y disminución del crecimiento en planta cv. Alubia infectada por BBSV.

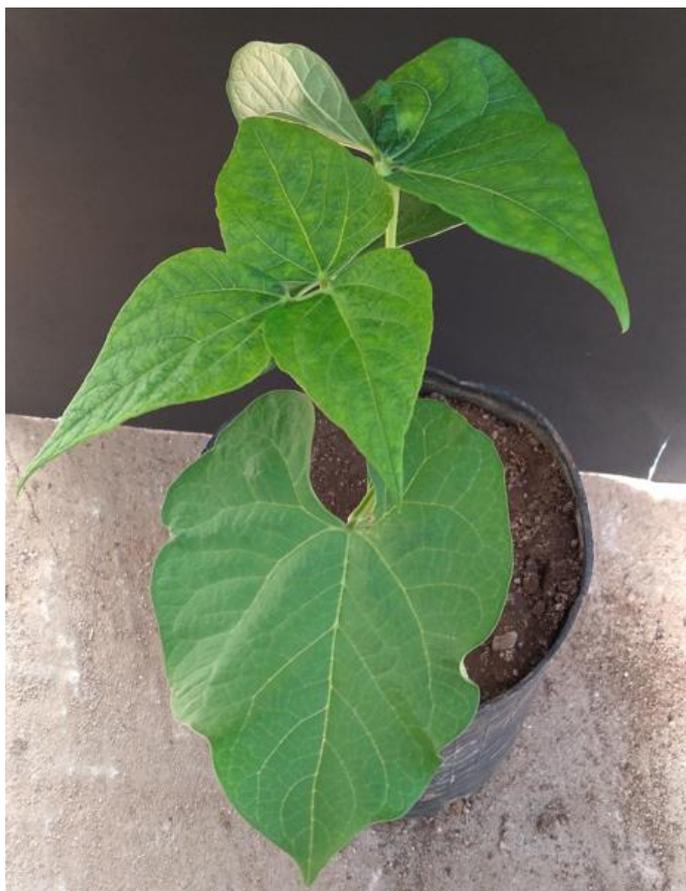


Figura 34. Síntomas de clorosis en mosaico en planta cv. Leales CR5 infectada por BBSV.



Figura 35. Síntomas de brotación supernumeraria en planta de poroto cv. NAG12 infectada por BBSV.



Figura 36. Síntomas de clorosis en mosaico y ampollado en planta de soja infectada por BBSV.

4.4.3 Parámetros fisiológicos: altura, número de hojas y área foliar

En lo que respecta a: altura de plantas, número de hojas y área foliar por planta, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre plantas sanas y enfermas para el cultivar Alubia. Estas diferencias se observaron desde los 10 DDI y son reflejo de las sintomatologías registradas. El achaparramiento con disminución del tamaño y número de hojas, fueron síntomas que se expresaron de manera severa en este cultivar, en donde las plantas infectadas no superaron en promedio los 8.91 cm en altura entre los distintos momentos pos-inoculación analizados. De manera consecuente, el número de hojas también estuvo fuertemente afectado, se registraron en promedio no más de 2 hojas verdaderas desarrolladas. El área foliar también presentó grandes disminuciones de tamaño, principalmente a partir de los 17 DDI (Figura 37).

En LCR5, no se observaron diferencias significativas entre plantas sanas y enfermas en las dos primeras mediciones (10 y 17 DDI), sin embargo, existe una tendencia a la disminución en los parámetros medidos en las plantas infectadas. Estas diferencias si fueron significativas a los 31 DDI (Figura 38).

NAG12, también presentó diferencias significativas en altura y área foliar respecto a sus testigos sanos. El número de hojas presentó la menor variación entre los distintos momentos pos-inoculación, e inclusive, en promedio, fueron mayores al de las plantas sanas a los 55 DDI (Figura 39).

El cultivar de soja, no presentó diferencias significativas en cuanto al número de hojas desarrolladas respecto al control, pero las mismas si tuvieron una menor superficie foliar. Además, la altura de las plantas enfermas también fue menor en comparación a sus pares sanas (Figura 40).

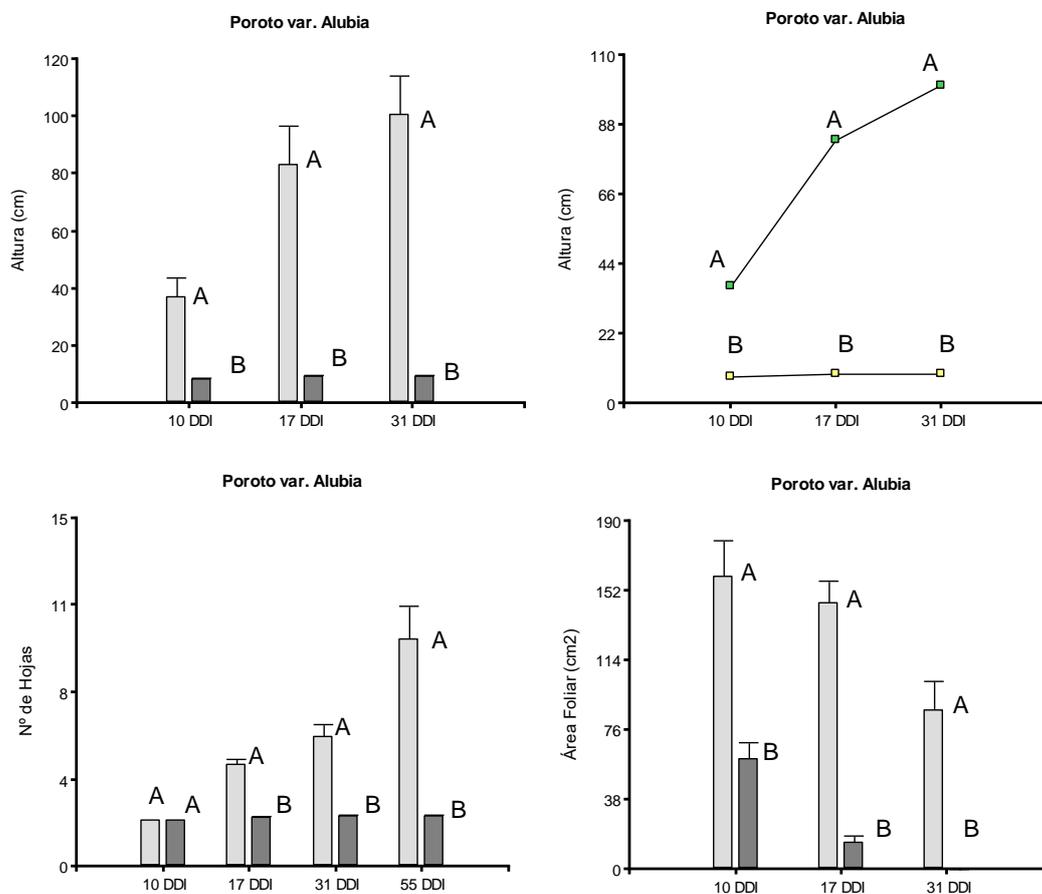


Figura 37. Gráficos para las variables altura, número de hojas y área foliar medidas en el cultivar Alubia a los 10, 17, 31 y 55 días después de inoculación (DDI). La barra gris clara y los puntos verdes representan a los testigos sanos mientras que la gris oscura y los puntos amarillos a las plantas infectadas. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas según test LSD de Fisher al 5% de significancia (n=25).

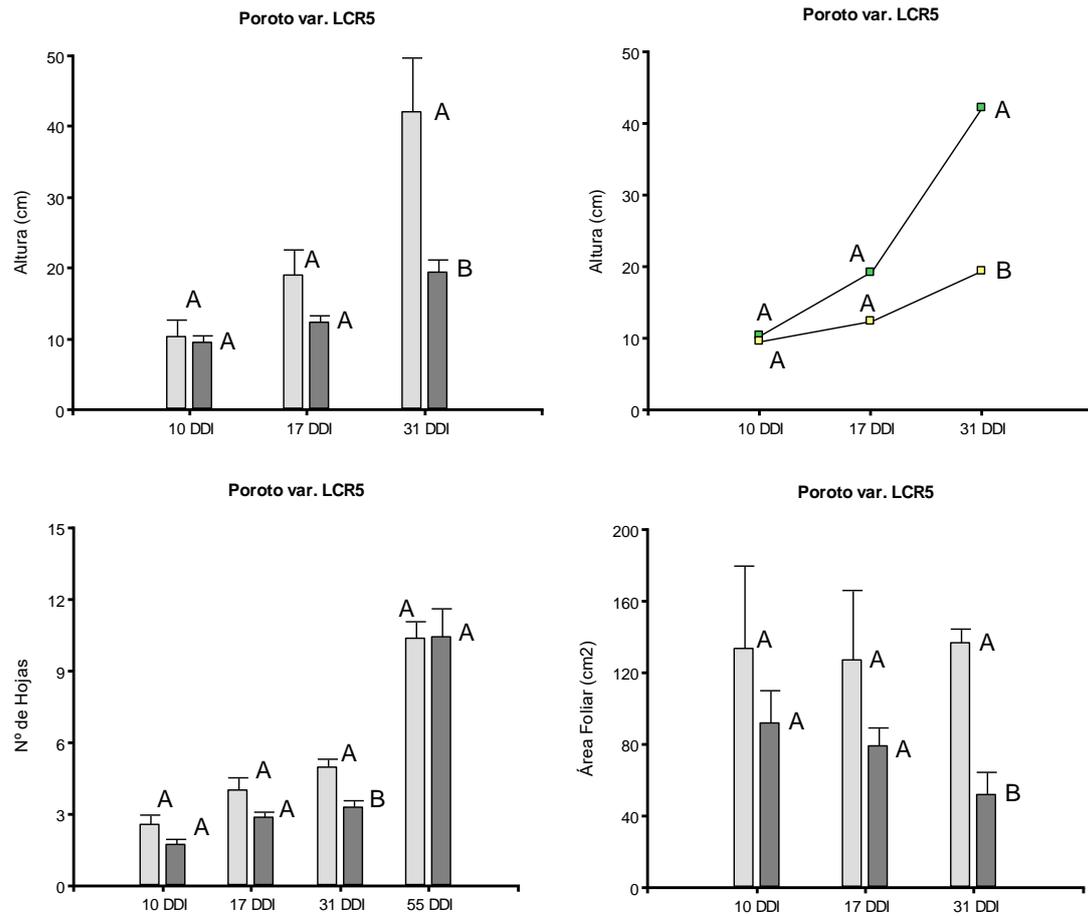


Figura 38. Gráficos para las variables altura, número de hojas y área foliar medidas en el cultivar LCR5 a los 10, 17, 31 y 55 días después de inoculación (DDI). La barra gris clara y los puntos verdes representan a los testigos sanos mientras que la gris oscura y los puntos amarillos a las plantas infectadas. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas según test LSD de Fisher al 5% de significancia (n=25).

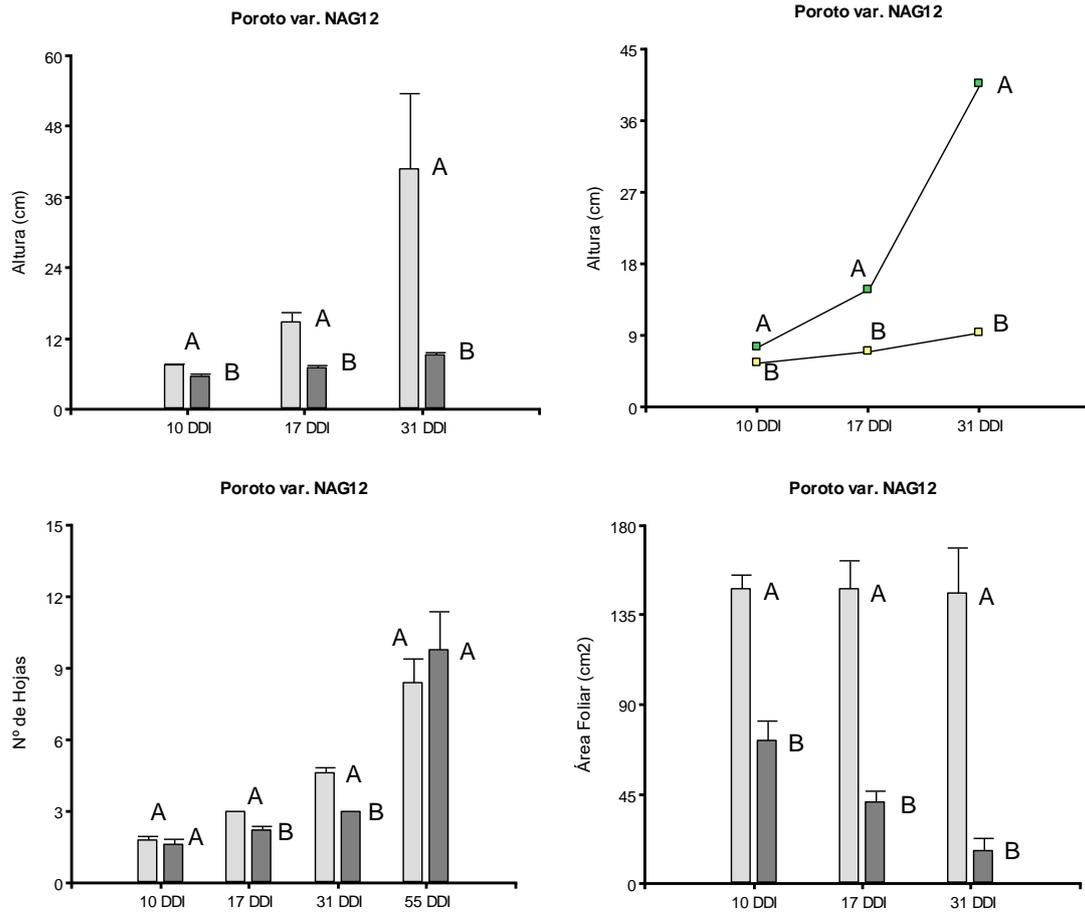


Figura 39. Gráficos para las variables altura, número de hojas y área foliar medidas en el cultivar NAG12 a los 10, 17, 31 y 55 días después de inoculación (DDI). La barra gris clara y los puntos verdes representan a los testigos sanos mientras que la gris oscura y los puntos amarillos a las plantas infectadas. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas según test LSD de Fisher al 5% de significancia (n=25).

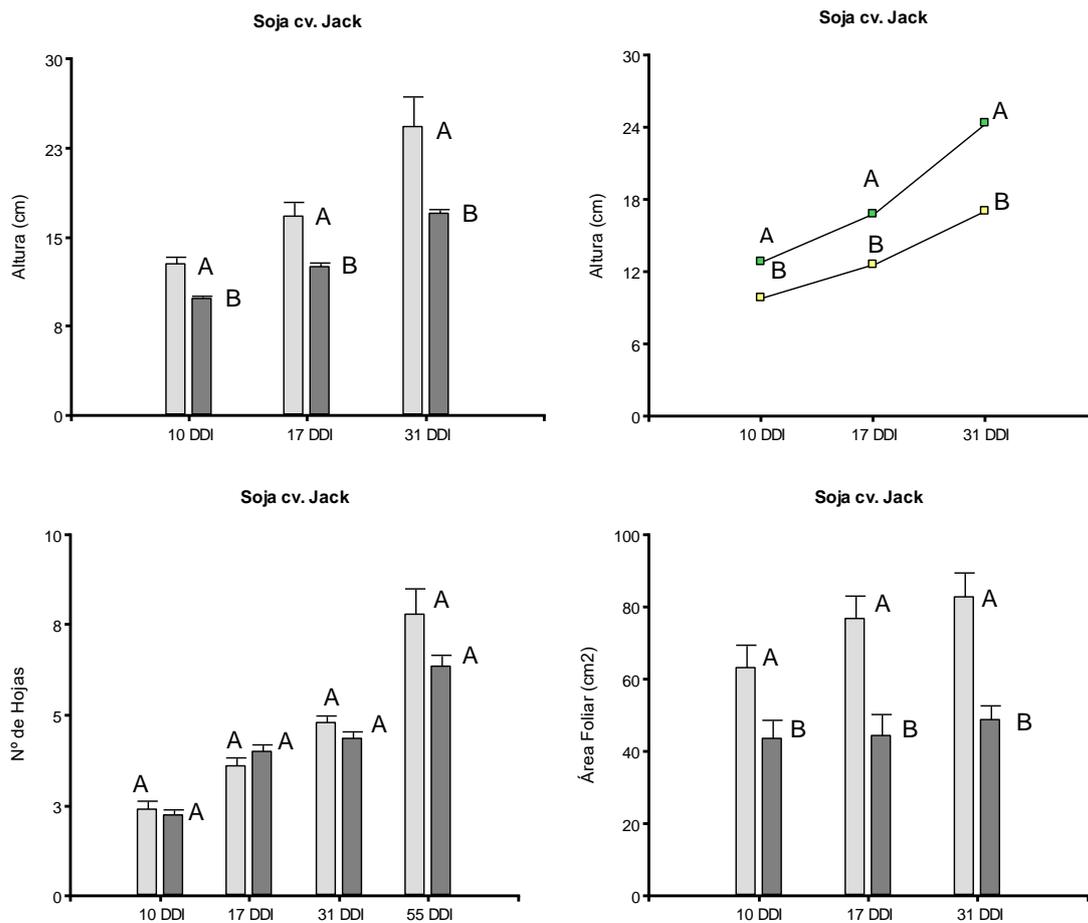


Figura 40. Gráficos para las variables altura, número de hojas y área foliar medidas en el cultivar de soja JACK a los 10, 17, 31 y 55 días después de inoculación (DDI). La barra gris clara y los puntos verdes representan a los testigos sanos mientras que la gris oscura y los puntos amarillos a las plantas infectadas. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas según test LSD de Fisher al 5% de significancia (n=25).

4.4.4 Parámetros fisiológicos: contenido y fluorescencia de clorofila

El contenido de clorofila, estimado a través del índice de clorofila, tuvo en las plantas enfermas de los cultivares Alubia, NAG12 y en soja, valores superiores y estadísticamente significativos en comparación con sus testigos sanos a los 10 DDI; sin embargo, estos valores disminuyeron en el transcurso de los días. Respecto a las plantas enfermas de LCR5, siempre mostraron valores inferiores de clorofila respecto a sus testigos sanos con diferencias significativas sólo a los 17 DDI (Figura 41).

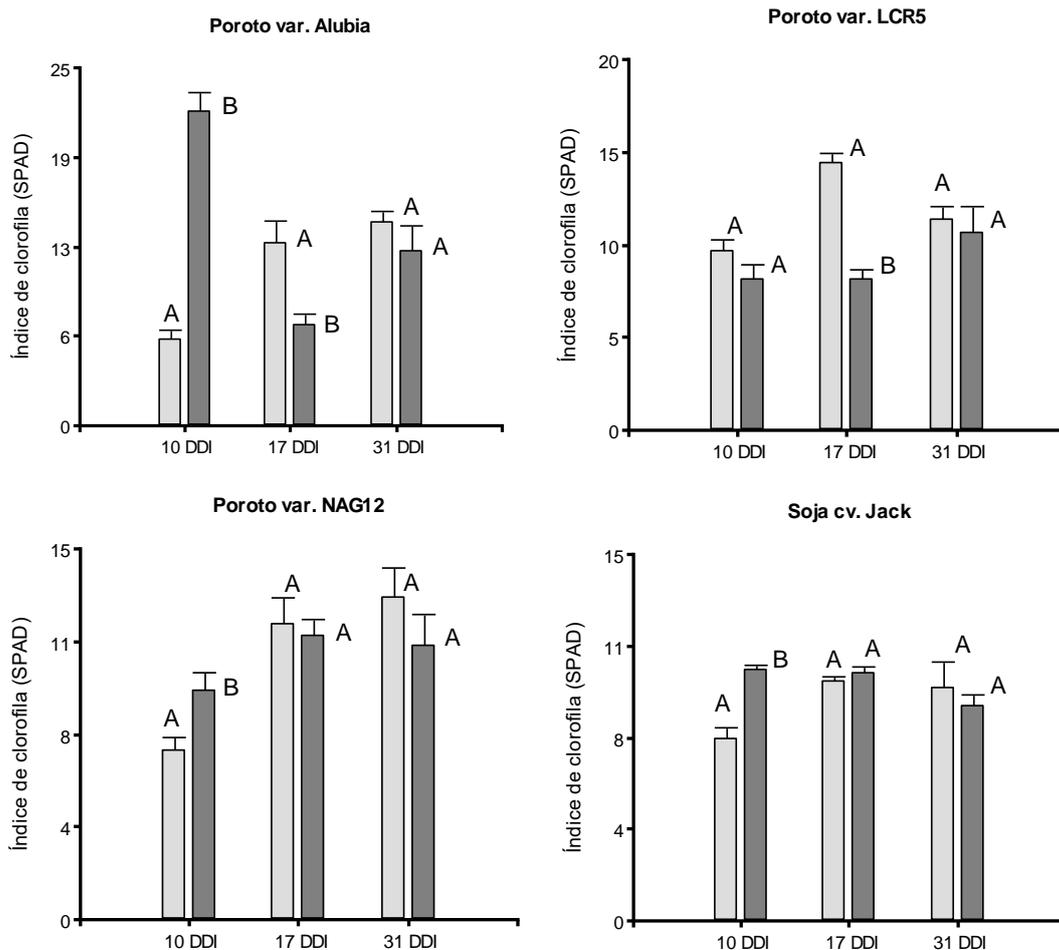


Figura 41. Gráficos para la variable índice de clorofila medida a los 10, 17 y 31 días después de inoculación (DDI). La barra gris clara representa los testigos sanos mientras que la gris oscura a las plantas infectadas. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas según test LSD de Fisher al 5% de significancia (n=25 por cultivar).

La funcionalidad de los cloroplastos evaluada a través del valor de PI, deja en evidencia alteraciones a nivel del aparato fotosintético de todos los cultivares evaluados. Si bien no existieron grandes diferencias entre plantas sanas y enfermas, los valores de PI tuvieron una tendencia a ser inferiores en plantas infectadas. En Alubia, NAG12 y soja, se observó una mejor vitalidad a los 10 y 17 DDI, sin embargo, en el transcurso de los días pos-inoculación, el valor de PI volvió a ser menor en plantas enfermas (Figura 42).

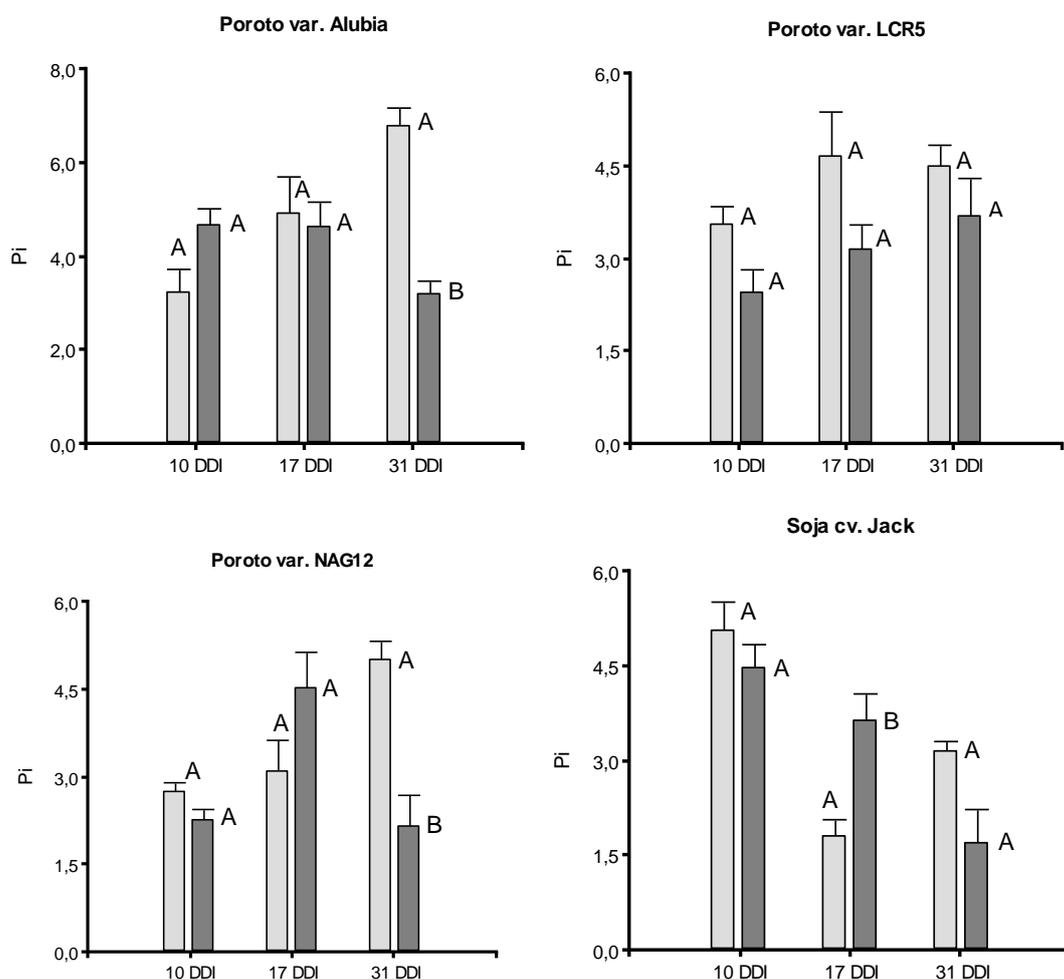


Figura 42. Gráficos para la variable *Performance index* (P_i) medida a los 10, 17 y 31 días después de inoculación (DDI). La barra gris clara representa los testigos sanos mientras que la gris oscura a las plantas infectadas. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas según test LSD de Fisher al 5% de significancia ($n=25$ por cultivar).

4.4.5 Parámetros fisiológicos: rendimiento

Respecto al número de granos producidos, las pérdidas fueron evidentes y reflejo de las sintomatologías y alteraciones observadas en los distintos parámetros analizados. En Alubia, las pérdidas en producción fueron totales; ninguna de las plantas infectadas tuvo capacidad de producir granos. NAG12 también presentó grandes pérdidas. Las mismas fueron cercanas al 90%. Por otro lado, LCR5 y el cultivar de soja, fueron los materiales que menores pérdidas de rendimiento experimentaron respecto a sus pares sanos. En LCR5 este nivel productivo fue del 38% (pérdidas del 62%), y en soja del 45% (Figura 43).

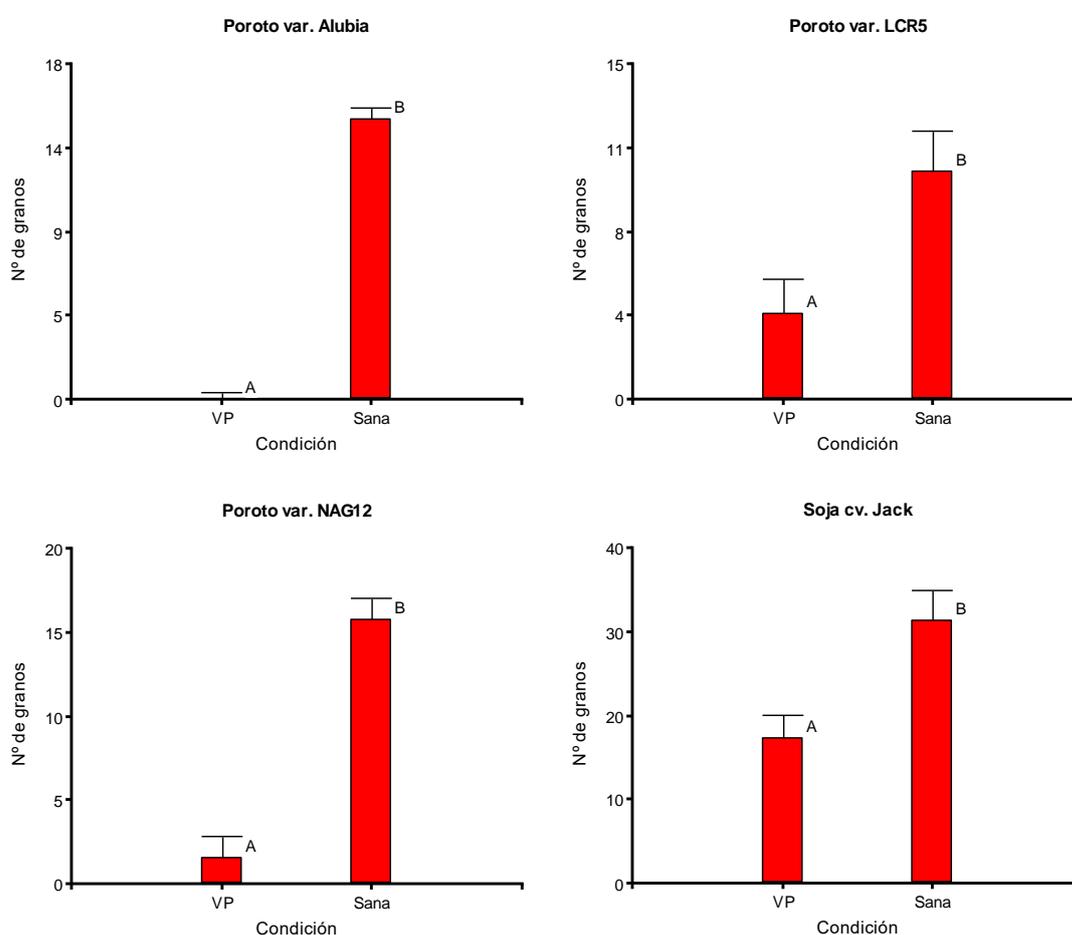


Figura 43. Gráficos para la variable número de granos (rendimiento) para las condiciones sanitarias de planta infectada (virus presente) y planta sana de los tres cultivares de poroto y soja. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas según test LSD de Fisher al 5% de significancia (n=25 por cultivar).

4.5 Discusión

La descripción del comportamiento de los cultivares de poroto y soja, deja en claro la existencia de grandes diferencias, en los distintos parámetros evaluados, frente a las infecciones ocasionadas por BBSV.

El cultivar Alubia selección Cerrillos, fue de los más fáciles de inocular y el que presentó evidentes síntomas de enfermedad, donde el achaparramiento tuvo grandes implicancias negativas en el tamaño y número de hojas y en la altura de las plantas infectadas, resultando en una producción nula de granos. Debe considerarse la gran importancia de este cultivar para el mercado agroexportador, ya que sus granos del tipo blanco grande son muy demandados, principalmente por países del Mediterráneo (Calzada & Treboux, 2019; Maggio, 2021). Tal vez la mayor susceptibilidad de este cultivar se deba a la virulencia del patógeno sobre este tipo de cultivo, ya que BBSV también fue aislado de plantas de poroto del tipo blanco (Reyna et al., 2021), o bien puede deberse a la susceptibilidad intrínseca del cultivar (Fekete, 2010).

En LCR5, los síntomas más evidentes de enfermedad fueron las clorosis, donde pudo observarse alteraciones a nivel de la funcionalidad de su aparato fotosintético. Al igual que en NAG12, algunas plantas resultaron estar infectadas (PCR+) sin presentar síntomas evidentes. Este hecho brinda indicios de mayor tolerancia de estos cultivares frente al patógeno, pero también la idea de una fuente de inóculo “silenciosa” que puede resultar perjudicial.

Alubia y LCR5 mostraron comportamientos contrastantes siendo el primero muy susceptible y el segundo tolerante. Ambos materiales poseen acervos génicos andinos, sin embargo la mayor tolerancia observada en LCR5 posiblemente pueda deberse a la existencia de algún gen introgresado que le confiere esa particularidad (Anaya-López et al., 2018; Lobaton et al., 2018; Singh et al., 2000; Soler et al., 2021; Velez et al., 1998). En este sentido, conocer el pedigree de los materiales trabajados es fundamental. Por otro lado, el cultivar NAG12 de acervo génico mesoamericano, de grano negro pequeño, y de gran importancia para abastecer los mercados importadores de países latinoamericanos como Brasil (Calzada & Treboux, 2019; Maggio, 2021), presentó un nivel de tolerancia intermedio entre Alubia y LCR5, con síntomas de achaparramiento y clorosis más notorios alrededor de la mitad de su ciclo de vida, y con un nivel productivo menor a LCR5.

En cuanto a soja, también pudo observarse un comportamiento de tolerancia donde la observación de síntomas de ampollado y clorosis fueron desapareciendo a medida que se generaron hojas nuevas, sin embargo, el tamaño de plantas y la superficie foliar fueron menores en plantas enfermas que en sus pares sanas.

Las respuestas de los distintos genotipos frente a infecciones por BBSV es de suma importancia para desarrollar estrategias de manejo o selección de cultivares. Lograr estas respuestas en experimentos bajo presiones adecuadas y uniformes de patógeno son convenientes, sin embargo, sería óptimo replicar estos ensayos en entornos contrastantes (Morales & Singh, 1993), como por ejemplo ambientes de alta temperatura (Anaya-López et al., 2018). Por otro lado, si bien las inoculaciones mecánicas en invernadero son más confiables que las observaciones logradas a campo, esto no permite la selección de formas de resistencia relacionadas con el vector, ya que, por ejemplo, el número de moscas blancas puede diferir entre los genotipos debido a preferencias propias del vector (Adames-Mora et al., 1996), o a mecanismos propios del hospedero que afectan la biología y comportamientos del insecto (antibiosis y antixenosis) como las modificaciones de la epidermis o secreción de sustancias repelentes (Badii & Garza Almanza, 2007; Helser & Tharp, 2005); por ello, extensos experimentos de preferencia y biología cuidadosamente planeados son necesarios para comprender completamente el nivel de resistencia de los genotipos de poroto (Agarwal et al., 2021). Además, debe considerarse una presión de inóculo óptima para evitar eliminar fuentes útiles de resistencia/tolerancia (Adames-Mora et al., 1996).

Por otro lado, y como se ha mencionado, conocer el “pedigree” de los materiales trabajados es fundamental, debido a que cada raza de poroto, probablemente domesticada a partir de diferentes poblaciones ancestrales, asume diferentes mecanismos y genes de resistencia a begomovirus, que han evolucionado con ellas existiendo evidencia de comportamientos diferenciales en distintos materiales (Fekete, 2010; INTA, n.d.; Morales & Singh, 1993; Vizgarra et al., 2006).

En este capítulo el aporte de información para una caracterización fenotípica de respuesta de los distintos genotipos frente a BBSV puede resultar en información importante para el desarrollo de estrategias de manejo o selección de cultivares que muestren menor severidad de síntomas y mejor productividad en ambientes de alta presión de enfermedad.

4.6 Conclusión

La descripción del comportamiento de los cultivares de poroto y soja, deja en evidencia la existencia de grandes diferencias, en los distintos parámetros evaluados, frente a las infecciones ocasionadas por BBSV.

El nivel de tolerancia a enfermedad es más alto en LCR5. El cultivar Alubia selección Cerrillos, fue de los más fáciles de inocular y el que presentó evidentes síntomas de enfermedad, siendo el más afectado de los cultivares evaluados. NAG12 tuvo un comportamiento intermedio. El cultivar de soja Jack, también posee un considerable nivel de tolerancia a la enfermedad.

El impacto de las infecciones ocasionadas por BBSV debe ser altamente considerado más allá de los niveles de tolerancia/susceptibilidad de los materiales implicados, ya que las pérdidas de rendimiento generadas pueden ser cuantiosas.

**USO DE MARCADORES MOLECULARES EN BÚSQUEDA DE RESISTENCIA
GENÉTICA A BEGOMOVIRUS**

5.1 Introducción

La incorporación de varios genes/alelos ha sido reconocida como una de las estrategias más interesantes y apropiadas en la búsqueda de una resistencia amplia y estable a enfermedades ocasionadas por begomovirus (Singh et al., 2000; Valdés et al., 2017). En poroto, la resistencia genética hacia estos patógenos ha sido fundamentalmente abocada hacia la defensa contra BGYMV y BGMV.

En el manejo de estos patógenos, en términos de resistencia, fue posible observar comportamientos diferenciales en progenies de cruzamientos intra e inter raciales de poroto (Blair et al., 2007; Singh et al., 2000). De esta manera, se han determinado distintas líneas o materiales parentales de características sobresalientes como el retraso en la expresión de síntomas (Osorno et al., 2004), la resistencia a la clorosis de hojas (Velez et al., 1998) y el desarrollo normal de vainas, en presencia de alta presión de enfermedad (Acevedo Román et al., 2004). En estas líneas se han identificado diferentes genes y regiones a los que se asocian distintos marcadores moleculares utilizados en los programas de mejoramiento vegetal.

Estudios genéticos descubrieron los genes independientes *bgm-1* (Blair & Beaver, 1993), *bgm-2* (Velez et al., 1998), y *bgm-3* (Osorno et al., 2007) que condicionan altos niveles de resistencia contra el amarillamiento de hojas, el mosaico y la clorosis. Los Bgp (Acevedo Román et al., 2004) y Bgp-2 (Osorno et al., 2007) confieren resistencia a la deformación de vainas, mientras que los QTLs (Quantitative Trait Locus) en los cromosomas Pv04 y Pv07 contribuyen a un retraso/reducción de la clorosis foliar (Miklas et al., 1996). De todos los descriptos, *bgm-1* es el gen más utilizado en programas de mejora genética para la resistencia, en parte por su origen centroamericano, pero también por el desarrollo y la abundancia de marcadores moleculares asociados a él (Blair et al., 2007; Urrea et al., 1996).

La “tecnología” de los marcadores moleculares ha revolucionado los programas de mejoramiento, sirviendo como herramienta fundamental en la identificación y selección de estos genes. Urrea et al. (1996), identificaron un marcador RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ligado al gen *bgm-1* a partir del cual desarrollaron el marcador SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) SR2. Este ha sido utilizado en los programas de selección asistida por marcadores ya que se encuentra ligado al gen *bgm-1* para resistencia a BGYMV (Soler et al., 2017). Miklas et al. (2000), identificaron un QTL mayor y un marcador RAPD asociado para resistencia a BGYMV en las líneas

DOR 364 de poroto. Estos marcadores fueron posteriormente convertidos al marcador SCAR SW12₇₀₀ por los investigadores del CIAT. Sin embargo, actualmente, Soler et al. (2021), proponen nuevos marcadores, del tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism), obtenidos a partir de “Genotyping By Sequencing (GBS)” sobre la región asociada al gen *bgm-1*. Estos presentan ventajas frente a los marcadores SCAR (Soler et al., 2017, 2021), facilitando los programas de selección asistida. Se trata de los marcadores PvNAC1 (CB_475) asociados a *bgm-1*, y de BGY4.1, BGY7.1 y BGY8.1 vinculados a QTLs de resistencia (Soler et al., 2021).

Los cambios en un único nucleótido (SNP) o pequeñas variaciones en una secuencia de DNA son posibles de ser visualizadas a través del método “High Resolution Melting (HRM)”. Esta técnica se basa en el análisis cuantitativo, en alta resolución, de curvas de disociación de fragmentos de DNA amplificados por PCR (Taylor et al., 2009). La combinación de qPCR, la saturación de DNA con colorantes y el control sobre la fusión o “melt” de la doble cadena, ha permitido la identificación de pequeñas variaciones en secuencias de ácidos nucleicos basadas en su composición, largo, contenido de GC (guanina y citosina) y complementariedad de cadenas (Garritano et al., 2009). La utilización de los marcadores del tipo SNP supone poder lograr productos diferenciales y factibles de ser analizados por HRM. En este punto, el método “(T_m)-shift SNP genotyping” (Germer & Higuchi, 1999; Wang et al., 2005), permite lograr productos que pueden ser discriminados por sus temperaturas de fusión o disociación (T_m-shift) en un termociclador de tiempo real. El principio de esta técnica se basa en una reacción de PCR que utiliza dos oligonucleótidos específicos (uno para cada alelo) con el agregado de colas ricas en GC de diferente longitud, y un cebador reverso común, de modo tal que el DNA genómico se amplificará con uno u otro cebador, dependiendo de qué alelo SNP esté presente, resultando en muestras homocigotas opuestas o en heterocigotas, si se han amplificado con ambos iniciadores (Figura 44).

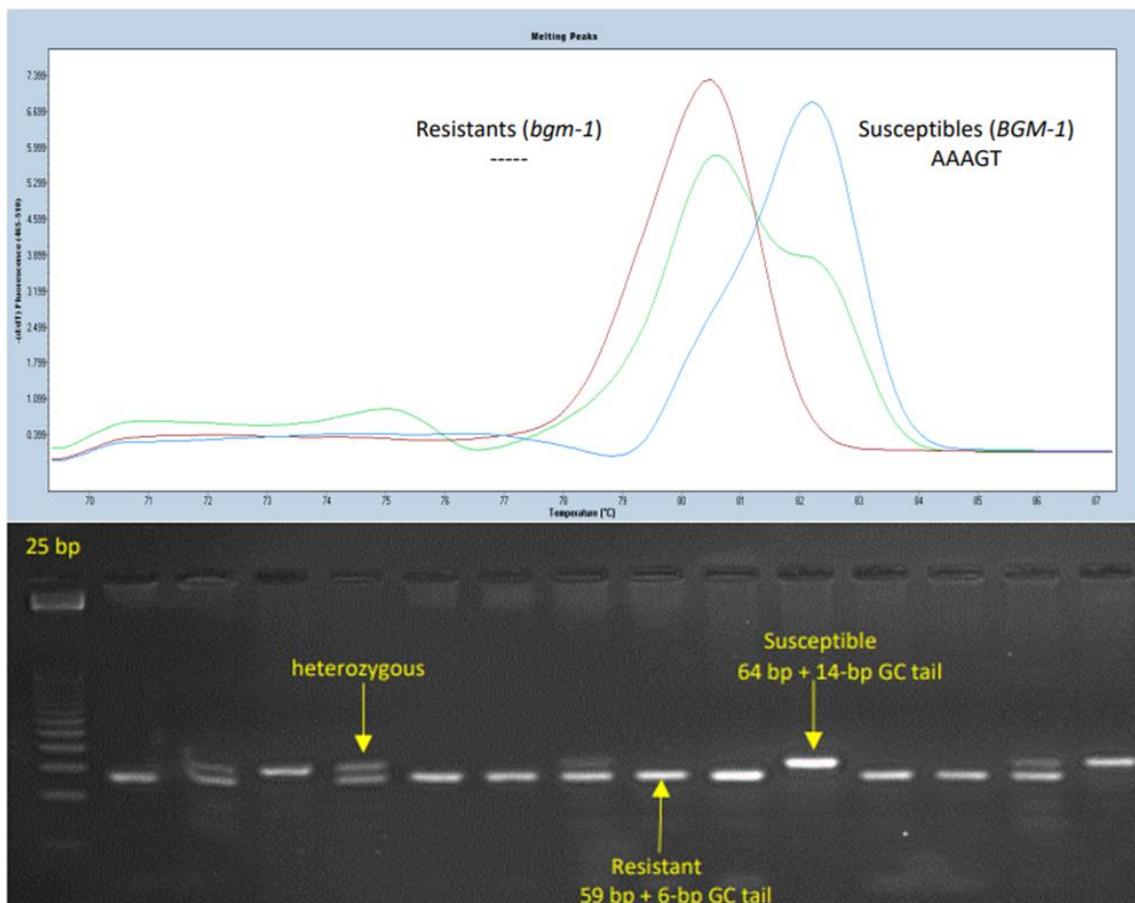


Figura 44. Curvas de fusión y electroforesis de productos amplificados a través de la metodología (T_m)-shift SNP genotyping con el marcador CB_475 asociado al gen *bgm-1* (Adaptada de Soler et al., 2021).

De este modo, el empleo del método (T_m)-shift SNP genotyping permite determinar variaciones genéticas logrando discriminar diferencias o variantes alélicas en secuencias de DNA de interés. El objetivo de este capítulo se basa en ajustar las técnicas y uso de marcadores moleculares del tipo SCAR y SNP asociados a resistencia a enfermedades ocasionadas por begomovirus en una selección de materiales de poroto, conformada por poblaciones nativas silvestres y cultivares comerciales de distintos acervos génicos, y su validación para la caracterización de germoplasma.

5.2 Objetivos

Ajustar el uso de marcadores moleculares del tipo SCAR y SNP ligados a genes de resistencia a begomovirus en poroto.

Caracterizar una selección de germoplasma (poblaciones nativas silvestres y cultivares comerciales) y muestras de poroto de campo mediante marcadores moleculares ajustados ligados a genes de resistencia a begomovirus.

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Selección de marcadores moleculares

En base a la bibliografía consultada, se seleccionaron marcadores del tipo SCAR (Anaya-López et al., 2018) y SNP (Soler et al., 2017, 2021) ligados a genes y QTLs asociados a la resistencia de BGYMV (Velez et al., 1998). Los iniciadores correspondientes a cada marcador se detallan en la Tabla 14.

Tabla 14. Oligonucleótidos seleccionados como marcadores moleculares asociados a resistencia de BGYMV.

Tipo de marcador	Primer ID	Oligonucleótido Forward	Oligonucleótido Reverse	Locus target	Fragmento (pb) y/o Tm Shift (°C)*
SCAR	SR2	CACAGCTGCCCTAACAAAAT	CACAGCTGCCACAGGTGGGA	<i>bgm-1</i>	530 pb (resistente) 570 pb (susceptible)
SCAR	SW12 ₇₀₀	TGGGCAGAAGTTCTAGCATGTGGC	TGGGCAGAAGCACAGTATGAT TTG	BGY 4.1	700 pb (susceptible)
SNP	CB_00434	Fa: gcgggcCATTTTATTTTGGTCGCAATCCT Fb: gcgggcagggcggCATTTTATTTTGGTCGCAATT CG	AGACCTTCGTGGTTGGTGGGA	<i>bgm-1</i>	~79 °C (susceptible) ~82 °C (resistente)
SNP	CB_475 (PvNAC1)	Fa: gcgggcagggcggcCGTGGTTGGTGGACAAAAG T Fb: gcgggcCGTGGTTGGTGGACACG	GGATCACACGTTCTGATGCA	<i>bgm-1</i>	~80 °C (65 pb) (resistente) ~82.5 °C (susceptible) (78 pb)

Tipo de marcador	Primer ID	Oligonucleótido Forward	Oligonucleótido Reverse	Locus target	Fragmento (pb) y/o Tm Shift (°C)*
SNP	S04_25310 38	Fa: gcgggcagggcggcCTCGTTCATCAACCTTGC Fb: gcgggcCTCGTTCATCAACCTTGG	CTTTATCCAGCCACCACAGAAT	BGY 4.1	~78 °C (susceptible) ~81 °C (resistente)
SNP	S1137_407	Fa: gcgggcagggcggcCCAAAGGTTTCAGTCATGTC Fb: gcgggcTCCAAAGGTTTCAGTCATGTT	GGCAGAAGAATGTGTCCAGG	BGY 7.1	~80 °C (susceptible) ~82 °C (resistente)
SNP	S08_92022 67	Fa: gcgggcagggcggcGCTGGAGTTACTCCCTCCT Fb: gcgggcTTGCTGGAGTTACTCCCTAG	TAATCCTCCTTAAACGTGATGG T	BGY 8.1	~81 °C (resistente) ~80 °C (susceptible)

*Tm Shift = Temperatura de cambio o fusión.

5.3.2 Ajuste de marcadores moleculares del tipo SCAR: SR2 y SW12700

Los marcadores tipo SCAR (SR2 y SW12700), fueron evaluados mediante técnica de PCR según las condiciones de temperatura y ciclado detalladas en la Tabla 15. Como templado de las amplificaciones, se extrajo DNA genómico, mediante protocolo adaptado de Edwards et al. (1991) de hojas liofilizadas de plántulas de poroto negro (cultivar Leales 24) y blanco tipo Alubia (cultivar Alubia selección Cerrillos), tolerantes y susceptibles a begomovirus respectivamente. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en volumen final de 25 µl con buffer de reacción 1x, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs mix, 200 µM de cada iniciador (ver Tabla 14), DNA templado (50 ng) y 0.2 unidades de Taq DNA polimerasa (1 U/µl). Los productos generados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con TAE 1x durante 30 minutos, se tiñeron en GelRedTM y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. A su vez, también se realizó una corrida electroforética en gel de poliacrilamida al 6% durante 2 h a 50 W con buffer TBE. La visualización de los productos corridos se realizó tras la tinción del gel con solución de nitrato de plata durante 30 min con un posterior doble enjuague con solución reveladora fría (60 g Na₂CO₃ en 2 l de agua deionizada más 3 ml de formaldehído al 37% y 400 µl de tiosulfato de sodio (10 mg/ml)).

Tabla 15. Condiciones de PCR evaluadas para los marcadores moleculares SR2 y SW12700.

SR2 60°C		SW12700 60°C		SW12700 70°C	
Tiempo (seg)	Temp (°C)	Tiempo (seg)	Temp (°C)	Tiempo (seg)	Temp (°C)
60	94	60	94	60	94
10	94	30	94	30	94
40	60	30	60	30	70
120	72	60	72	60	72
300	72	300	72	300	72

5.3.3 Ajuste de marcadores moleculares del tipo SNP

El uso de los marcadores del tipo SNP, se realizó ajustando el método de (T_m)-shift SNP genotyping (Germer & Higuchi, 1999; Wang et al., 2005) utilizando

oligonucleótidos que amplifican fragmentos de distinto tamaño y temperatura de cambio o fusión (T_m -shift). El posterior análisis de las curvas “melt” o fusión de los productos amplificados, se realizó por HRM (Taylor et al., 2009; Wang et al., 2005) utilizando un termociclador de PCR en Tiempo Real marca CFX 96 Bio Rad.

5.3.3.1 Ajuste del marcador SNP: CB_00434 (*bgm-1*)

El ajuste del marcador se realizó sobre DNA genómico extraído de líneas y cultivares de acervos génicos andinos (Alubia, Leales B40, Leales CR5) y mesoamericanos (Leales 24, NAG12, VAX3, BAT y Gateado). Para cada material se probaron dos tipos de muestras, una de planta individual y otra conformada por un pool de 4 plantas. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 μ l con una concentración final de Precision Melt SupermixTM (Bio-Rad) 1x, 2 μ l de cada iniciador (2 μ M) y 50 ng de DNA templado. Precision Melt SupermixTM contiene Hot-Start iTaqTM DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂, colorante EvaGreenTM y otros factores en formulación optimizadas para HRM. Las condiciones de qPCR fueron: desnaturalización 92 °C 15 segundos, hibridación 67.8 °C 15 segundos y extensión a 72 °C por 15 segundos. Las mismas se llevaron a cabo con el equipo CFX 96 de Bio-Rad y se ensayaron distintos números de ciclado (39, 42, 45 y 50). Las curvas de fusión se obtuvieron con incrementos de temperatura de 0.5 °C desde los 65 °C a los 93.5 °C.

5.3.3.2 Ajuste de marcadores moleculares del tipo SNP: CB_475, S04_2531038, S1137_407 y S08_9202267

Las reacciones de PCR en tiempo real para el ajuste de los marcadores SNP: CB_475 (*bgm-1*), S04_2531038 (BGY 4.1), S1137_407 (BGY 7.1) y S08_9202267 (BGY 8.1), se realizaron en un volumen final de 20 μ l con una concentración final de Precision Melt SupermixTM (Bio-Rad) 1x, 2 μ l de cada cebador (2 μ M) y 50 ng de DNA templado. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización 94 °C 15 segundos, hibridación por 15 segundos a la temperatura correspondiente a cada set de primers (Tabla 16) y extensión a 72 °C por 20 segundos. El número de ciclos empleados fue de 38, y se llevaron a cabo con el equipo Corbett Rotor Gene 6000 de Qiagen. Las curvas de fusión se lograron con incrementos de temperatura de 0.2 °C cada 10 segundos desde los 65 °C a los 95 °C.

El ajuste de estos marcadores se realizó sobre el DNA extraído de hojas liofilizadas de una selección de germoplasma del Banco de Germoplasma de INTA Salta detallado en la Tabla 17. En ella se incorporaron 53 materiales correspondientes a diferentes líneas y cultivares, de distintos tipos comerciales y acervos génicos. También se incluyeron poblaciones nativas silvestres.

Se registró la temperatura de fusión (T_m -shift) de cada material para cada marcador, observando si fue posible su empleo. A su vez, los productos amplificados, a través del uso del marcador CB_475 asociado al gen de resistencia *bgm-1*, de los materiales LB40, LCR5, NAG12, L24, VAX6, Alubia, L17, Escarlata, Otto 51-2, BAT, Azabache, BNOA PH 018, BNOA PH 470 y BNOA PH 591, fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa, según lo descripto en la Tabla 18, con el fin de visualizar el tamaño de los productos y su correspondencia con las variantes alélicas resistentes o susceptibles:

- Variante Resistente= 59 pb + 6 pb (cola GC) → 65 pb
- Variante Susceptible= 64 pb + 14 pb (cola GC) → 78 pb

La corrida electroforética se llevó a cabo con TAE 0.5x y los geles fueron teñidos con GelRed™ durante 10 minutos. El material VAX6, considerado susceptible de acuerdo a comunicación personal con investigadores del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), fue utilizado como testigo de susceptibilidad en este trabajo.

Tabla 16. Temperatura de hibridación utilizada para los marcadores SNP ajustados.

Marcador	Temperatura de melting (°C)	Locus target
CB_475	60	Gen <i>bgm-1</i>
S04_2531038	65	QTL BGY 4.1
S1137_407	58	QTL BGY 7.1
S08_9202267	60	QTL BGY 8.1

Tabla 17. Materiales de poroto seleccionados para el ajuste de marcadores moleculares.

Material	Acervo génico	Tipo	Material	Acervo génico	Tipo
Alubia Cerrillos	Andino	Blanco tipo Alubia	Gralha	Mesoamericano	Negro
Garça	Andino	Blanco tipo Alubia	Grauna	Mesoamericano	Negro
Leales 17	Andino	Blanco tipo Alubia	Leales 24	Mesoamericano	Negro
Leales B30	Andino	Blanco tipo Alubia	NAG 12	Mesoamericano	Negro
Leales B40	Andino	Blanco tipo Alubia	Tiziú	Mesoamericano	Negro
Paloma	Andino	Blanco tipo Alubia	Uirapurú	Mesoamericano	Negro
PF1	Andino	Blanco tipo Alubia	BNOA PHA 018	Andino	No comercial. Población nativa
Anahí	Andino	Light Red Kidney	BNOA PHA 77	Andino	No comercial. Población nativa
Escarlata	Andino	Dark Red Kidney	BNOA PHA 180	Andino	No comercial. Población nativa

Material	Acervo génico	Tipo	Material	Acervo génico	Tipo
Leales R4	Andino	Dark Red Kidney	BNOA PHA 220	Andino	No comercial. Población nativa
Línea 5	Andino	Dark Red Kidney	BNOA PHA 361	Andino	No comercial. Población nativa
Otto 45-78	Andino	Dark Red Kidney	BNOA PHA 362	Andino	No comercial. Población nativa
Otto 45-79	Andino	Dark Red Kidney	BNOA PHA 461	Andino	No comercial. Población nativa
Otto 45-82	Andino	Dark Red Kidney	BNOA PHA 466	Andino	No comercial. Población nativa
Otto 50-2	Andino	Light Red Kidney	BNOA PHA 467	Andino	No comercial. Población nativa
Otto 51-2	Andino	Dark Red Kidney	BNOA PHA 470	Andino	No comercial. Población nativa
VAX3	Mesoamericano	Dark Red Kidney	BNOA PHA 486	Andino	No comercial. Población nativa
VAX6	Mesoamericano	Dark Red Kidney	BNOA PHA 488	Andino	No comercial. Población nativa
BAT	Mesoamericano	Marrón	BNOA PHA 492	Andino	No comercial. Población nativa

Material	Acervo génico	Tipo	Material	Acervo génico	Tipo
Carioca	Mesoamericano	Cranberry	BNOA PHA 498	Andino	No comercial. Población nativa
Carioca (M)	Mesoamericano	Cranberry	BNOA PHA 511	Andino	No comercial. Población nativa
Gateado	Mesoamericano	Cranberry	BNOA PHA 573	Andino	No comercial. Población nativa
Leales CR5	Andino	Cranberry	BNOA PHA 589	Andino	No comercial. Población nativa
SEA	Mesoamericano	Mulato (crema)	BNOA PHA 591	Andino	No comercial. Población nativa
VAX 1	Mesoamericano	Cranberry	BNOA PHA 597	Andino	No comercial. Población nativa
Azabache	Mesoamericano	Negro	BNOA PHA 707	Andino	No comercial. Población nativa
Cegro 99/11-2	Mesoamericano	Negro			

Tabla 18. Condiciones empleadas en electroforesis para la observación de productos logrados por el marcador CB_475.

Agarosa (%)	Voltaje (W)	Tiempo (min)	Frente de corrida (cm)
4	100	60	5.5
3	100	35	5.5
3	100	90	15
2	100	35	5.5

5.3.4 Validación del marcador CB_475 en muestras de campo

Del total de muestras de poroto recolectadas durante las campañas 2016, 2017 y 2018 (Ver Capítulo 2, Materiales y métodos 2.3.1), se seleccionaron 55 para validar el desempeño del marcador CB_475. Se incluyeron muestras correspondientes a distintas localidades y provincias, de distintos tipos (poroto blanco, negro, cranberry o chaucha) y de distintas condiciones sanitarias (enfermas o sanas). Se registraron las temperaturas de fusión (T_m-shift) logradas tras la técnica (T_m)-shift SNP genotyping, y se realizó un análisis de varianza con el programa INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2018) en función de las condiciones sanitarias y los tipos de poroto evaluados.

5.3.5 Evaluación de proyección de uso de marcadores ajustados hacia la resistencia de otros begomovirus: el caso BBSV

Para evaluar la respuesta específica o no de los marcadores moleculares ajustados CB_475 y BGY 7.1 asociados según bibliografía a resistencia de BGYMV, su uso se extendió para el análisis estadístico sobre los tres cultivares de poroto ensayados y evaluados fenotípicamente frente a infecciones por BBSV: Alubia selección Cerrillos, Leales CR5 (LCR5) y NAG12 (ver Capítulo 4). Por cada individuo de cada material tratado (20 por cultivar, n total = 60), se realizaron extracciones de DNA para utilizar en el desarrollo de la técnica (T_m)-shift SNP genotyping, según lo anteriormente descrito para estos marcadores (ver apartado 5.3.3.2). Se registraron las temperaturas de los picos

de fusión (T_m -shift) generadas y se realizó un análisis de la varianza con el programa INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2018).

5.4 Resultados

5.4.1 Ajuste de los marcadores moleculares SCAR: SR2 y SW12700

Se ajustaron los marcadores moleculares SR2 y SW12700. Se observó un mejor desempeño de SR2 a 60 °C frente a SW12700 evaluado tanto a 60 como 70 °C; sin embargo, ambos materiales, de fenotipos contrastantes, no presentaron diferencias en el tamaño de los productos amplificados. En geles de agarosa, no fue posible discernir la existencia de diferencias de tamaño entre los fragmentos amplificados para su categorización en genotipos resistente (530 pb) o susceptibles (570 pb) (Figura 45). En los geles de poliacrilamida tampoco se registró tal diferencia. Por otro lado, SW12700, mostró una baja eficacia en la amplificación del material base a ambas temperaturas ensayadas (60 °C y 70 °C).

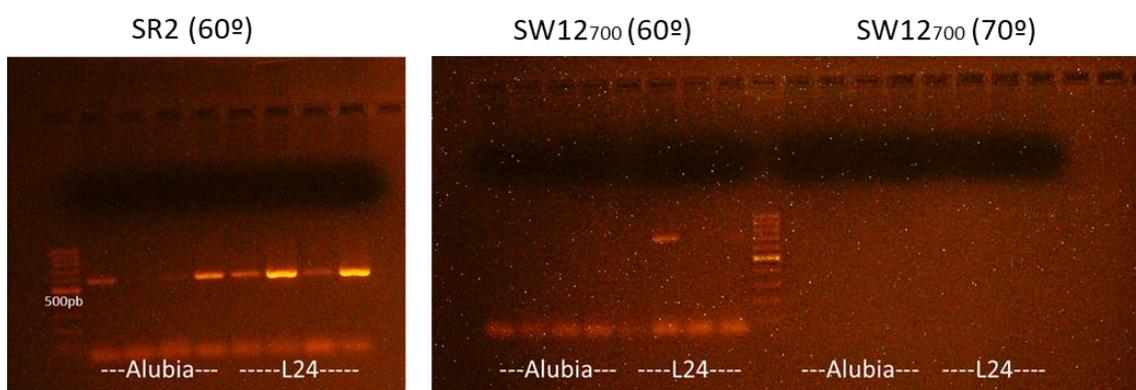


Figura 45. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de amplificaciones obtenidas por PCR a distintas condiciones de temperatura, de los marcadores SR2 y SW12700.

5.4.2 Ajuste del marcador SNP: CB_00434 (*bgm-1*)

El ajuste del marcador CB_00434 (*bgm-1*) mostró comportamientos variados en los genotipos evaluados en los diferentes números de ciclos de amplificación empleados (39, 42, 45 y 50) y según el tipo de muestra utilizada. En amplificaciones a 39 ciclos, los genotipos NAG12 (pool) y VAX 3 presentaron picos de fusión (melt peak) a los 76.5 °C. Alubia y LCR5 no lograron productos concretos, esto se reflejó en el nulo desarrollo de curvas de fusión (Figura 46).

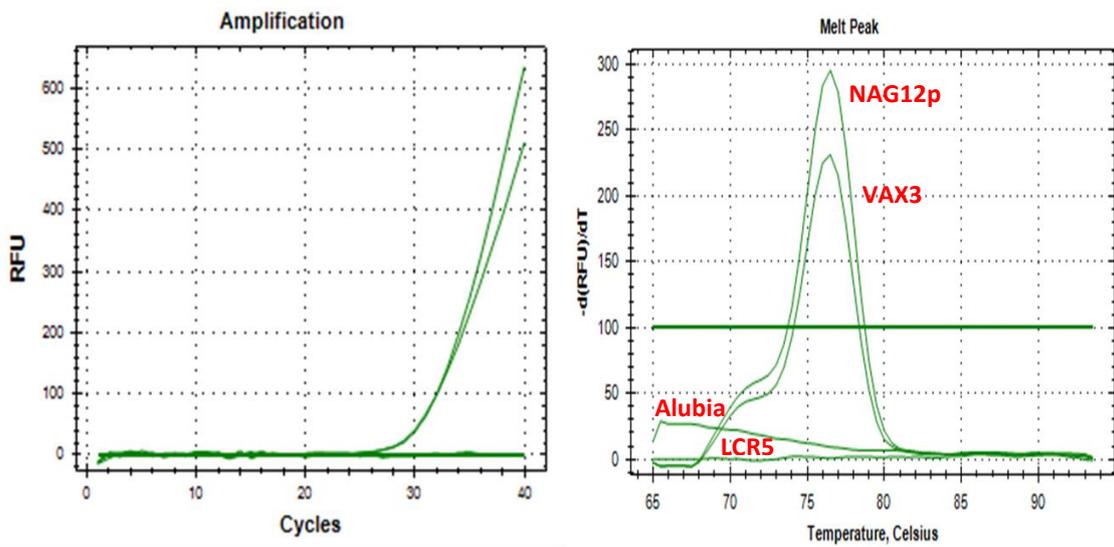


Figura 46. Curvas de amplificación y fusión (melt curve) a 39 ciclos para los materiales NAG12p (pool), VAX3, Alubia y LCR5.

A 42 ciclos de amplificación, se observó una mayor cantidad de muestras amplificadas. Aquí, el desarrollo de los picos en las curvas de fusión también se centró alrededor de los 76.5 °C. Sin embargo, los genotipos Alubia, LB40 y Gateado (tanto en muestras simples como en pools) y NAG12, presentaron picos muy suaves reflejando una baja cantidad de producto amplificado (letra roja) (Figura 47).

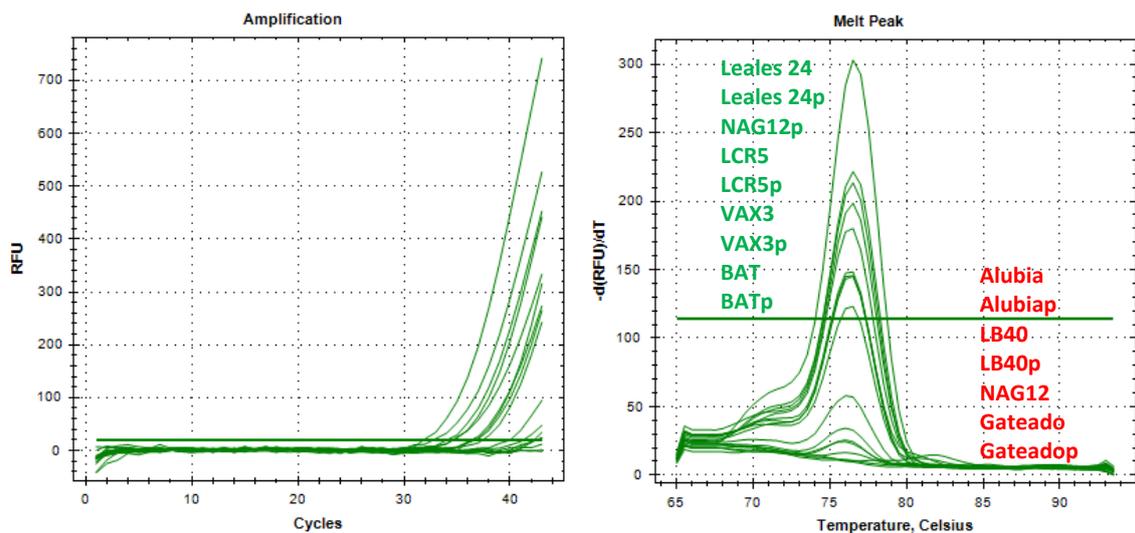


Figura 47. Curvas de amplificación y fusión (melt curve) y sus picos, a 42 ciclos. En letra verde se destacan los materiales que lograron amplificarse y generar los picos en sus curvas de fusión por encima de la línea de corte. En rojo se mencionan los materiales que no lograron amplificaciones y curvas considerables. Los materiales con la letra “p” al final, indican que provienen de pools.

A 45 ciclos, se repitió el uso de los genotipos con picos suaves antes mencionados y LCR5. Aquí, se pudo observar picos a 76.5 °C para LB40 y Gateado en sus extracciones simples y pooles, y NAG12. LCR5 y Alubia (pool) muestran 2 picos a los 76 y 80.5 °C, sin embargo, son picos muy bajos (productos amplificados de baja calidad y cantidad) comparables con los del control negativo que presenta un pico a los 81.5 °C (Figura 48).

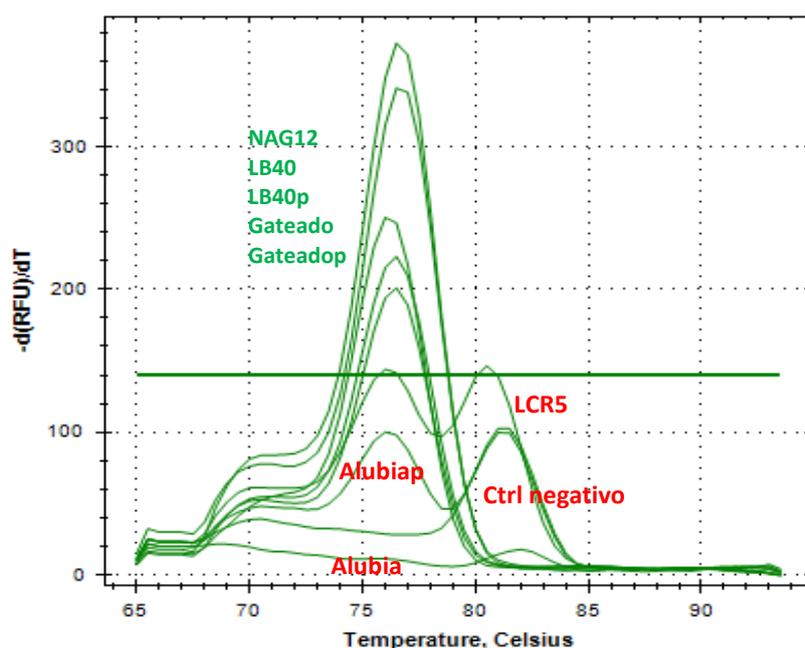


Figura 48. Curvas de fusión (melt) de amplificaciones a 45 ciclos de genotipos con amplificaciones y picos bajos observados en 42 ciclos. En letra roja se indican los genotipos con productos de baja calidad y cantidad, comparables con el control negativo (Ctrl negativo). En letra verde se destacan los materiales que lograron amplificarse y generar picos en sus curvas de fusión por encima de la línea de corte

En una nueva repetición de amplificaciones a 45 ciclos, todos los genotipos utilizados (tanto de muestras simples como pooles) registraron picos a los 76.5 °C, aunque algunos de ellos son bajos. Gateado (pool) y Alubia (simple y pool) no mostraron ser amplificados. Por otro lado, LCR5 (pool) manifestó un marcado pico en los 78 °C, mientras que LCR5 (muestra simple) lo hizo en 76.5 °C (Figura 49).

Cuando las reacciones se llevaron a cabo con 50 ciclos de amplificación, los genotipos Leales 24 y VAX3 (pool) experimentaron un incremento de temperatura en el desarrollo de sus picos de fusión de 80.5 °C y 79.5 °C respectivamente. El resto de las muestras presentó amplificaciones con curvas de fusión entre los 76 °C y 77 °C. Alubia

(pool), LB40 y LCR5 presentaron dos picos, pero basadas en bajas amplificaciones (Figura 49).

El ajuste del marcador CB_00434, mostró una mejor amplificación, con su posterior desarrollo de las curvas de fusión, en la repetición de 45 ciclos. Alubia y LCR5 presentaron dobles picos a los 45 y 50 ciclos de amplificación, sin embargo, corresponden a productos poco confiables. El material Alubia tuvo problemas en su amplificación en todos los casos evaluados. En todos los materiales (a excepción de L24, LCR5pool y VAX3pool), e independientemente del tipo de muestra (simple o pool), se observó, en promedio, un pico de temperatura cercano a los 76.5 °C (Tabla 19).

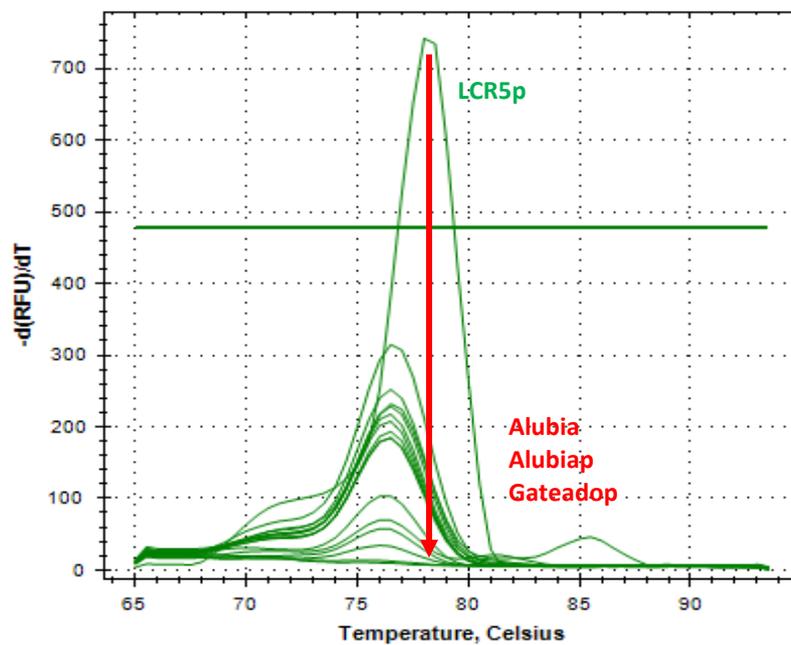


Figura 49. Curvas de fusión de amplificaciones a 45 ciclos (repetición) de todos los genotipos evaluados. En rojo se destacan los materiales que no lograron amplificaciones y curvas de fusión.

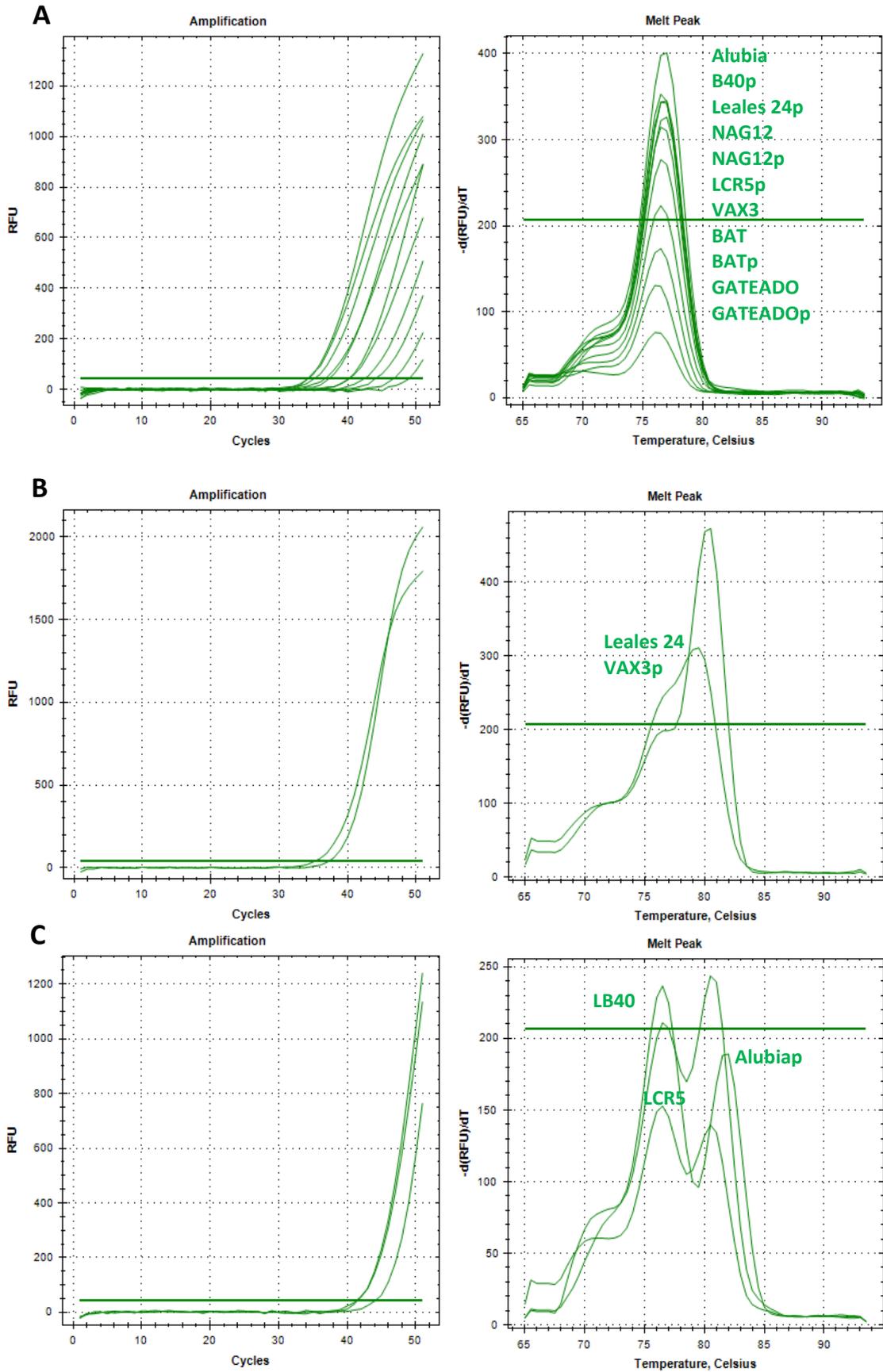


Figura 50. Curvas de amplificación y fusión a 50 ciclos, para genotipos con picos de fusión de 76.5-77 °C (A), 79.5-80 °C (B), y 76.5-81 °C (C).

Tabla 19. Picos de fusión (°C) de los materiales evaluados por el marcador CB_00434 a distintos números de ciclado.

Material	Número de ciclos de amplificación					Promedio (°C)
	39	42	45	45 (rep.)	50	
Alubia	SA	SA	SA	SA	76	76
Alubia pool	-	SA	76 - 80.5*	SA	76.5 – 82*	76.5
LB40	-	SA	76.5	76	76.5 – 80.5*	76.3
LB40 pool	-	SA	76.5	76.5	76.5	76.5
LCR5	SA	76.5	76 - 80.5*	76.5	76.5 - 80.5*	76.38
LCR5 pool	-	76.5	-	78	76.5	77
L24	-	76.5	-	76.5	80.5	77.83
L24 pool	-	76.5	-	76.5	77	76.67
NAG12	-	SA	76.5	76.5	76.5	76.5
NAG12 pool	76.5	76.5	-	76.5	77	76.63

Material	Número de ciclos de amplificación					Promedio (°C)
	39	42	45	45 (rep.)	50	
VAX3	76.5	76.5	-	76.5	77	76.63
VAX3 pool	-	76.5	-	76.5	79.5	77.5
BAT	-	76.5	-	76.5	76.5	76.5
BAT pool	-	76.5	-	76.5	76.5	76.5
Gateado	-	SA	76.5	76.5	76.5	76.5
Gateado pool	-	SA	76.5	SA	76	76.25
Control negativo	-	SA	81.5	SA	73.5-82	

Nota: SA=Sin Amplificación; - = no evaluado; *= picos de amplificaciones de baja calidad.

5.4.3 Ajuste de los marcadores moleculares del tipo SNP: CB_475, S04_2531038 (BGY4.1), S1137_407 (BGY7.1) y S08_9202267 (BGY8.1)

Se observó un buen desempeño, principalmente, de los marcadores CB_475 y S1137_407 (BGY7.1). Los marcadores asociados a los QTL BGY4.1 y BGY8.1, no siempre lograron amplificaciones (Tabla 20).

Los materiales LB30, Otto 45-79, Carioca y Garça se descartaron del análisis debido a su mala germinación o problemas en la extracción de DNA.

Respecto a CB_475, todos los materiales mostraron patrones similares en sus curvas de fusión con picos alrededor de los 81 °C (Figura 51). La observación de los productos de PCR-HRM por electroforesis fue más clara en geles largos de 15 cm corridos durante 90 minutos y del 3% p/v de agarosa. Se observó que todas las muestras corridas poseen un tamaño similar; esta igualdad es también concordante con los picos de temperatura próximos a 81 °C registrados en ellas. Se observó que los productos poseen un tamaño estimado por encima de los 70 pb (la variante susceptible posee un peso molecular de 78 pb) (Figura 52).

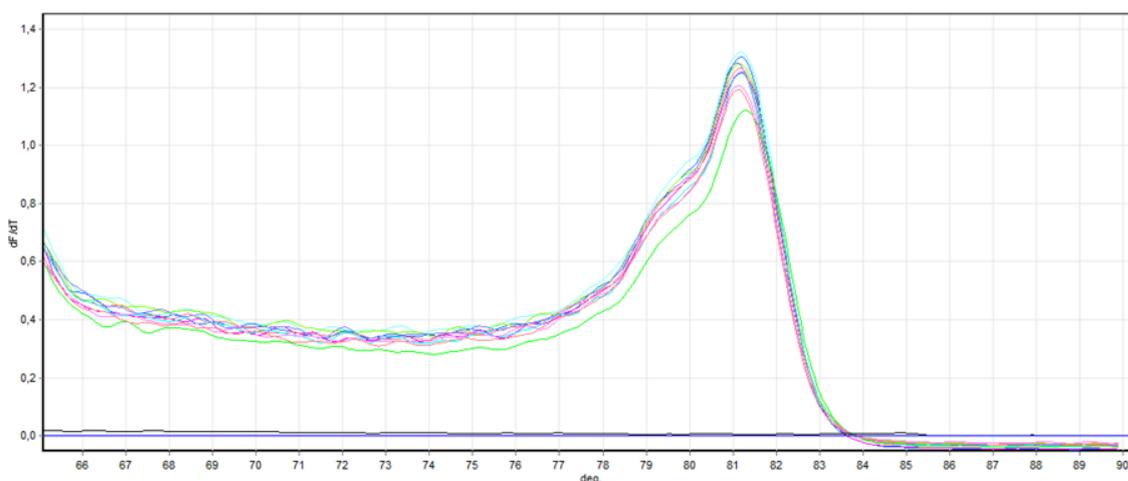


Figura 51. Patrón de curvas de fusión observadas para los productos amplificados por el marcador CB_475 de todos los materiales evaluados.

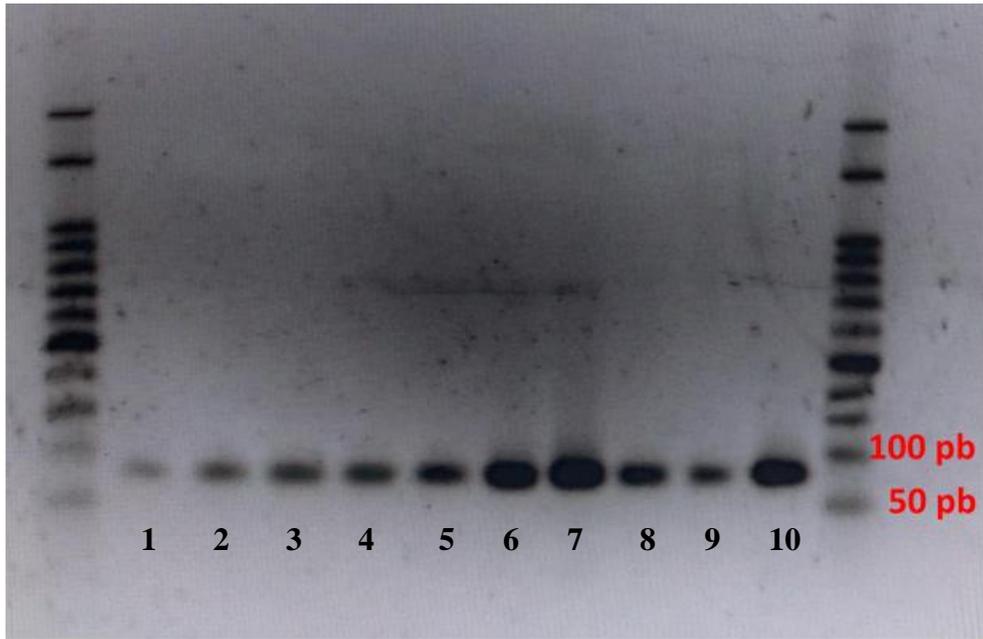


Figura 52. Corrida electroforética de 90 minutos en gel de agarosa al 3% de los productos LB40 (1 y 6), LCR5 (2 y 7), NAG12 (3 y 8), L24 (4 y 9) y VAX6 (5 y 10), con marcador de 50 pb de diferencia entre bandas.

Tabla 20. Temperaturas de fusión (picos °C) de los materiales evaluados por los marcadores CB_475, S04_2531038 (BGY4.1), S1137_407 (BGY7.1) y S08_9202267 (BGY8.1).

Material	Temperatura de fusión (°C)			
	CB_475	BGY 4.1	BGY 7.1	BGY 8.1
Alubia	81.15	SA	79.3	80.46
LCR5	81.17	SA	79.42	SA
NAG12	81.25	SA	77.97	79.53
VAX6	81.14	SA	79.59	79.3
L17	81.02	SA	79.24	SA
LB40	81.19	SA	79.42	80.74
Paloma	81.15	SA	79.3	SA
PF1	81.18	SA	79.36	80.56
Anahí	81.18	SA	79.10	80.60
Escarlata	81.12	SA	79.22	80.56
LR4	81.18	SA	77.62	SA
Línea 5	81.2	78.3	77.74	80.6
Otto 45-78	81.2	SA	79.20	SA
Otto 45-82	81.23	82.24-84.7-87*	79.20	80.84

Material	Temperatura de fusión (°C)			
	CB_475	BGY 4.1	BGY 7.1	BGY 8.1
Otto 50-2	81.2	78.16*	77.86	SA
Otto 51-2	81.16	SA	77.8	SA
VAX3	81.15	SA	79.73	80.9
BAT	81.1	SA	79.57	79.24
Carioca (M)	81.15	SA	79	80.8
Gateado	81.1	SA	77.9	80.87
SEA	81.15	77.6	79.30	79.47
VAX1	81.15	78.1*	79.34	79.63
Azabache	81.1	SA	77.81	79.3
Cegro 99/11-2	81.17	SA	77.9	79.4
Gralha	81.13	SA	78.67	80.78
Grauna	81.16	SA	79.62	80.67
L24	81.17	SA	77.87	79.3
Tiziú	81.17	SA	78.86	80.9
Uirapurú	81.18	SA	78.94	79.38
BNOA PHA 018	81.15	SA	79.15	SA

Material	Temperatura de fusión (°C)			
	CB_475	BGY 4.1	BGY 7.1	BGY 8.1
BNOA PHA 77	81.18	78.14	78.48	SA
BNOA PHA 180	81.22	SA	79.34	SA
BNOA PHA 220	81.2	SA	79.20	80.45
BNOA PHA 361	81.18	SA	79.26	SA
BNOA PHA 362	81.15	SA	79.94	80.4
BNOA PHA 461	81.17	78.2	79.26	SA
BNOA PHA 466	81.18	SA	79.4	80.45
BNOA PHA 467	81.18	SA	79.26	SA
BNOA PHA 470	81.12	82.64-84.86-86.44*	79.12	SA
BNOA PHA 486	81.15	SA	79.30	SA
BNOA PHA 488	81.12	SA	79.26	SA
BNOA PHA 492	81.18	SA	79.05	SA
BNOA PHA 498	81.18	SA	79.10	SA
BNOA PHA 511	81.18	SA	79.4	SA
BNOA PHA 573	81.18	SA	79.3	SA
BNOA PHA 589	81.18	SA	79.24	SA

Material	Temperatura de fusión (°C)			
	CB_475	BGY 4.1	BGY 7.1	BGY 8.1
BNOA PHA 591	81.19	SA	79.4	SA
BNOA PHA 597	81.13	SA	79	SA
BNOA PHA 707	81.15	SA	79.16	SA

SA=Sin Amplificación; *= picos de fusión de ampliaciones de baja calidad.

5.4.4 Validación del marcador CB_475 en muestras de campo

La validación del marcador CB_475 en la selección de muestras recolectadas durante las campañas de muestreo 2016, 2017 y 2018, no mostró diferencias significativas entre las temperaturas de fusión (T_m -shift) registradas en las distintas condiciones sanitarias, ni tampoco según tipo de poroto (blanco, negro, cranberry y chaucha) o muestra considerada (Figura 53).

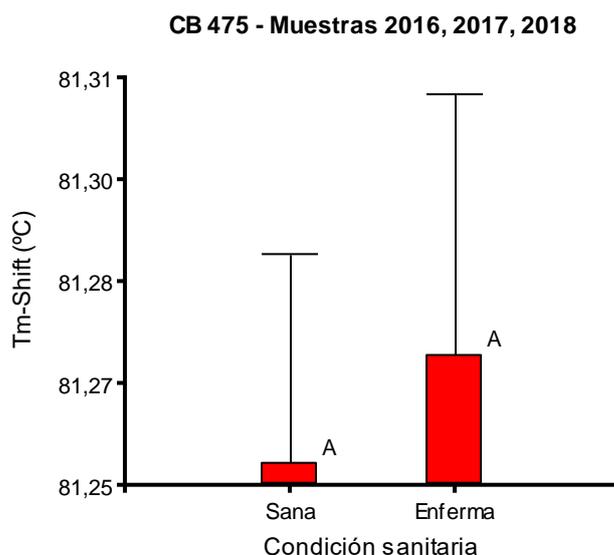


Figura 53. Comparación de medias y error estándar de la temperatura de fusión (T_m -shift) para la condición sanitaria enferma y sana de todas las muestras empleadas. Letras diferentes indican diferencias significativas en test de LSD Fisher ($p > 0.05$; $n = 55$).

5.4.5 Evaluación de proyección de uso de marcadores ajustados hacia la resistencia a otros begomovirus: el caso BBSV

Para el marcador CB_475, asociado al gen recesivo de resistencia *bgm-1*, no se observaron diferencias significativas ni para los distintos acervos génicos evaluados (andino y mesoamericano), ni para los materiales evaluados y tampoco para las condiciones sanitarias (enfermas (vp) y sanas (va)) de las plantas tratadas (Figura 54).

Respecto al marcador BGY7.1, asociado a un QTL de resistencia a BGYMV, se observó que tampoco existieron diferencias significativas en la T_m -shift de las distintas condiciones sanitarias tratadas independientemente de sus acervos génicos y del material evaluado. Sin embargo, si se observaron diferencias significativas cuando se consideró los distintos acervos y los materiales evaluados. El cultivar NAG12 de acervo

mesoamericano y de comportamiento de tolerancia (o menor susceptibilidad que el cultivar Alubia) frente a infecciones por BBSV, tuvo un Tm-shift menor a LCR5 y Alubia. Estos dos últimos cultivares de acervo génico andino tuvieron una Tm-shift mayor a NAG12 pero no diferente entre ellas. Sin embargo, Alubia fue notoriamente más susceptible que LCR5 en las evaluaciones fenotípicas (Figura 55).

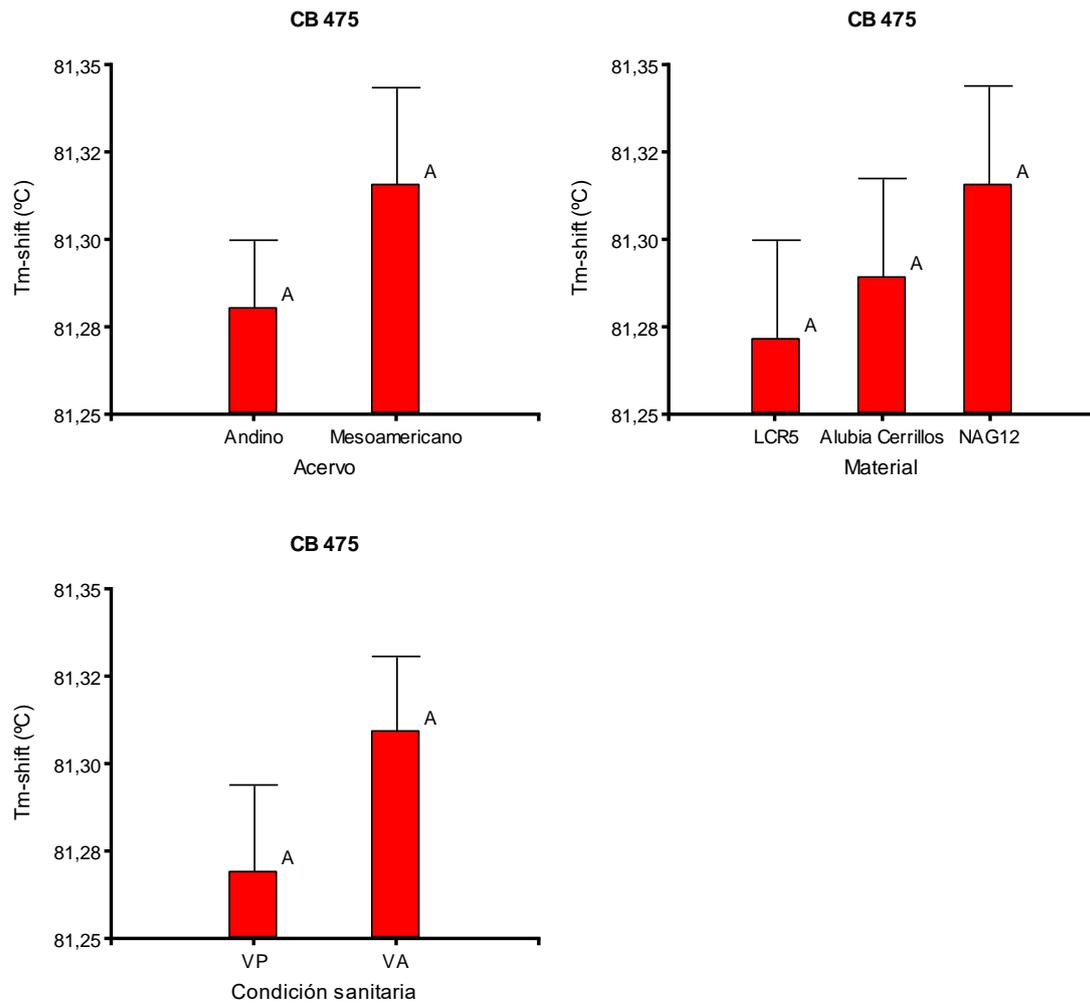


Figura 54. Gráfico de barras del análisis estadístico de las temperaturas de fusión (Tm-shift) registradas para el marcador CB_475 (PvNAC1) sobre las condiciones acervo génico, material y condición (VA=virus ausente, planta no infectada; VP=virus presente, planta infectada). Letras diferentes indican diferencias significativas en test de LSD Fisher ($p > 0.05$; $n=60$).

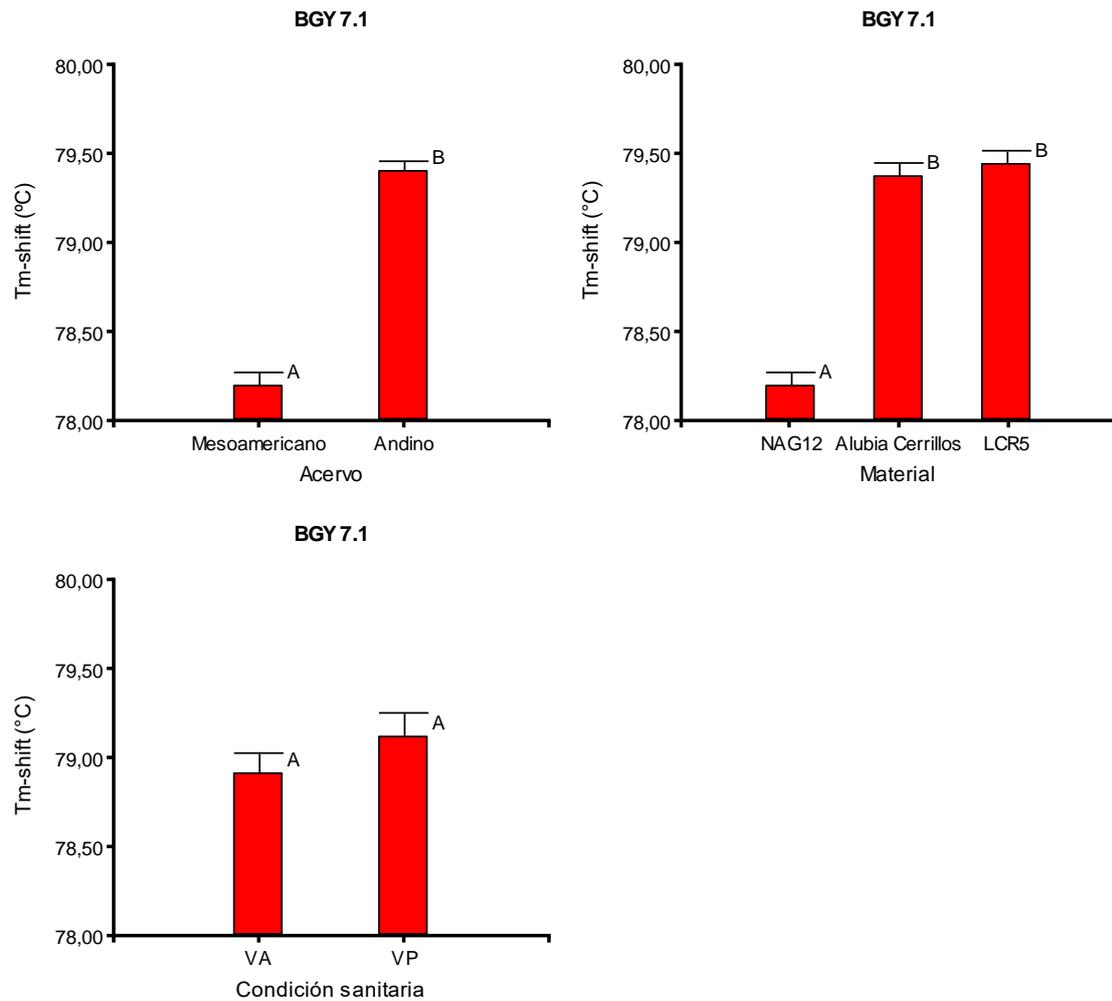


Figura 55. Gráfico de barras del análisis estadístico de las temperaturas de fusión (T_m -shift) registradas para el marcador asociado al QTL BGY 7.1 sobre las condiciones acervo génico, material y condición (VA=virus ausente, planta no infectada; VP=virus presente, planta infectada). Letras diferentes indican diferencias significativas en test de LSD Fisher ($p > 0.05$; $n = 60$).

5.5 Discusión

El sistema productivo de poroto basado en variedades de alto valor económico, requiere de un manejo sanitario actualmente cubierto, únicamente, por el uso de fitosanitarios, que implica elevados costos a la empresa agropecuaria e importantes impactos a nivel ambiental y social; por lo que contar con variedades resistentes a patógenos como los begomovirus es de suma importancia. En este contexto, los marcadores moleculares se presentan como una herramienta de gran utilidad para los programas de mejoramiento asistiendo a la selección y generación de materiales resistentes (Blair et al., 2007; Meziadi et al., 2017; Ruíz-Salazar et al., 2017; Singh et al., 2000; Soler et al., 2017).

En este capítulo se trabajó sobre el ajuste y uso de marcadores del tipo SCAR y SNP asociados a resistencia de BGYMV, miembro del género begomovirus, e intentando extrapolar su uso hacia BBSV. El ajuste de los marcadores moleculares SR2 y SW12₇₀₀ fue posible, sin embargo, la comparación entre la información fenotípica o de comportamiento de los materiales trabajados frente a infecciones ocasionadas por estos patógenos, y la aportada por estos marcadores, genera dudas respecto a la eficacia de los mismos para ser incluidos en futuros programas de mejoramiento del cultivo. Sobre los marcadores del tipo SCAR, se observó un mejor comportamiento de SR2 por sobre SW12₇₀₀, que mostró una baja eficacia en la amplificación de los materiales utilizados. Por otro lado, SR2 uno de los marcadores más utilizados en la selección para el carácter en estudio (Blair et al., 2007), demostró una buena eficacia, sin embargo, se obtuvo un tamaño similar de los productos amplificados tanto para Alubia como para L24 (materiales contrastantes respecto a la respuesta que generan frente a enfermedad (Rodríguez Pardina et al., 2018)). Esto concuerda con lo desarrollado por Anaya-López et al., donde sobre una base de líneas recombinantes, observaron, en plantas inoculadas de poroto negro de acervo mesoamericano (tal como lo es L24), el desarrollo de síntomas aun encontrándose el marcador SR2 ligado al gen de resistencia *bgm-1* (Anaya-López et al., 2018). Según investigadores de programas de mejoramiento de poroto del CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), el marcador SR2 habría sido superado por la recombinación y no sería un diagnóstico eficaz para algunos materiales. En otras palabras, la distancia del marcador respecto a *bgm-1* (Blair et al., 2007) es tal que puede perderse en cruzamientos o segregarse de manera independiente dando resultados contradictorios como los obtenidos por otros investigadores y los observados en este

trabajo. Por otro lado, Duncan et al. 2006, indican que el uso de un único marcador SCAR no es suficiente para evidenciar la existencia de resistencia, proponiendo el empleo de dos o más.

En este contexto, el genotipado por secuenciación (GBS) ha dado lugar al desarrollo de marcadores SNP que se presentan como alternativa superadora en la selección asistida por marcadores (Soler et al., 2017; 2021). El marcador SNP CB_00434 (no publicado, comunicación personal), desarrollado por investigadores del CIAT, similar al CB_00352 (Soler et al., 2017) pero optimizado, fue utilizado en este trabajo para la puesta a punto del protocolo de uso de este tipo marcadores, la técnica de genotipado de SNP con temperatura de cambio (“(T_m)-shift SNP genotyping” (Wang et al., 2005)) y la visualización de las variantes alélicas logradas (productos de PCR) a través de HRM (Taylor et al., 2009). Tanto materiales de acervos génicos andinos como mesoamericanos, de distinta respuesta fenotípica frente a BGYMV, tuvieron similares temperaturas de fusión en sus productos amplificados; y, si bien, se observaron algunos problemas de amplificación en ciertos materiales, repeticiones de este proceso modificando la cantidad de ciclos empleados, resultaron siempre en valores similares. A su vez, la inclusión de muestras simples o en grupos (pooles) no tuvo efecto, considerándose de esta manera la baja variabilidad interna de las poblaciones, o cultivares en estudio, y más aún fueron concluyentes en plantear el uso de muestras individuales para evitar cualquier inconveniente y mantener caracterizada las particularidades de cada individuo con objetivos como los de mantener la pureza varietal y favorecer la selección. Los resultados obtenidos tras el ajuste de este marcador permitieron afianzar el uso de las diversas técnicas antes mencionadas y concluir la existencia de una baja variabilidad genotípica en los materiales utilizados. En comunicación personal con Alvaro Soler (2022), afirmó que CB_00434, presentó 52 falsos positivos en un panel de 180 líneas evaluadas.

Continuando con lo trabajado por Soler et al. 2021, en este capítulo, también se empleó el uso de nuevos SNPs, asociados a *bgm-1* y QTLs de resistencia a BGYMV (CB_475, S04_2531038, S1137_407, y S08_9202267). La presencia de los marcadores asociados a los QTLs no poseen efecto por sí solos, pero aumentan o mejoran el nivel de resistencia cuando se combinan con *bgm-1* (Soler et al., 2021). En este trabajo los marcadores asociados a los QTL 4.1 y 8.1, no presentaron eficacia tras su uso, ya que no lograron ningún tipo de amplificación, de esta manera, no evidenciaron mejoría en los niveles de resistencia. Por otro lado, BGY7.1 sí permitió la observación de las temperaturas de fusión del germoplasma evaluado, sin embargo, su efecto es aditivo junto

al QTL BGY4.1 y válido en presencia de *bgm-1* (Soler et al., 2021). Por otro lado, el marcador CB_475, amplificó en todos los materiales, productos con una temperatura de fusión cercana a los 81 °C. La inclusión de VAX6 como línea testigo de susceptibilidad, la observación de los patrones de las curvas de fusión logradas y el peso molecular de las mismas a través de análisis electroforéticos, deja en evidencia que, en el germoplasma aquí evaluado, el marcador CB_475 se asocia a la ausencia del gen recesivo de resistencia a BGYMV. Lo mismo sucede en la validación de este marcador en muestras de campo sanas y enfermas, y de distintos tipos (blanco, negro, cranberry y chaucha). Posiblemente las plantas sanas aquí evaluadas poseen esta condición sanitaria debido a ausencia de enfermedad y no por presencia de resistencia, ya que las Tm-shift también fueron próximas a los 81 °C y no diferentes con las plantas infectadas, y tampoco diferentes entre los distintos tipos de muestras incluidas.

En una proyección de uso de los marcadores CB_475 y BGY7.1 sobre los materiales LCR5, NAG12 y Alubia selección Cerrillos (tres distintos tipos comerciales de poroto) caracterizados en su comportamiento frente a BBSV en el capítulo 4 de esta tesis, se observó que no existen diferencias en las variantes alélicas según el marcador CB_475 para las distintas condiciones consideradas (material, condición sanitaria, acervo génico). Todos los individuos incorporados en este análisis registraron una temperatura de fusión cercana a los 81 °C, siendo este valor asociado a variantes alélicas de susceptibilidad. Ahora bien, en la evaluación fenotípica de los materiales, se observó cierta tolerancia en LCR5 y una alta susceptibilidad en Alubia (en NAG12 fue un caso intermedio). En este sentido, el marcador no estaría en correlación con la respuesta fenotípica observada. CB_475 podría poseer una respuesta específica para BGYMV, no siendo extrapolable su uso para evaluación de resistencia frente a BBSV. Esto concuerda con lo expuesto por Anaya-López et al. 2018, quienes afirman que aunque en términos prácticos el gen *bgm-1* es el más importante para conferir resistencia a BGYMV, el mismo está asociado con la resistencia a los síntomas generales de la enfermedad como amarillamiento o clorosis, pero no con síntomas como el enanismo y el desarrollo normal de vainas durante infección.

Respecto al marcador BGY7.1, asociado a un QTL de resistencia a BGYMV el cual confiere aumento en los niveles de resistencia en presencia y combinación con *bgm-1*, se observó que tampoco existieron diferencias significativas según la condición sanitaria. Sin embargo, si se observaron diferencias cuando se consideró los distintos materiales y acervos génicos evaluados. El cultivar NAG12 de acervo mesoamericano y

de comportamiento de tolerancia (o menor susceptibilidad que el cultivar Alubia) frente a infecciones por BBSV, tuvo un Tm-shift menor a LCR5 y Alubia. Estos dos últimos cultivares de acervo génico andino tuvieron una Tm-shift mayor a NAG12, pero no diferente entre ellas. Sin embargo, Alubia fue notoriamente más susceptible que LCR5 en las evaluaciones fenotípicas. Si bien la resistencia otorgada por este marcador es supeditada a la existencia de *bgm-1*, en este caso evaluado, BGY7.1 no estaría respondiendo a determinar resistencia (o su aumento) pero sí podría estar diferenciando materiales de acervos génicos mesoamericanos de andinos. Ahora bien, si *bgm-1*, estuviera presente, BGY7.1 podría estar explicando mayor o menor resistencia, pero su eficacia podría estar perdiéndose dentro de los materiales de acervo génicos andinos, ya que aquí no lograría hacer visible esas diferencias. O alternativamente podría estar indicando la presencia de algún otro gen fijado y arrastrado en los cruzamientos que dieron origen a estas líneas.

El tipo de marcadores genéticos del tipo SNP demuestran mejorías frente a otros, sin embargo, es necesario profundizar en conceptos e información sobre el desempeño de los mismos, en ajustar las técnicas de amplificación y análisis (HRM), tomar referencias de alelos/genotipos (susceptible o resistente) y su representación en las curvas de fusión, conocer el comportamiento de genotipos intermedios, etc.

Finalmente debe discutirse y estandarizar el término de resistencia, ya que algunos autores aluden a la capacidad de las plantas de producir granos o de mantener un comportamiento estable en términos productivos aun afrontando enfermedad, otros afirman que se trata de la no generación de cierto tipo de síntomas bajo infección. También debe considerarse que la expresión génica (fenotipo observado), puede alterarse por diversas condiciones ambientales como la temperatura, la humedad, la luz, el título y la cepa viral (Meziadi et al., 2017), y en evaluaciones a campo, por las infecciones esporádicas y desiguales (Soler et al., 2021). Además, también existen otros mecanismos de resistencia basados en la morfología vegetal y metabolitos producidos (Helser & Tharp, 2005; Ojeda et al., 2013; Sautua & Carmona, 2022; Zavala, 2010). Por su parte, el uso de marcadores moleculares asociados a resistencia a enfermedades ocasionadas por begomovirus nos permitiría simplificar y mejorar la dinámica de los programas de mejora. Esta adaptación supone poner a punto las técnicas necesarias para cada marcador y, posteriormente, comprobar su funcionamiento contrastando los resultados obtenidos con otros previamente conseguidos o a través de la observación del comportamiento real del carácter en cuestión bajo distintas condiciones.

5.6 Conclusión

El ajuste de marcadores moleculares del tipo SCAR, SR2 y SW12₇₀₀, asociados a genes o QTLs de resistencia a begomovirus fue posible. Sin embargo, sus eficacias son cuestionables, dada la distancia de recombinación con el gen de resistencia, para ser incluidos en futuros programas de mejoramiento del cultivo.

En su lugar, el ajuste y uso de los marcadores moleculares del tipo SNP, es más fehaciente y su empleo factible mediante las técnicas de Tm-shift SNP genotyping y HRM. Tratar a las muestras de manera individual es más conveniente que en grupos (pooles), debido a la baja variabilidad observada en los materiales aquí utilizados y a fin de evitar introducir confusiones y facilitar los análisis posteriores. Además de incluir líneas (materiales) de comportamiento fenotípico conocido, como fue el uso del cultivar VAX6 (susceptible ante BGYMV), conocer el peso molecular del fragmento amplificado o su temperatura de cambio-fusión (Tm-shift) para cada variante alélica (resistente/susceptible), es muy valioso para su uso en análisis electroforéticos para su determinación final en términos de comportamiento sanitario (resistencia/susceptibilidad).

La selección de germoplasma y las muestras de campo evaluadas a través del marcador CB_475, demuestran que, en Argentina, los cultivares disponibles y utilizados, se asocian a patrones de susceptibilidad hacia BGYMV.

La extensión de uso de este marcador, asociado al gen recesivo *bgm-1*, y de BGY 7.1, no es recomendable si se busca explicar el comportamiento diferencial de distintos genotipos frente a infecciones por BBSV. BGY 7.1, sin embargo, puede ser útil para diferenciar materiales de acervos genéticos andino y mesoamericano.

La especificidad de los marcadores moleculares por BGYMV, exige el desarrollo de nuevos marcadores si el objetivo es diferenciar tolerancia/resistencia vs susceptibilidad para BBSV.

Es necesario generar más información sobre marcadores moleculares para su empleo como herramienta en la búsqueda de resistencia a enfermedad ocasionada por begomovirus.

6. CONSIDERACIONES FINALES

La producción argentina de porotos se constituye en una economía regional de gran importancia debido a su principal destino exportador que genera una importante entrada de divisas y debido a un contexto mundial de aumento en la demanda de este tipo de productos para su consumo directo. En este contexto, la protección y mejora de la sanidad del cultivo para mantener la cantidad, calidad e inocuidad de su producción, son herramientas y estrategias primordiales para sostener al país en su máximo nivel competitivo como uno de los principales productores y exportadores. En este aspecto, identificar las adversidades bióticas como los begomovirus y las estrategias de manejo para contrarrestar sus efectos es fundamental.

Como pudo observarse en el desarrollo de esta tesis, los begomovirus están presentes en las regiones productivas del noroeste del país provocando distintas sintomatologías y pérdidas productivas, constituyéndose en una amenaza para esta economía regional. En este aspecto, considerar la identificación de estos patógenos es tarea fundamental. Ahora bien, es necesario extender este tipo de trabajos hacia otros hospederos como las malezas y otros cultivos que pueden comportarse como fuente de nuevos begomovirus o bien como hospederos alternativos o puentes verdes. Diversos cultivos se desarrollan en la región noroeste del país que pueden cumplir esta función haciendo de los agroecosistemas, sistemas vulnerables capaces de ser perjudicados por estos patógenos. Aprovechar las herramientas de la biología molecular y la bioinformática son clave para enriquecer y caracterizar la identificación de nuevos begomovirus y así poder incluirlos en nuevos estudios epidemiológicos, en la propia caracterización de especies, en el estudio de los efectos de su infección, etc.

En esta tesis, se confirma la presencia de begomovirus en lotes de producción de poroto, y en malezas asociadas, con incidencias que varían año a año y con una amplia distribución principalmente en las provincias de Salta y Jujuy que presentaron la mayor diversidad e incidencia de begomovirus. Los seis virus, hasta el momento reportados infectando poroto, se encuentran presentes y en muchas ocasiones participando en infecciones mixtas, principalmente en malezas. BGMV, ToMoWV y ToYVSV fueron los virus más incidentes. Aun así, se observó un alto porcentaje de begomovirus sin identificar. Un nuevo virus, con afinidad por leguminosas como soja y poroto, de nombre propuesto bean bushy stunt virus (BBSV) fue identificado y aquí reportado. En malezas asociadas, se observó una alta incidencia de infecciones mixtas, comportándose las

mismas como posibles reservorios de nuevos virus. Tal es el caso de la maleza *Euphorbia heterophylla* L., que albergó al menos tres begomovirus distintos, uno de ellos de nombre propuesto euphorbia severe leaf golden mosaic virus (EuSLGMV) el cual posee una identificación parcial debido a la falta de caracterización de su componente genómico DNA-B. Por otro lado, la caracterización biológica de BBSV fue factible mediante el ajuste de un sistema de inoculación por biobalística. Este instrumento permitió explorar rango de hospedantes y cumplir con los postulados de Koch, comportándose como una herramienta válida para la caracterización biológica de begomovirus.

La gran diversidad de cultivos en la región norte del país, la capacidad polífaga de las moscas blancas (vectores de begomovirus), la presencia de malezas y la capacidad de los begomovirus de infectar, sobrevivir y reproducirse, hacen necesario los estudios de identificación y caracterización de estos virus no solamente en poroto sino también en otros cultivos extensivos como soja, chíá, cártamo, poroto mung; y cultivos intensivos de gran importancia como tomate, pimiento, cucurbitáceas, entre otros.

La distribución e incidencia de begomovirus, además de responder a la existencia de hospederos, también guarda estrecha relación con exigencias ambientales particulares. La extensión de las regiones productivas donde el poroto es producido hacen de las mismas su paso por una gran cantidad de sitios con una gran variabilidad climática; sin embargo, esta alta dimensionalidad ambiental puede ser simplificada a través del uso de herramientas estadísticas; así es que, dentro del patosistema evaluado, se determinó a las temperaturas máximas invernales, la humedad y las precipitaciones en épocas de pre- siembra, como las variables meteorológicas de mayor impacto en la incidencia o presión de enfermedad ocasionada por estos patógenos. El logro de un modelo predictivo, basado en las variables mencionadas, obtuvo una buena capacidad predictiva, con alta precisión, sensibilidad y especificidad. Ahora bien, es necesario seguir validando el modelo y alimentarlo con información que aumente su precisión y cercanía a la realidad, como la existencia de otros cultivos, su susceptibilidad, la distribución y dinámica poblacional de los insectos vectores como también sus preferencias para alimentarse y reproducirse, los manejos agronómicos realizados, y los cambios ambientales como consecuencia del calentamiento global. El desarrollo de modelos predictivos podría componer sistemas de alerta temprana para la toma de decisiones de manejo de cultivos y, en consecuencia, reducir los riesgos de infección.

Por otro lado, las sintomatologías observadas en las plantas infectadas proveen información variada acerca de las respuestas que los individuos pueden brindar o bien de

la virulencia propia del patógeno. En esta tesis, la descripción del comportamiento de tres cultivares de poroto de distinto tipo, blanco (Alubia selección Cerrillos), negro (NAG12) y cranberry (LCR5)) y soja (Jack), frente a infecciones ocasionadas por BBSV, deja en evidencia la existencia de grandes diferencias, según los distintos parámetros analizados y síntomas observados. El cultivar Alubia, fue de los más fáciles de inocular y el que presentó evidentes indicios de enfermedad siendo el más afectado de los cultivares evaluados. El nivel de tolerancia a enfermedad fue más alto en LCR5, y en NAG12 se observó un comportamiento intermedio. Por otro lado, en el cultivar de soja Jack, también se registró un considerable nivel de tolerancia a la enfermedad. El impacto de las infecciones ocasionadas por BBSV debe ser altamente considerado más allá de los niveles de tolerancia/susceptibilidad de los materiales implicados, ya que las pérdidas de rendimiento generadas pueden ser cuantiosas. La caracterización del comportamiento de los distintos genotipos frente a infecciones originadas por begomovirus, puede resultar en información importante para el desarrollo de estrategias de manejo o selección de cultivares que muestren menor severidad de síntomas y mejor productividad en ambientes de alta presión de enfermedad.

Finalmente, la incorporación de genes o alelos en germoplasma de interés en la búsqueda de una resistencia amplia y estable a este tipo de enfermedades, ofrece una herramienta más en la protección de los cultivos frente a infecciones ocasionadas por begomovirus. Esto involucra el estudio y el buen ajuste de marcadores moleculares que se comporten de una manera eficiente y reflejen con la mayor certeza posible su asociación a caracteres de interés, como lo es la tolerancia/resistencia a enfermedades. En este trabajo, el ajuste de marcadores moleculares del tipo SCAR, SR2 y SW12₇₀₀, asociados a genes o QTLs de resistencia a begomovirus fue posible. Sin embargo, sus eficacias son cuestionables dada la distancia de recombinación con el gen de resistencia para ser incluidos en futuros programas de mejoramiento del cultivo. En su lugar, el ajuste y uso de los marcadores moleculares del tipo SNP, es más fehaciente y su empleo factible mediante la técnica de “Tm-shift SNP genotyping”. Además de incluir líneas (materiales) de comportamiento fenotípico conocido, como fue el uso del cultivar VAX6 (susceptible ante BGYMV), conocer el peso molecular del fragmento amplificado o su temperatura de fusión (Tm-shift) para cada variante alélica (resistente/susceptible), es muy valioso para su uso en análisis electroforéticos para su determinación final en términos de comportamiento sanitario (resistencia/susceptibilidad). En este contexto, el análisis de una selección de germoplasma y de muestras de campo evaluadas a través del marcador

CB_475, demuestra que, en Argentina, los cultivares disponibles y utilizados, se asocian a patrones de susceptibilidad hacia BGYMV. Ahora bien, la extensión de uso de este marcador, asociado al gen recesivo *bgm-1*, y de BGY 7.1, no es recomendable si se busca explicar el comportamiento diferencial de distintos genotipos frente a infecciones por BBSV. BGY 7.1, sin embargo, puede ser útil para diferenciar materiales de acervos genéticos andino y mesoamericano, hecho que puede resultar de gran interés para estudios de mejoramiento. La especificidad de los marcadores moleculares por BGYMV, exige el desarrollo de nuevos marcadores si el objetivo es diferenciar tolerancia/resistencia vs susceptibilidad para BBSV u otros begomovirus a evaluar. Es necesario generar más información sobre marcadores moleculares para su empleo como herramienta en la búsqueda de resistencia a enfermedad ocasionada por begomovirus.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abán, C. L. (2019). Variabilidad fenotípica y genotípica de aislamientos de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, agente causal de la esclerotinia del poroto en el NOA. Tesis doctoral.

Acevedo Román, M., Castañeda, A. M., Angel Sánchez, J. C., Muñoz, C. G., & Beaver, J. S. (2004). Inheritance of normal pod development in bean golden yellow mosaic resistant common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129 (4), 549–552. <https://doi.org/10.21273/jashs.129.4.0549>

Adames-Mora, C., Beaver, J. S., & Díaz, O. (1996). Una metodología para evaluar en el invernadero el virus del mosaico dorado de la habichuela. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 80(1–2), 65–72.

Agarwal, G., Kavalappara, S. R., Gautam, S., Da Silva, A., Simmons, A., Srinivasan, R., & Dutta, B. (2021). Field screen and genotyping of *Phaseolus vulgaris* against two begomoviruses in Georgia, USA. *Insects*, 12 (1), 1–19. <https://doi.org/10.3390/insects12010049>

Agdia-EMEA. (2022). New molecular hybridization assays for begomovirus and curtovirus/becurtovirus. Obtenido de <https://www.agdia-emea.com/en/new-molecular-hybridization-assays-begomovirus-curtovirusbecurtovirus>

Agresti, A., & Tarantola, C. (2018). Simple ways to interpret effects in modeling ordinal categorical data. *Statistica Neerlandica*, 72 (3), 210–233. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/stan.12130>

Aidawati, N., Hidayat, S. H., Hidayat, P., Suseno, R., & Sujiprihati, S. (2007). Response of various tomato genotypes to begomovirus infection and its improved diagnostic. *HAYATI Journal of Biosciences*, 14 (3), 93–97. <https://doi.org/10.4308/hjb.14.3.93>

Ala-Poikela, M., Svensson, E., Rojas, A., Horko, T., Paulin, L., Valkonen, J. P. T., & Kvarnheden, A. (2005). Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant Pathology*, 54 (4), 448–459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01226.x>

Albuquerque, L. C., Martin, D. P., Ávila, A. C., & Inoue-Nagata, A. K. (2010). Characterization of tomato yellow vein streak virus, a begomovirus from Brazil. *Virus Genes*, 40, 140–147. <https://doi.org/10.1007/s11262-009-0426-2>

Aldas Manzano, J., & Uriel Jimenez, E. (2017). Análisis multivariante aplicado con R. Ediciones Paraninfo, SA.

Alemandri, V., Vaghi Medina, C. G., Dumón, A. D., Argüello Caro, E. B., Mattio, M. F., Medina, S. G., López Lambertini, P., Truol, G. (2015). Three members of the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) cryptic species complex occur sympatrically in Argentine horticultural crops. *Journal of Economic Entomology*, 108 (2), 405–413. <https://doi.org/10.1093/jee/tov017>

Alemandri, V., Rodriguez Pardina, P., Izaurrealde, J., García Medina, S., Argüello Caro, E., Mattio, M. F., Dumón, A., Rodríguez, S. M., Truol G. (2012). Incidence of begomoviruses and climatic characterisation of *Bemisia tabaci*-geminivirus complex in soybean and bean in Argentina. *AgriScientia*, 29 (1), 31–39. <https://doi.org/10.31047/1668.298x.v29.n1.2797>

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215 (3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Anaya-López, J. L., Garrido-Ramírez, E. R., Chiquito-Almanza, E., Tosquy-Valle, O. H., Ibarra-Pérez, F. J., & López-Salinas, E. (2018). Identificación de líneas recombinantes de frijol negro opaco resistentes a BCMV, BCMNV y BGYMV mediante marcadores moleculares. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9 (3), 601–614. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i3.1219>

Ascencio-Ibañez, J. T., & Settlege, S. B. (2007). DNA abrasion onto plants is an effective method for geminivirus infection and virus-induced gene silencing. *Journal of Virological Methods*, 142 (1–2), 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.01.031>

Badii, M. H., & Garza Almanza, V. (2007). Resistencia en insectos, plantas y microorganismos. *Cultura Científica y Tecnológica*, 4 (18), 9–25. <https://erevistas.uacj.mx/ojs/index.php/culcyt/issue/view/54>

Barreto, S. S., Hallwass, M., Aquino, O. M., & Inoue-Nagata, A. K. (2013). A study of weeds as potential inoculum sources for a tomato-infecting begomovirus in central Brazil. *Phytopathology*, 103 (5), 436–444. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-12-0174-R>

Ben Guerrero, E., De Francesco, A., García, L. M., Balatti, P. A., & Dal Bó, E. (2013). First Report of Tomato rugose yellow leaf curl virus infecting tomato in Argentina. *Plant Disease*, 97 (12), 1662–1662. <https://doi.org/doi.org/10.1094/PDIS-01-13-0003-PDN>

Bernardi, F., & Timchenko, T. (2008). Geminivirus replication : rolling circle mechanism in plants. *Virologie*, 12 (2), 117–135. <https://doi.org/10.1684/vir.2008.0164>

BIO-RAD. Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System, (2000). <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1652249.pdf>

Blair, M. W., & Beaver, J. S. (1993). Inheritance of bean golden mosaic virus resistance from bean genotype A429. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 143–144. <https://doi.org/ISSN:0084-7747>

Blair, M. W., Rodriguez, L. M., Pedraza, F., Morales, F. J., & Beebe, S. (2007). Genetic mapping of the bean golden yellow mosaic geminivirus resistance gene *bgm-1* and linkage with potyvirus resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 114, 261–271. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0428-6>

Blawid, R., Fontenele, R. S., Lacorte, C., & Ribeiro, S. G. (2013). Molecular and biological characterization of corchorus mottle virus, a new begomovirus from Brazil. *Archives of Virology*, 158 (12), 2603–2609. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1764-x>

Brown, J. K., Zerbini, F. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J. C. F.,... Varsani, A. (2015). Revision of begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology*, 160 (6), 1593–1619. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2398-y>

Calderoni, A., & Campi, A. (2021). El poroto, un cultivo clave para el NOA con muchos desafíos por delante. Obtenido de <https://www.todoagro.com.ar/el-poroto-un-cultivo-clave-para-el-noa-con-muchos-desafios-por-delante/>

Calzada, J., & Treboux, J. (2019). Panorama del mercado nacional e internacional de legumbres. Bolsa de Comercio de Rosario. Retrieved from <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/panorama-del-1>

Cantú-Iris, M., Pastor-Palacios, G., Mauricio-Castillo, J. A., Bañuelos-Hernández, B., Avalos-Calleros, J. A., Juárez-Reyes, A.,... Argüello-Astorga, G. R. (2019). Analysis of a new begomovirus unveils a composite element conserved in the CP gene promoters of several Geminiviridae genera: Clues to comprehend the complex regulation of late genes. *PLoS ONE*, 14 (1), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210485>

Cardona, C., Rendón, F., García, J., López-Avila, A., Bueno, J. M., & Ramírez, J. D. (2001). Resistencia a insecticidas en *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) en Colombia y Ecuador. *Revista Colombiana de Entomología*, Vol. 27, pp. 33–38. <https://doi.org/10.25100/socolen.v27i1.9662>

Carmona, M., Moschini, R., Cazenave, G., & Sautua, F. (2010). Relación entre la precipitación registrada en estados reproductivos de la soja y la severidad de *Septoria glycines* y *Cercospora kikuchii*. *Tropical Plant Pathology*, 35 (2), 71–078. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762010000200001>

Casalderrey, N. B. (2018). Enfermedades del poroto (*Phaseolus vulgaris*) causadas por hongos y bacterias en el Noroeste argentino. Obtenido de https://inta.gob.ar/sites/default/files/casalderrey_simp._leg._2018_definitivo.pdf

Castro-Guerrero, N. A., Isidra-Arellano, M. C., Mendoza-Cozatlán, D. G., & Valdés-López, O. (2016). Common Bean: A legume model on the rise for unraveling responses and adaptations to iron, zinc, and phosphate deficiency. *Frontiers in Plant Science*, 7 (600). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00600>

Conci, L. R., Guzmán, F. A., & Saavedra Pons, A. (2008). Caracterización, diagnóstico, epidemiología y manejo de enfermedades virales y mollicutes en plantas. 3er

Curso Internacional: Hibridación molecular (pp. 1–22). pp. 1–22. Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE-INTA)-JICA, Córdoba, Argentina.

Crespo-Bellido, A., Hoyer, J. S., Dubey, D., Jeannot, R. B., & Duffy, S. (2021). Interspecies recombination has driven the macroevolution of cassava mosaic begomoviruses. *Journal of Virology*, 95 (17), 1–20. <https://doi.org/10.1128/jvi.00541-21>

Cuéllar, M. E., & Morales, F. J. (2006). La mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) como plaga y vectora de virus en fríjol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Colombiana de Entomología*, 32 (1), 1–9. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882006000100001

Czernecki, B., Głogowski, A., & Nowosad, J. (2020). Climate: An R package to access free in-situ meteorological and hydrological datasets for environmental assessment. *Sustainability*, 12 (1), 394. <https://doi.org/10.3390/su12010394>

De Freitas-Vanzo, A. T., Da Silva, C. de C., De Novaes, T. G., Mazzieri Walz, D., Marcelino Guimarães, F. C., Kuwahara, M. K., ... Leite Junior, R. P. (2020). Evaluation of disease severity caused by bean golden mosaic virus in different bean cultivars. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 43 (1), 172–178. <https://doi.org/10.1080/07060661.2020.1771618>

De Simone, M., & Failde de Calvo, V. (2002). El cultivo de poroto en la República Argentina. Ediciones INTA. ISBN 987-521-067-6

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2018). InfoStat versión 2018. Obtenido de <http://www.infostat.com.ar>

Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). A rapid isolation procedure for small amounts of leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15. <https://doi.org/10.2307/4119796>

Dumon, Analia Delina; Mattio, Maria Fernanda; Torrico Ramallo, Ada Karina; Ruiz Posse, Agustina María; Donadio, Horacio Raul; Genero, Marcela Iris; Franz, Nestor Osvaldo; Denegri, David; Albarracin, Jorge Omar; Corro Molas, Andres Ezequiel; Guillot Giraud, R. (2021). Validación de un modelo predictivo de la población de

Delphacodes kuscheli, vector del virus del mal de Río Cuarto en maíz. 5° Congreso Argentino de Fitopatología. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/11850>

Duncan, R. W., Terán, H., Singh, S. P., & Gilbertson, R. L. (2006). Comparison of marker-assisted and direct selection for introgression of common bacterial blight resistance in common bean. *Bean Improv. Coop*, 49, 11–12.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32 (5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

Edwards, K., Johnstone, C., & Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, p. 1349. <https://doi.org/10.1093/nar/19.6.1349>

Espeche, C. M., Tarulli, L. E., & Devani, M. R. (2021). Cultivo de poroto. Consideraciones al momento de su siembra. *Avance Agroindustrial*. Obtenido de <https://avance.dev5.thalu.net/?articulo=cultivo-de-poroto>

FAO. (2022). FAOSTAT. Obtenido el 19 de mayo del 2022, de <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>

Fekete, A. C. (2010). Evaluación biológica de resistencia a geminivirus en líneas del programa de mejoramiento de poroto de INTA EEA Salta (Universidad Nacional de Rosario). Obtenido de https://fcagr.unr.edu.ar/?page_id=142

Fereres, A. (2015). Insect vectors as drivers of plant virus emergence. *Current Opinion in Virology*, 10, 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.12.008>

Fernandes, F. R., Albuquerque, L. C., de Oliveira, C. L., Cruz, A. R. R., da Rocha, W. B., Pereira, T. G.,... Inoue-Nagata, A. K. (2011). Molecular and biological characterization of a new Brazilian begomovirus, euphorbia yellow mosaic virus (EuYMV), infecting *Euphorbia heterophylla* plants. *Archives of Virology*, 156 (11), 2063–2069. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1070-4>

Ferro, C. G., Silva, J. P., Xavier, C. A. D., Godinho, M. T., Lima, A. T. M., Mar, T. B.,... Zerbini, F. M. (2017). The ever increasing diversity of begomoviruses infecting

non-cultivated hosts: new species from *Sida spp.* and *Leonurus sibiricus*, plus two New World alphasatellites. *Annals of Applied Biology*, 170 (2), 204–218. <https://doi.org/10.1111/aab.12329>

Fiallo-Olivé, E., Lett, J. M., Martin, D. P., Roumagnac, P., Varsani, A., Zerbini, F. M., & Navas-Castillo, J. (2021). ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae 2021. *Journal of General Virology*, 102 (12). <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001696>

Fiallo-Olivé, E., Li-Long P., Shu-Sheng L., & Navas-Castillo, J. (2020). Transmission of begomoviruses and other whitefly-borne viruses: Dependence on the vector species. *Phytopathology*, 10–17. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-19-0273-FI>

Fiallo-Olivé, E., Zerbini, F. M., & Navas-Castillo, J. (2015). Complete nucleotide sequences of two new begomoviruses infecting the wild malvaceous plant *Melochia sp.* in Brazil. *Archives of Virology*, 160, 3161-3164. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2619-4>

Fondong, V. N. (2013). Geminivirus protein structure and function. *Molecular Plant Pathology*, 14 (6), 635–649. <https://doi.org/10.1111/mpp.12032>

Fonseca, M. E. N., Boiteux, L. S., & Costa, A. F. A. (2016). Tomato rugose yellow leaf curl virus (Geminiviridae) in tomatoes associated with biological invasion of *Bemisia tabaci* Mediterranean (biotype Q) into subtropical Brazil. Obtenido de NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1039726090>

Fuentes Castillo, C. (2007). Los postulados de Koch: revisión histórica y perspectiva actual. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1 (2), 262–266. <https://doi.org/10.5209/RCCV.23797>

Garrido-Ramirez, E. R., Sudarshana, M. R., & Gilbertson, R. L. (2000). Bean golden yellow mosaic virus from Chiapas, Mexico: Characterization, pseudorecombination with other bean-infecting geminiviruses and germ plasm screening. *Phytopathology*, 90 (11), 1224–1232. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.11.1224>

Garritano, S., Gemignani, F., Voegelé, C., Nguyen-Dumont, T., Le Calvez-Kelm, F., Da Silva, D.,... Tavtigian, S. V. (2009). Determining the effectiveness of High

Resolution Melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 locus. *BMC Genetics*, 10, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-10-5>

Gentile, E., Martin, P., & Gatti, I. (2020). Argentina físico-natural: Clima en Argentina. ANIDA. Atlas Nacional Interactivo de Argentina. Instituto Geográfico Nacional.

Germer, H., Higuchi, R. (1999). Single-tube genotyping without oligonucleotide probes. *Genome Res*, 9 (1), 72-78. PMID: 9927486; PMCID: PMC310703.

Ghosh, A., Rao, G. P., & Baranwal, V. K. (2019). Manual on transmission of plant viruses and phytoplasmas by insect vectors. ISBN: 978-93-83168-50-7

Guenoune-Gelbart, D., Sufrin-Ringwald, T., Capobianco, H., Gaba, V., Polston, J. E., & Lapidot, M. (2010). Inoculation of plants with begomoviruses by particle bombardment without cloning: Using rolling circle amplification of total DNA from infected plants and whiteflies. *Journal of Virological Methods*, 168 (1–2), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.04.022>

Haible, D., Kober, S., & Jeske, H. (2006). Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods*, 135 (1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.01.017>

Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S. B., Orozco, B. M., Nagar, S., & Robertson, D. (1999). Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18 (1), 71–106. <https://doi.org/10.1080/07352689991309162>

Hansatech Instruments Ltd. (n.d.). Hansatech Instruments. Obtenido de <http://www.hansatech-instruments.com/product/pocket-pea/>

Heinemann, A. B., Ramirez-Villegas, J., Souza, T. L. P. O., Didonet, A. D., di Stefano, J. G., Boote, K. J., & Jarvis, A. (2016). Drought impact on rainfed common bean production areas in Brazil. *Agricultural and Forest Meteorology*, 225, 57–74. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2016.05.010>

Helser, L. S., & Tharp, C. I. (2005). Antibiosis and antixenosis to *Rhopalosiphum padi* among triticales accessions. *Euphytica*, 143, 153–160. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-3060-7>

Idris, A. M., Shahid, M. S., Briddon, R. W., Khan, A. J., Zhu, J. K., & Brown, J. K. (2011). An unusual alphasatellite associated with monopartite begomoviruses attenuates symptoms and reduces betasatellite accumulation. *Journal of General Virology*, 92 (3), 706–717. <https://doi.org/10.1099/vir.0.025288-0>

Inoue-Nagata, A. K., Albuquerque, L. C., Rocha, W. B., & Nagata, T. (2004). A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods*, 116 (2), 209–211. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.11.015>

Inoue-Nagata, A. K., Lima, M. F., & Gilbertson, R. L. (2016). Uma revisão de geminivíroses em hortaliças e outras culturas: Situação atual e estratégias de manejo. *Horticultura Brasileira*, 34 (1), 8–18. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620160000100002>

INTA. (n.d.). Variedades de poroto - INTA. Obtenido de <https://inta.gob.ar/busqueda/tipo-de-contenido/variedades/p/buscar/poroto>

Islam, W., Akutse, K. S., Qasim, M., Khan, K. A., Ghramh, H. A., Idrees, A., & Latif, S. (2018). Bemisia tabaci-mediated facilitation in diversity of begomoviruses: Evidence from recent molecular studies. *Microbial Pathogenesis*, 123, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.008>

Jones, R. A. C. (2009). Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Research*, 141 (2), 113–130. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.07.028>

Jullien, N. (2013). AmplifiX 1.7.0. Obtenido de <https://inp.univ-amu.fr/en/amplifx-manage-test-and-design-your-primers-for-pcr>

Kittelmann, K., Rau, P., Gronenborn, B., & Jeske, H. (2009). Plant geminivirus Rep protein induces rereplication in fission yeast. *Journal of Virology*, 83 (13), 6769–6778. <https://doi.org/10.1128/jvi.02491-08>

Krause-Sakate, R., Watanabe Maranhão, L. F., Silva Gorayeb, E., Barreto da Silva, F., de Lima Alvarez, D., Bello, V. H.,... Agenor Pavan, M. (2020). Population dynamics of whiteflies and associated viruses in South America: Research progress and perspectives. *Insects*, 11 (847), 1–36. <https://doi.org/10.3390/insects11120847>

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35 (6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Kursa, M. B., & Rudnicki, W. R. (2010). Feature selection with the Boruta package. *Journal of Statistical Software*, 36 (11), 1-13. <https://doi.org/10.18637/jss.v036.i11>

Lazarowitz, S. G., & Shepherd, R. J. (1992). Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 11 (4), 327–349. <https://doi.org/10.1080/07352689209382350>

Lefeuvre, P., & Moriones, E. (2015). Recombination as a motor of host switches and virus emergence: Geminiviruses as case studies. *Current Opinion in Virology*, 10, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.12.005>

Leke, W. N., Sattar, M. N., Ngane, E. B., Ngeve, J. M., Kvarnheden, A., & Brown, J. K. (2013). Molecular characterization of begomoviruses and DNA satellites associated with okra leaf curl disease in Cameroon. *Virus Research*, 174 (1–2), 116–125. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2013.03.010>

Lobaton, J. D., Miller, T., Gil, J., Ariza, D., De la Hoz, J. F., Soler, A.,... Raatz, B. (2018). Resequencing of common bean identifies regions of inter-gene pool introgression and provides comprehensive resources for molecular breeding. *Plant Genome*, 11 (2), 1-21. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2017.08.0068>

López-López, K., Jara-Tejada, F., & Vaca-Vaca, J. C. (2019). Caracterización molecular de un nuevo begomovirus aislado de cinco especies de arvenses colectadas en

cultivos de tomate en Valle del Cauca. *Acta Biológica Colombiana*, 24 (3), 528–537.
<https://doi.org/10.15446/abc.v24n3.79366>

López-López, K., Rodríguez-Mora, D. M., & Vaca-Vaca, J. C. (2013). Optimización de las condiciones de inoculación por biobalística de un begomovirus en tomate y tabaco. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. 15, p. 8.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.41261>

Lozano, G., Trenado, H. P., Fiallo-Olivé, E., Chirinos, D., Geraud-Pouey, F., Briddon, R. W., & Navas-Castillo, J. (2016). Characterization of non-coding DNA satellites associated with sweepoviruses (Genus Begomovirus, Geminiviridae) – Definition of a distinct class of begomovirus-associated satellites. *Frontiers in Microbiology*, 7 (162). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00162>

Maggio, M. E. (2021). Jornadas Técnicas Nacionales: Poroto - YouTube. Obtenido el 19 de mayo del 2022, de <https://www.youtube.com/watch?v=dB8vWL6wBfU&t=3131s>

MAGyP. (2021). Producción de LEGUMBRES en Argentina. Obtenido de https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/magyp_informe_legumbres_julio_2021.pdf

Mamaní Gonzáles, S. Y., Vizgarra, O. N., Espeche, C. M., Méndez, D. E., & Ploper, L. D. (2017). Mancha angular del poroto: avances en su investigación en la EEAOC. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 94 (1), 49–53. Obtenido de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-30182017000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Márquez-Martín, B., Maeso, D., Martínez-Ayala, A., Bernal, R., Federici, M. T., Vincelli, P.,... Moriones, E. (2012). Diverse population of a new bipartite begomovirus infecting tomato crops in Uruguay. *Archives of Virology*, 157 (6), 1137–1142.
<https://doi.org/10.1007/s00705-012-1262-6>

Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., & Muhire, B. (2015). RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*, 1 (1), 1–5. <https://doi.org/10.1093/ve/vev003>

Martínez-Ayala, A., Sánchez-Campos, S., Cáceres, F., Aragón-Caballero, L., Navas-Castillo, J., & Moriones, E. (2014). Characterisation and genetic diversity of pepper leafroll virus, a new bipartite begomovirus infecting pepper, bean and tomato in Peru. *Annals of Applied Biology*, 164 (1), 62–72. <https://doi.org/10.1111/aab.12074>

Maule, A. J., Hull, R., & Donson, J. (1983). The application of spot hybridization to the detection of DNA and RNA viruses in plant tissues. *Journal of Virological Methods*, 6, 215–224. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(83\)90048-4](https://doi.org/10.1016/0166-0934(83)90048-4)

Meziadi, C., Blanchet, S., Geffroy, V., & Pflieger, S. (2017). Genetic resistance against viruses in *Phaseolus vulgaris* L.: State of the art and future prospects. *Plant Science*, 265, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.08.009>

MHyFP. (2016). Informes de cadena de valor. ISSN 2525-0221. Obtenido de <http://cdi.mecon.gov.ar/bases/doc/mecon/icp/20.pdf>

Miklas, P. N., Delorme, R., Stone, V., Daly, M. J., Stavely, J. R., Steadman, J. R., ... Beaver, J. S. (2000). Bacterial, fungal, and viral disease resistance loci mapped in a recombinant inbred common bean population ('Dorado'/XAN 176). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125 (4), 476–481. <https://doi.org/10.21273/jashs.125.4.476>

Miklas, P. N., Elizabeth, J., Stone, V., Beaver, J. S., Montoya, C., & Zapata, M. (1996). Selective mapping of QTL conditioning disease resistance in common bean. *Crop Science*, 36, 1344–1351. <https://doi.org/https://doi.org/10.2135/cropsci1996.0011183X003600050044x>

Morales, F. J. (1990). Isolation and partial characterization of a geminivirus causing bean dwarf mosaic. *Phytopathology*, 80 (1), 96. <https://doi.org/10.1094/phyto-80-96>

Morales, F. J. (2000). El Mosaico Dorado y otras enfermedades del fríjol común causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca en la América Latina. <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/79668>

Morales, F. J. (2006). History and current distribution of begomoviruses in Latin America. *Advances in Virus Research*, 67 (06), 127–162. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)67004-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)67004-8)

Morales, F. J., & Anderson, P. K. (2001). The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, 146, 415–441. <https://doi.org/10.1007/s007050170153>

Morales, F. J., & Jones, P. G. (2004). The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research*, 100 (1), 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.014>

Morales, F. J., & Niessen, A. I. (1988). Comparative responses of selected *Phaseolus vulgaris* germ plasm inoculated artificially and naturally with bean golden mosaic virus. *The American Phytopathological Society*, 72, 1020–1023. <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/43282>

Morales, F. J., Cardona, C., Bueno, J. M., & Rodriguez, I. (2006). Manejo integrado de enfermedades de plantas causadas por virus transmitidos por moscas blancas. <https://doi.org/ISBN:9586940853>

Morales, Francisco J., & Singh, S. P. (1993). Breeding for resistance to bean golden mosaic virus in an interracial population of *Phaseolus vulgaris* L. *Euphytica*, 67 (1–2), 59–63. <https://doi.org/10.1007/BF00022725>

Moschini, R. C., & Fortugno, C. (1996). Predicting wheat head blight incidence using models based on meteorological factors in Pergamino, Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 102 (3), 211–218. <https://doi.org/10.1007/BF01877959>

Muhire, B. M., Varsani, A., & Martin, D. P. (2014). SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS ONE*, 9 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277>

Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., & Sánchez-Campos, S. (2011). Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. In *Annual Review of Phytopathology*, 49, 219–248. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095235>

Nawaz-ul-Rehman, M. S., & Fauquet, C. M. (2009). Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Letters*, 583 (12), 1825–1832. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.045>

Ojeda, F. S., Amela García, M. T., & Hoc, P. S. (2013). Variability in the indument of *Phaseolus vulgaris* var. aborigineus (Fabaceae). *Rev. FCA UNCUYO*, 45 (1), 303–309. ISSN 1853-8665

Ojiewo, C., Monyo, E., Desmae, H., Boukar, O., Mukankusi-Mugisha, C., Thudi, M.,... Varshney, R. K. (2019). Genomics, genetics and breeding of tropical legumes for better livelihoods of smallholder farmers. *Plant Breeding*, 138 (4), 487–499. <https://doi.org/10.1111/pbr.12554>

Ornaghi, J. A., March, G. J., Moschini, R. C., Martínez, M. I., & Boito, G. T. (2011). Predicting population level of *Delphacodes kuscheli*, vector of Mal de Río Cuarto virus, and climate risk in the Argentine Pampas using meteorological models. *Tropical Plant Pathology*, 36 (3), 160–168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1982-56762011000300004>

Orozco, B. M., Miller, A. B., Settlage, S. B., & Hanley-Bowdoin, L. (1997). Functional domains of a geminivirus replication protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (15), 9840–9846. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.15.9840>

Osorno, Juan M, Muñoz, C. G., Beaver, J. S., Ferwerda, F. H., Bassett, M. J., Miklas, P. N.,... Bussey, B. (2007). Two Genes from *Phaseolus coccineus* confer resistance to bean golden yellow mosaic virus in common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132 (4), 530–533. <https://doi.org/10.21273/JASHS.132.4.530>

Osorno, Juan Manuel, Acevedo Román, M., Muñoz Perea, C. G., Ferwerda, F. H., & Beaver, J. S. (2004). Recent advances in the development of bean golden yellow mosaic resistant bean lines. <https://naldc.nal.usda.gov/catalog/IND43757761>

Picó, B., Díez, M. J., & Nuez, F. (1996). Viral diseases causing the greatest economics losses to the tomato crop II. The Tomato yellow leaf curly virus - a review. *Scientia Horticulture*, 67, 151–196. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00945-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00945-4)

Pieruschka, R., & Lawson, T. (2015). Preface. *Journal of Experimental Botany*, 66 (18), 5385–5387. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv395>

Polston, J. E., & Capobianco, H. (2013). Transmitting plant viruses using whiteflies. *Journal of Visualized Experiments*, (81), 1–10. <https://doi.org/10.3791/4332>

Pozzi, E. A., Bruno, C., Luciani, C. E., Celli, M. G., Conci, V. C., & Perotto, M. C. (2020). Relative incidence of cucurbit viruses and relationship with bio-meteorological variables. *Australasian Plant Pathology*, 49 (2), 167–174. <https://doi.org/10.1007/S13313-020-00687-8>

Preiss, W., & Jeske, H. (2003). Multitasking in replication is common among Geminiviruses. *Journal of Virology*, 77 (5), 2972–2980. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.5.2972-2980.2003>

R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online at <https://www.R-project.org/>

Raza, M. M., Harding, C., Liebman, M., & Leandro, L. F. (2020). Exploring the potential of High-Resolution satellite imagery for the detection of Soybean sudden death syndrome. *Remote Sensing*, 12 (7), 1213. <https://doi.org/10.3390/RS12071213>

Reginatto, J. (2018). Análisis económico-financiero del poroto (*Phaseolus vulgaris*) como alternativa en la rotación de cultivos para la zona norte de la provincia de Córdoba (Universidad Católica de Córdoba). Obtenido de <http://pa.bibdigital.ucc.edu.ar/1569/>. Tesis de Maestría.

Reyna, P. G., Bejerman, N., Laguna, I. G., & Pardina, P. R. (2021). Biological and molecular characterization of bean bushy stunt virus, a novel bipartite begomovirus infecting common bean in northwestern Argentina. *Archives of Virology*, 166 (5), 1409–1414. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05002-4>

Ribeiro, S. G., Martin, D. P., Lacorte, C., Simões, I. C., Orlandini, D. R. S., & Inoue-Nagata, A. K. (2007). Molecular and biological characterization of tomato chlorotic mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity

of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology*, 97 (6), 702–711. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-6-0702>

Rodríguez Pardina, P. (2020). Viral diseases in common bean crops in Argentina. *Current Topics in Virology*, 17, 95–110. Obtenido de <https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/handle/20.500.12123/9462>

Rodríguez Pardina, P. E., Arneodo, J. D., Truol, G. A., Herrera, P. S., & Laguna, I. G. (2004). First record of Cowpea mild mottle virus in bean crops in Argentina. *Australasian Plant Pathology*, 33 (1), 129–130. <https://doi.org/10.1071/AP03076>

Rodríguez Pardina, P. E., Hanada, K., Laguna, I. G., Zerbini, F. M., & Ducasse, D. A. (2011). Molecular characterisation and relative incidence of bean- and soybean-infecting begomoviruses in northwestern Argentina. *Annals of Applied Biology*. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1744-7348.2010.00441.x>

Rodríguez Pardina, P., Campos, R. E., Varela, G., Peña Malavera, A., & Gerónimo, L. M. (2018). Evaluation of the behavior of common bean cultivars and promising lines under natural virus infection-Evaluación del comportamiento de cultivares y líneas experimentales de poroto común frente a infecciones naturales de virus. *Horticultura Argentina*, 37 (94), 13–23. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/4429>

Rodríguez-Pardina, Patricia E., Zerbini, F. M., & Ducasse, D. A. (2006). Genetic diversity of begomoviruses infecting soybean, bean and associated weeds in Northwestern Argentina. *Fitopatologia Brasileira*, 31 (4), 342–348. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582006000400003>

Rojas, M. R., Hagen, C., Lucas, W. J., & Gilbertson, R. L. (2005). Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, 43 (1), 361–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135939>

Rojas, M. R., Macedo, M. A., Maliano, M. R., Soto-Aguilar, M., Souza, J. O., Bridson, R. W.,... Gilbertson, R. L. (2018). World management of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, 56, 637–677. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100327>

Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18 (1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>

Ruíz-Salazar, R., Muruaga-Martínez, J. S., Vargas-Vázquez, M. L. P., Alejandre-Iturbide, G., Castañón-Nájera, G., Hernández-Delgado, S.,... Mayek-Pérez, N. (2017). Marcadores moleculares SCAR para identificar fuentes de resistencia a enfermedades en frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*). *Phyton (Buenos Aires)*, 85 (2), 184–193. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572016000200003&lng=es&tlng=e

Saeed, S. T., & Samad, A. (2017). Emerging threats of begomoviruses to the cultivation of medicinal and aromatic crops and their management strategies. *Virus Disease*, 28 (1). <https://doi.org/10.1007/s13337-016-0358-0>

Sambrook, J. F., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning - Sambrook & Russel - Vol. 1, 2, 3*. Ediciones Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-577-3

Sanford, J. C. (1988). The biolistic process. *Trends in Biotechnology*, 6 (12), 299–302. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(88\)90023-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(88)90023-6)

Sautua, F., & Carmona, M. (2022). Sistema de inmunidad basal: barreras constitutivas o preexistentes. Retrieved from <https://herbariofitopatologia.agro.uba.ar>

Silva, F. N., Lima, A. T., Rocha, C. S., Castillo-Urquiza, G. P., Alves-Júnior, M., & Zerbini, F. M. (2014). Recombination and pseudorecombination driving the evolution of the begomoviruses Tomato severe rugose virus (ToSRV) and Tomato rugose mosaic virus (ToRMV): Two recombinant DNA-A components sharing the same DNA-B. *Virology Journal*, 11 (66), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-66>

Silva, J. C. F., Carvalho, T. F. M., Basso, M. F., Deguchi, M., Pereira, W. A., Sobrinho, R. R.,... Fontes, E. P. B. (2017). Geminivirus data warehouse: A database enriched with machine learning approaches. *BMC Bioinformatics*, 18 (240). <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1646-4>

Singh, S. P., & Schwartz, H. F. (2010). Breeding common bean for resistance to diseases: A review. *Crop Science*, 50 (6), 2199–2223. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.03.0163>

Singh, S. P., Morales, F. J., Miklas, P. N., & Terán, H. (2000). Selection for bean golden mosaic resistance in intra- and interracial bean populations. *Crop Science*, 40, 1565–1572. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4061565x>

Soler, A., Lobaton, J. D., Macea, E., Grajales, M., Raatz, B., & Beebe, S. (2017). Single nucleotide polymorphism (SNP) marker discovery and genetic mapping associated with resistance to Bean golden yellow mosaic virus. *Annual Report of Bean Improvement Cooperative*, 60, 49–50.

Soler, A., Oladzad, A., Beaver, J., Beebe, S., Lee, R., Lobaton, J. D.,... Miklas, P. N. (2021). NAC candidate gene marker for *bgm-1* and interaction with QTL for resistance to Bean golden yellow mosaic virus in common bean. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.628443>

Sunter, G., & Bisaro, D. M. (1992). Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *The Plant Cell*, 4 (10), 1321–1331. <https://doi.org/10.1105/tpc.4.10.1321>

Sunter, G., Hartitz, M. D., & Bisaro, D. M. (1993). Tomato golden mosaic virus leftward gene expression: Autoregulation of geminivirus replication protein. *Virology*, 195, 275–280. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1374>

Sverdlov, E., & Azhikina, T. (2005). Primer Walking. In *Encyclopedia of Life Sciences*. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0005382>

Tavares, S. S., Ramos-Sobrinho, R., González-Aguilera, J., Lima, G. S. A., Assunção, I. P., & Zerbini, F. M. (2012). Caracterização molecular adicional de begomovírus associados a plantas daninhas no Brasil, com Ênfase em *Sida spp.* *Planta Daninha*, 30 (2), 305–315. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582012000200009>

Taylor, S., Scott, R., Kurtz, R., Fisher, C., & Patel, V. (2009). A practical guide to High Resolution Melt analysis genotyping. *Bio-Rad Laboratories Technical Note*.

Obtenido de <http://www.americanbiotechnologist.com/blog/wp-content/uploads/2010/10/HRM-tech-note.pdf>

Tejerina, W. (2021). Taller de Poroto: ¿Se puede mejorar su rendimiento? - YouTube. Obtenido el 19 de mayo del 2022 de <https://www.youtube.com/watch?v=7JebmqP5CJ0>

Urrea, C. A., Miklas, P. N., Beaver, J. S., & Riley, R. H. (1996). A codominant randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker useful for indirect selection of bean golden mosaic virus resistance in common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121 (6), 1035–1039. <https://doi.org/10.21273/jashs.121.6.1035>

Vaghi Medina, C. G., Martin, D. P., & López Lambertini, P. M. (2014). Tomato mottle wrinkle virus, a recombinant begomovirus infecting tomato in Argentina. *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2216-y>

Valdés, A. R., Bacallao, M. F., Hurtado, F. D., Julio, L., Calvo, M., Hanson, P., & Gil, Á. (2017). Caracterización morfoagronómica en líneas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con resistencia a begomovirus-Morphoagronomic characterization of tomato lines (*Solanum lycopersicum* L.) resistant to begomovirus. 38 (2), 70–79.

Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J. S., & Fauquet, C. M. (2004). Differential roles of AC2 and AC4 of Cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*, 78 (17), 9487–9498. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.17.9487-9498.2004>

Varela, G., Ávalos, V., Reyna, P., Laguna, I. G., & Rodríguez Pardina, P. (2018). Identification, molecular characterization and relative incidence of begomoviruses infecting bean crops in northwestern Argentina: an update. *Australasian Plant Pathology*, 47, 343–350. <https://doi.org/10.1007/s13313-018-0563-y>

Varsani, A., Roumagnac, P., Fuchs, M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Idris, A.,... Martin, D. P. (2017). Capulavirus and Grablovirus: two new genera in the family Geminiviridae. *Archives of Virology*, 162 (6), 1819–1831. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3268-6>

Velez Jose, J., Bassett Mark, J., Beaver James, S., & Molina, A. (1998). Inheritance of resistance to bean golden mosaic virus in common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123, 628–631. <https://doi.org/10.21273/JASHS.123.4.628>

Vizgarra, O. N., Espeche, C., & Mamani, S. (2012). Cultivos de verano para el norte argentino-Poroto (*Phaseolus vulgaris* L.): Manejo del cultivo y recomendaciones.

Vizgarra, O. N., Espeche, C., Mamaní Gonzáles, S., Velazquez, D., & Ploper, L. D. (2012). Consideraciones generales de la campana de poroto 2012 y resultados de los ensayos evaluados en el Noroeste Argentino. *Avance Agroindustrial*, 33 (3), 29–34.

Vizgarra, O. N., Ploper, L. D., Ghio, A. C., & Pérez, A. (2001). El poroto en la campaña 2001. *Revista Avance Agroindustrial*, 22 (4), 17–21.

Vizgarra, O. N., Ploper, L. D., Ghio, A. C., & Pérez, A. (2006). TUC 510: nueva variedad de poroto negro (*Phaseolus vulgaris* L.) con alta tolerancia a las virosis presentes en el noroeste argentino. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 83 (1–2), 39–47.

Walker, P. J., Siddell S. G., Lefkowitz E. J., Mushegian A. R., Adriaenssens E. M.,....., F. M. Changes to virus taxonomy and to the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2021). *Archives of Virology*. 166 (9), 2633-2648. <https://doi:10.1007/s00705-021-05156-1>

Wang, J., Chuang, K., Ahluwalia, M., Patel, S., Umblas, M., Mirel, D.,... Germer, S. (2005). High-throughput SNP genotyping by single-tube PCR with Tm-shift primers. *BioTechniques*, 39 (6), 885–892. <https://doi.org/10.2144/000112028>

Worrall, E. A., Wamonje, F. O., Mukeshimana, G., Harvey, J. J. W., Carr, J. P., & Mitter, N. (2015). Bean common mosaic virus and Bean common mosaic necrosis virus: Relationships, biology, and prospects for control. In *Advances in Virus Research*, 93 (1). <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2015.04.002>

Zambrano, K., Fernández-Rodríguez, T., & Marys, E. (2012). Molecular characterization of a new begomovirus that infects *Euphorbia heterophylla* and *Solanum*

lycopersicum in Venezuela. Archives of Virology, 157 (2), 379–382. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1157-y>

Zavala, J. A. (2010). Respuestas inmunológicas de las plantas frente al ataque de los insectos. Ciencia Hoy, 20 (117), 52–59. Obtenido de https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/60850/CONICET_Digital_Nro.e3c16c71-5422-4bdf-a382-b469ba1f6cb2_A.pdf?sequence=2

Zerbini, F. M., Briddon, R. W., Idris, A., Martin, D. P., Moriones, E., Navas-Castillo, J.,... Varsani, A. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Geminiviridae. Journal of General Virology, 98 (2), 131–133. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000738>

Zhou, X. (2013). Advances in understanding begomovirus satellites. Annual Review of Phytopathology, 51 (1), 357–381. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102234>

Živčák, M., Brestič, M., Olšovská, K., & Slámka, P. (2008). Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. Plant, Soil and Environment, 54 (4), 133–139. <https://doi.org/10.17221/392-pse>