

EFFECTO DE LA INFECCIÓN CON *Cassava common mosaic virus* SOBRE LOS COMPONENTES DEL RENDIMIENTO DE PLANTAS DE *Manihot esculenta* REGENERADAS *in vitro* A PARTIR DE MERISTEMAS CAULINARES.

Zanini, Andrea¹; Collavino, Agostina² (*ex aequo*); Medina, Ricardo³; Mroginski, Luis³; Di Feo, Liliana⁴.

¹Bióloga, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) e Instituto de Patología Vegetal (IPAVE), Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). ²Ingeniera Agrónoma, CONICET e Instituto Universitario de Formosa - Facultad de la Producción y el Medioambiente (UNF). ³(Dr.) Ingeniero Agrónomo, Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET), Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE). Sargento Cabral 2131 (3400), Corrientes, Argentina. E-mail: ricardomedina@agr.unne.edu.ar. ⁴(Dra.) Ingeniera Agrónoma, CONICET e IPAVE-CIAP-INTA. Av. 11 de septiembre 4755, Córdoba, Argentina. E-mail: difeo.liliana@inta.gob.ar

Introducción

La mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) es uno de los principales cultivos para el consumo humano y animal, de gran importancia económica-social para muchos países (Carvalho *et al.*, 2017).

Al ser una especie que se multiplica comercialmente de forma vegetativa, una de sus principales limitantes es la diseminación de patógenos sistémicos, principalmente virus, a través del material de propagación. Hasta el momento se han reportado 16 virus en el cultivo de mandioca, siendo el *Cassava common mosaic virus* (CsCMV) uno de los más distribuidos en América Latina, y el agente causal de la enfermedad conocida como Mosaico común de la mandioca (CsCMD).

El primer reporte de CsCMD se realizó en el sur de Brasil (Silberschmid, 1938; Costa, 1940) y en Argentina, recientemente ha tomado relevancia al ser confirmada su presencia en plantaciones de mandioca de las principales provincias productoras (Di Feo *et al.*, 2015). Según Calvert y Cuervo (2002), la enfermedad tiene mayor importancia en el sur del Brasil y en Paraguay, donde se recomienda tomar alguna medida de control para reducir las pérdidas. Ambas regiones limitan con la zona productora de mandioca en Argentina, sin embargo, hasta el momento, no existen datos publicados de las consecuencias de esta enfermedad sobre el rendimiento del cultivo en el país. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la infección con CsCMV sobre los componentes del rendimiento de plantas de mandioca del cultivar CM3306-4 regeneradas “*in vitro*” por cultivo de meristemas apicales caulinares y cultivadas a campo en Laguna Blanca, Formosa, Argentina.

Materiales y Métodos

Material vegetal. Se emplearon plantas de mandioca regeneradas “*in vitro*” a partir de cultivo de meristemas caulinares de plantas enfermas con CsCMV del cultivar CM3306-4 en el Instituto de Botánica del Nordeste (Universidad Nacional del Nordeste – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) y la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina. Para garantizar el saneamiento de las plantas, las mismas fueron indexadas por diversas metodologías en el Instituto de Patología Vegetal, perteneciente al Centro de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (IPAVE-CIAP-INTA, Córdoba,

Argentina), resultando libres de CsCMV. Para ello, se realizaron observaciones al microscopio electrónico de preparados "leaf dips" y decorados de las plantas regeneradas "in vitro", no evidenciándose la presencia de viriones. Se efectuaron análisis de PTA-ELISA y DAS-ELISA, con resultados negativos para CsCMV. Lo mismo sucedió en pruebas de DAS-ELISA en las que se empleó suero anti-*Cassava virus X*. Además, CsCMV, Cassava frogskin associated virus, Cassava torrado like virus, Cassava polero like virus y Cassava new alphaflexivirus, no fueron detectados molecularmente (mediante RT-PCR) (Schaller *et al.*, 2014). A continuación, las plantas saneadas del cv. CM3306-4 fueron multiplicadas "in vitro" e incubadas en un cuarto climatizado a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 14 h e irradiancia de $116 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Medina *et al.*, 2017a). Luego de 45 días de cultivo, se efectuó su aclimatación "ex vitro" (Galeano, 2016). Posteriormente, la mitad de las plantas, fueron inoculadas mecánicamente con CsCMV y el resto conservó su condición de libres de los virus mencionados anteriormente (plantas sanas control), contando de este modo con dos tratamientos.

Inoculación mecánica. Hojas de plantas de mandioca fehacientemente infectadas con CsCMV fueron utilizadas como fuente de inóculo. Las mismas se trituraron y diluyeron en proporción 1/20 (p/v) en tampón fosfato de potasio 0,05M; pH 7,2, conteniendo sulfito de sodio 0,2% y utilizando Carbón activado en polvo y Carborundum como abrasivo. Con esta preparación se frotaron cuidadosamente las hojas de las plantas sanas que debían ser re-infectadas. La infección por CsCMV fue corroborada por DAS-ELISA pasados los 30 días desde la inoculación mecánica.

Ensayo comparativo de rendimiento. Luego de 60 días de la aclimatación, las plantas control y las infectadas con CsCMV fueron trasplantadas a campo. El ensayo se instaló en noviembre de 2016, en una estructura de protección, equipada con malla anti-áfidos, "mulching" plástico y riego por goteo, perteneciente al Campo Experimental del Instituto Universitario de Formosa de la Universidad Nacional de Formosa (Lat $25^{\circ}19'38''$ Sur y Long $58^{\circ}05'53''$ Oeste), Laguna Blanca, Formosa, Argentina, donde el clima es subtropical húmedo, Cfa, según la clasificación Köppen. El marco de plantación fue de 1m x 1,2m, y se realizó una fertilización de base con 4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ por hoyo de plantación. A los seis meses y medio de cultivo a campo, se realizaron los análisis moleculares correspondientes para confirmar la presencia del CsCMV en las plantas inoculadas y su ausencia en las plantas control.

Evaluaciones y análisis de datos. El ensayo se cosechó manualmente en junio del 2017. Las mediciones se realizaron planta por planta. Se midió a) altura de cada planta mediante una cinta métrica desde el nivel del suelo hasta la parte superior de la rama de mayor longitud (altura de planta, cm); b) el número de raíces tuberosas por planta ($\text{N}^{\circ}\text{RT/pl}$) y c) el peso fresco de raíces tuberosas por planta (PFRT/pl , Kg), los dos últimos caracteres se obtuvieron contando o pesando todas las raíces que presentaban un diámetro superior a 1 cm. Para cuantificar d) el peso fresco individual de raíces tuberosas (PFiRT) se pesó cada una de ellas. e) El diámetro de raíces tuberosas (DRT , cm) se registró mediante un calibre digital, considerando el diámetro mayor de cada una de ellas; f) la longitud de raíces tuberosas (Long RT) se midió mediante una regla, sin considerar el pedúnculo.

El ensayo fue realizado siguiendo un diseño completamente aleatorizado. Todos los parámetros fueron evaluados tomando trece individuos por tratamiento (n=13). El análisis estadístico fue realizado mediante comparación de medias aritméticas por T-Test ($P < 0.05$), con el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software inc., San Diego, CA, USA).

Resultados y Discusión

La mandioca se caracteriza por tener una gran variedad de usos, lo que permite el aprovechamiento de la planta entera. Sin embargo, los órganos de mayor importancia desde el punto de vista productivo son las raíces tuberosas por su contribución al rendimiento y el tallo por ser el órgano de propagación. En este sentido, la infección de plantas saneadas “in vitro” con CsCMV afectó la altura de plantas (cm), que fue significativamente menor en las mismas con respecto a las obtenidas en las sanas (Figura 1). Coincidentemente en estudios realizados en Brasil, se observaron diferencias significativas en la altura alcanzada por plantas madres seleccionadas por su sanidad de los cultivares BGM0212 y BRS Kiriris e inoculadas con CsCMV, con disminuciones del 9,2% y 7,0%, respectivamente (Venturini *et al.*, 2016). En el presente trabajo dicha diferencia fue del 12,76%, lo que sugiere que la disminución no sólo sería producto de la infección sino de la interacción cultivar-patógeno (CM3306-4 infectado con CsCMV).

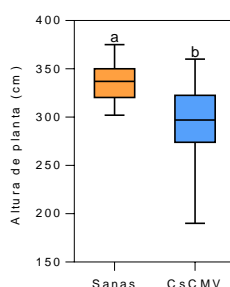


Figura 1. Diagrama de caja de Altura de planta (cm) de individuos de mandioca sanos e infectados con CsCMV. Letras distintas indican diferencias significativas según el T-Test ($P \leq 0,05$).

Según Medina *et al.* (2017b), el rendimiento de raíces frescas puede estudiarse a partir del N° RT/pl, PFRT/pl y PFIRT. En la Figura 2, se puede observar que el N° RT/pl, PFRT/pl y PFIRT fue significativamente menor en los individuos infectados, que manifestaron una reducción de 34,13%, 39,82% y 22,44% respectivamente. Esto permite estimar rendimientos de 24,63 t.ha⁻¹ en plantas enfermas y 40,93 t.ha⁻¹ en plantas sanas. El porcentaje de merma en el rendimiento supera en un 10% a los publicados por Venturini (2016) y entre un 20 y 29 % a los reportados por Fukuda (1993). Además, considerando que durante el ensayo las condiciones nutricionales, hídricas y térmicas no fueron limitantes para el cultivo, podría inferirse que la variedad CM3306-4 presenta una marcada susceptibilidad al patógeno CsCMV, de acuerdo a reportes existentes que señalan que bajo condiciones predisponentes para la enfermedad (períodos prolongados relativamente fríos) las pérdidas en los rendimientos pueden alcanzar un 60% (Costa y Kitajima, 1972; Di Feo *et al.*, 2016).

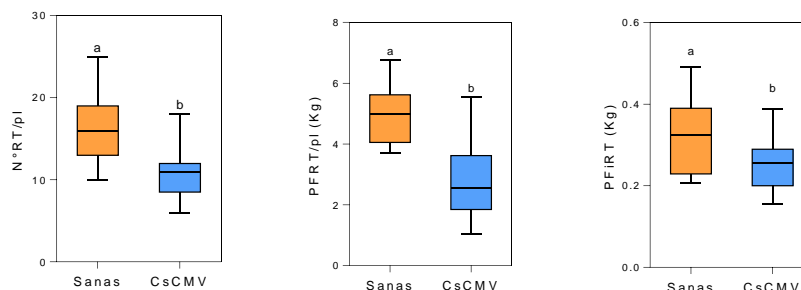


Figura 2. Diagrama de cajas para Número de raíces tuberosas por planta (N°RT/pl), Peso fresco de raíces tuberosas por planta (PFRT/pl) y Peso fresco individual de raíces tuberosas (PFIRT) obtenidos en individuos de mandioca sanos e infectados con CsCMV, cultivados en Laguna Blanca- Formosa, Argentina. Campaña 2016-2017. Letras distintas indican diferencias significativas según el T-Test ($P \leq 0,05$).

El diámetro y la longitud de raíces tuberosas se consideran parámetros de calidad (Burgos *et al.*, 2009), que revisten importancia cuando el destino final de la producción es la comercialización de raíces frescas. En este estudio se han encontrado diferencias significativas en el diámetro de raíces tuberosas, sin embargo, su longitud no fue afectada por la infección con CsCMV (Figura 3).

Las diferencias observadas pueden deberse a la disminución del área y de la tasa y de la eficiencia fotosintética originada por la presencia del mosaico clorótico característico de la infección con CsCMV (Di Feo *et al.*, 2016), lo que en el caso de la mandioca potencialmente podría disminuir la disponibilidad de fotoasimilados para la acumulación de reservas en las raíces.

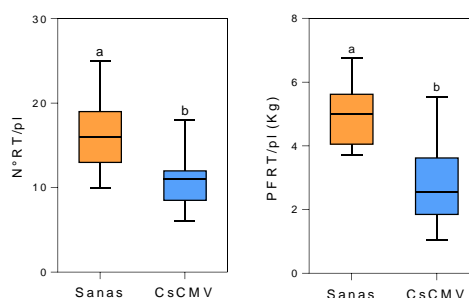


Figura 3. Diagrama de cajas para Diámetro (DRT) y Longitud de raíces tuberosas (Long RT), derivadas de individuos de mandioca sanos e infectados con CsCMV, cultivados en Laguna Blanca- Formosa, Argentina. Campaña 2016-2017. Letras distintas indican diferencias significativas según el T-Test ($P \leq 0,05$).

Conclusiones

La infección con *Cassava common mosaic virus* produjo mermas significativas sobre los componentes del rendimiento de plantas de mandioca saneadas “in vitro” por cultivo de meristemas caulinares. Infecciones con CsCMV también disminuyeron la altura de plantas y el diámetro de raíces tuberosas.

Agradecimientos

A la SGCyT-UNNE (PIA002/11; PI16A010/2016), CONICET (PIP N° 11220150100398CO, Res. 0111/16), el Centro de Investigaciones y Transferencia de Formosa, CONICET y el Proyecto Nacional de Cultivos Industriales del INTA (INTA-PNIND-1108072) por el financiamiento del presente trabajo.

Referencias

- BURGOS, A. M.; CENÓZ, P. J.; PRAUSE, J. Efecto de la aplicación de auxinas sobre el proceso de enraizamiento de estacas de dos cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Científica UDO Agrícola** v. 9, n. 2, p. 539-546, 2009.
- CARVALHO, M.J.S.; OLIVEIRA, E.J.; SOUZA, A.S.; PEREIRA, J.S; DIAMANTINO M.S.A.S.; OLIVEIRA S.A.S. Cleaning cassava genotypes infected with Cassava frogskin disease via *in vitro* shoot tip culture. **Genetics and Molecular Research** v.16, n.2, 2017.
- CALVERT, L., CUERVO, M. Enfermedades Virales de la Yuca en America del Sur. En: Ospina B. y H. Ceballos (Eds.), La yuca en el tercer milenio. **CIAT**, Colombia. p. 262-268, 2002.
- COSTA, A.. Observações sobre o mosaico comum e o mosaico das nervaduras da mandioca (*Manihot utilissima* Pohl). **Journal de Agronomia** v. 3, n. 3, p. 239-251, 1940.
- COSTA, A., KITAJIMA, E. Studies on virus and mycoplasma diseases of the cassava plant in Brazil. In: Cassava Mosaic Workshop, Ibadan, Nigeria. **IITA**, Ibadán, Nigeria. p. 18-36, 1972.
- DI FEO, L., ZANINI, A., RODRÍGUEZ PARDINA, P., CUERVO, M., CARVAJAL YEPES, M.; CUELLAR W.J. First Report of *Cassava common mosaic virus* and *Cassava frogskin-associated virus* infecting cassava in Argentina. **Plant Disease** v. 99, n. 5, p.733, 2015.
- DI FEO, L., MARTINO, J., ZANINI, A., MARTINELLI, D., LUQUE, A., RODRÍGUEZ PARDINA, P., LÓPEZ COLOMBA, E., TOLOCKA, P., SUASNABAR, R. Virosis de batata y mandioca. Su manejo. Nota Fitopatológica. **Asociación Argentina de Fitopatología**. <http://aafitopatologos.com.ar/wp/wp-content/uploads/2016/10/Batata-y-mandioca-AAF-final-6-de-octubre.pdf?05a317>. 12 p, 2016.
- FUKUDA, C. Doenças da mandioca. Em: EMBRAPA-Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura. Instruções práticas para o cultivo de mandioca. Cruz das Almas: **EMBRAPA**, p. 53-56, 1993.
- GALEANO, J. Efecto de la edad de las plantas y de un activador del crecimiento radical sobre la aclimatación de diferentes cvs. de mandioca (*Manihot esculenta*). Tesis de grado, FCA-UNNE. Argentina. 34 p., 2016.
- MEDINA, R., BURGOS, A. (*ex aequo*), MICHELLOD, M., CENÓZ, P. Cultivo de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) en invernadero: efectos sobre el rendimiento y la calidad de raíces tuberosas. **Interciencia**, v. 42, p. 515-521, 2017b.
- MEDINA, R., SCHALLER, S. (*ex aequo*), DOLCE, N., MROGINSKI, L. Determinación de la eficiencia de la micropropagación de genotipos de mandioca (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) de interés para el Nordeste Argentino. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica** v. 52, p. 497-505., 2017a.
- VENTURINI, M., SILVA ARAÚJO, T., MEDEIROS ABREU, E., CHUMBINHO DE ANDRADE, E., SILVA SANTOS, V., DA SILVA, M., DE OLIVEIRA, E. Crop losses in Brazilian cassava varieties induced by the *Cassava common mosaic virus*. **Scientia Agricola** v. 73, p. 520-524, 2016.
- SCHALLER, S., ZANINI, A., RODRIGUEZ PARDINA, P., DI FEO, L., MROGINSKI, L., MEDINA, R. Regeneración de plantas de mandioca por cultivo de meristemas para su empleo en estudios de virología en la Argentina. **III Congreso Argentino de Fitopatología**, Tucumán, Argentina, p. 436, 2014.
- SILBERSCHMID, K.O. O mosaico da mandioca. **Biologico** v. 4, n. 6, p. 177-181, 1938.