

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Cucumber mosaic virus* CAUSAL DEL ACHAPARRAMIENTO DEL MANÍ

de Breuil, S.¹; Giolitti, F.¹; Oddino, C.²; Kearney, M.²; Marinelli, A.² y Lenardon, S.L.^{1,2}
¹Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal-INTA, Cno. 60 Cuadras, Km 5 1/2, 5119 Córdoba.
²Fac. Agronomía y Veterinaria, UNRC, 5800 Río Cuarto, Córdoba.
e-mail: slenard@infovia.com.ar

Durante la campaña agrícola 1999-2000, en lotes de maní (*Arachis hypogaea* L.) de la zona de Alejandro Roca fueron detectadas plantas con síntomas virales que incluían severo acortamiento de entrenudos (achaparramiento), brotación de yemas axilares, reducción en el tamaño de los folíolos y moteado clorótico (Foto 1), disminución del sistema radicular y marcada reducción del tamaño de las vainas y granos, con la consiguiente disminución de la producción. Además, en algunos lotes evaluados se encontraron plantas de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) con síntomas similares a los de maní. Las pruebas iniciales de diagnóstico determinaron que se trataba de un virus esférico de 30 nm posiblemente miembro de los cucumovirus. En las campañas 2000/01 y 2001/02 se observaron plantas con los síntomas descritos anteriormente en cultivos ubicados en las localidades de La Palestina, La Gilda y Jovita.

Los objetivos del presente trabajo fueron completar la identificación del virus, corroborar si las infecciones en las nuevas áreas correspondían al mismo patógeno y analizar la posible transmisión por semilla.

Para completar la identificación del virus se realizaron pruebas de diagnóstico que comprendieron: microscopía electrónica por leaf dips, serología utilizando las técnicas de DAS-ELISA, Dot-blots y Western blots con antisueros policlonales (As) a *Cucumber mosaic virus* (CMV). También, se realizaron pruebas de RT-PCR con cebadores específicos para el gen de la cápside proteica del CMV.

Además para comprobar si el virus se transmitía por semilla, durante la campaña agrícola 2000/01, se identificaron plantas infectadas naturalmente a campo, que se cosecharon manualmente, clasificándose los granos obtenidos por calibre de zaranda de tajo. De los 2806 granos obtenidos, el 1,07%; 4,2%; 6%; 6,6%; 17,25%; 11,15% y 53,74% correspondían a los calibres >9, 8, 7.5, 7, 6.5, 6 y < 6 (Foto 2) respectivamente.

En las preparaciones leaf-dips de todas las muestras revisadas al microscopio electrónico se observó la presencia de abundantes partículas virales esféricas de 30 nm de diámetro (Foto 3). Las pruebas de DAS-ELISA y dot blots (Foto 4) para todas las muestras de maní de las distintas procedencias resultaron positivas con el As del CMV. Las membranas de Western blots probadas con As a CMV revelaron una banda de alrededor de 24 Kd semejante a la cápside proteica de CMV (Foto 5).

Por RT-PCR, todas las plantas de maní y trébol blanco infectadas naturalmente en el campo, fueron positivas produciendo una banda de (870pb) semejante a la determinada para el CMV (Foto 6). El producto de la digestión de la banda de RT-PCR con la enzima de restricción *Msp* I, generó cuatro pequeños fragmentos de aproximadamente 250pb, 200pb, 160pb y 130pb, similares en tamaño a los descritos para miembros del CMV ubicados en el subgrupo I (Foto 7).

Las evaluaciones de transmisión de la virosis sobre plántulas emergidas en invernáculo (síntomas) y corroboradas por DAS-ELISA y dot-blot indicaron: para el calibre >9 (0% de transmisión); 8 (1,8%); 7,5 (2,5%); 7 (0,6%); 6,5 (1,2%); 6 (1,1%) y <6 (3,5%). La media de transmisión por semilla para todos los calibres fue de 2,4%.



Foto 1: Folíolos de hojas de maní con síntomas de moteado clorótico causado por CMV.



Foto 2: Granos de maní calibre 10 comparados con granos de calibre <6 provenientes de plantas enfermas con CMV.

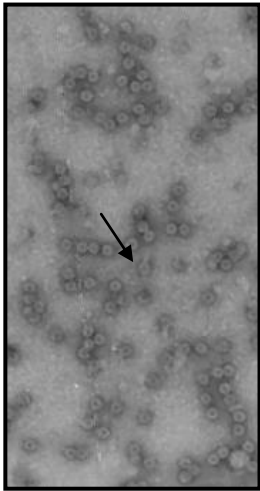


Foto 3: Partículas virales esféricas de 30 nm de diámetro (25X)

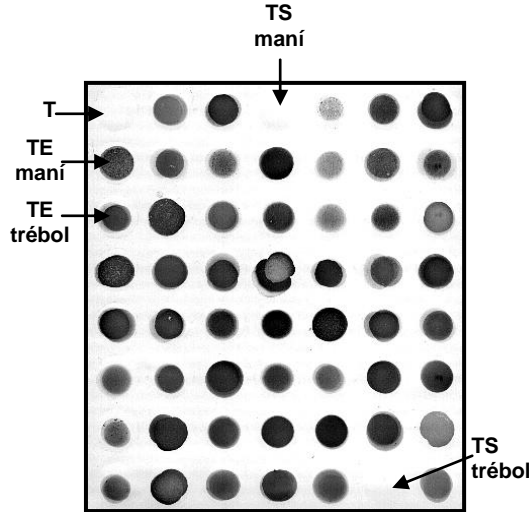


Foto 4: Dot-blot con muestras de maní provenientes de semillas infectadas con CMV
T: tampón; TS: testigo sano; TE: testigo enfermo

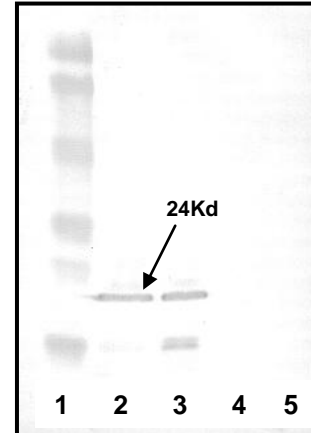


Foto 5: Western blot con As CMV mostrando la banda de la CP del virus de 24 Kd.
Calle1: proteína marcadora (Kd)
Calle2-3: maní y trébol enfermos
Calle4-5: maní y trébol sanos

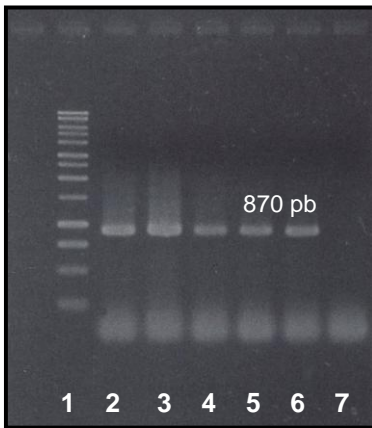


Foto 6: RT-PCR con cebadores específicos Para el gen de la CP de CMV.
Calle1: marcador 1Kb DNA Ladder
Calle2-6: muestras de maní
Calle7: testigo sano (maní)

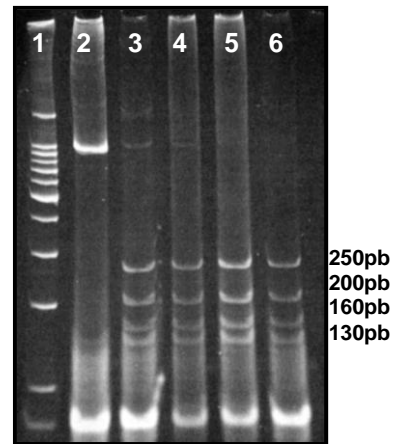


Foto 7: Digestión de la banda amplificada por PCR con la enzima de restricción *Msp I*.
Calle1: marcador 100bp DNA Ladder
Calle2: producto de PCR (maní) sin digerir
Calle3-6: producto de PCR (maní) digerido

Los resultados obtenidos confirman la presencia de CMV infectando naturalmente cultivos de maní en la provincia de Córdoba, en todas las campañas y procedencias analizadas.

Los granos provenientes de las plantas afectadas, en su mayoría, correspondieron a los calibres pequeños, 6 y < 6 (granulometría 70 - 80), determinándose también en éstos los mayores porcentajes de transmisión de la virosis. La comprobación de la transmisión del CMV a través de semillas de distintos calibres tiene significancia epidemiológica, ya que los granos de menor calibre no son cosechados por la máquina y permanecen en el suelo, pudiendo servir como fuente de inóculo primaria del virus, mientras que los granos de calibres medios 7 (granulometría 60 - 70) utilizados normalmente como simiente, podrían introducir la virosis en nuevos lotes/áreas sin antecedentes de la enfermedad.

La confirmación de que la sintomatología observada en distintas zonas corresponde al CMV esta indicando la dispersión de la enfermedad en el área manisera.

Finalmente, es interesante señalar que en varias muestras de maní de distintas regiones se detectó la coinfección de este virus (CMV) con otro virus alargado-flexuoso, típico de los potyvirus, que esta en proceso de caracterización.